



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR AGROFORESTERIE

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2022-2023

N° D'ORDRE : 073

THESE DE DOCTORAT

Mention : Agriculture et Foresterie Tropicale

Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire

CANDIDAT

Nom : N'ZI

Prénoms : N'goran Parfait

**Qualité hygiénique des salades de fruits et de légumes
prêtes à consommer (4^{ème} gamme) vendues dans les
grandes surfaces de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire)**

JURY

Président : M. AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire, Université
Jean Lorougnon Guédé

Co-Directeur : M. ANGAMAN Djédoux Maxime, Professeur Titulaire, Université
Jean Lorougnon Guédé

Co-Directeur : Mme GBONON M'Bengue Valérie Carole, Maître de Recherche,
Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

Rapporteur : M. VOKO BI Rosin Don Rodrigue, Maître de Conférences,
Université Jean Lorougnon Guédé

Examineur : M. KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire, Université Jean
Lorougnon Guédé

Examineur : M. OUATTARA Gnénéquidou Honoré, Maître de Conférences,
Université Félix Houphouët-Boigny

**Soutenue publiquement
le : 06/05/2023**

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
DEDICACE.....	x
REMERCIEMENTS	xi
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES ANNEXES.....	xxi
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	6
1.1. Fruits et légumes	7
1.1.1. Définition et classification.....	7
1.1.1.1. Fruit	7
1.1.1.2. Légumes	7
1.1.2. Intérêt nutritionnel et thérapeutique des fruits et légumes	8
1.1.2.1 Teneur en fibres.....	9
1.1.2.2. Teneur en vitamines	9
1.1.2.3. Teneur en minéraux.....	10
1.1.2.4. Composés bioactifs des fruits et légumes	10
1.1.2.4.1. Caroténoïdes.....	11
1.1.2.4.2. Polyphénols	11
1.1.3. Production et gammes des fruits et légumes	11
1.1.3.1. Production des fruits et légumes	11
1.1.3.2. Différentes gammes de fruits et légumes	13
1.1.4. Fruits et légumes de quatrième gamme.....	13
1.1.4.1. Définition	13
1.1.4.2. Présentation de la filière des produits de 4 ^{ème} gamme	14

Table des matières

1.1.4.3. Consommation mondiale des produits de quatrième gamme.....	14
1.1.4.4. Critères de qualité des salades de 4 ^{ème} gamme.....	15
1.1.4.5. Conception des salades de 4 ^{ème} gamme.....	16
1.1.4.6. Conservation des salades de 4 ^{ème} gamme.....	16
1.1.4.7. Conditionnement des salades de 4 ^{ème} gamme	17
1.1.4.7. 1. Emballage passif	17
1.1.4.7.2. Emballage actif ou intelligent	17
1.1.4.8. Microflore de la salade prête à l'emploi (4 ^{ème} gamme).....	19
1.1.4.8.1. Sources de contamination.....	19
1.1.4.8.1.1. Principales voies d'introduction primaire	19
1.1.4.8.1.2. Autres sources de contamination.....	20
1.1.4.8.2. Altération microbiologique des salades de 4 ^{ème} gamme	21
1.1.4.8.2.1. Définition	21
1.1.4.8.2.2. Facteurs de détérioration des salades de 4 ^{ème} gamme	21
1.1.4.8.2.3. Microorganismes de détérioration des salades de 4 ^{ème} gamme.....	21
1.1.4.8.2.3.1. Flore fongique d'altération.....	21
1.1.4.8.2.3.1.1. Levures	22
1.1.4.8.2.3.1.2. Moisissures.....	22
1.1.4.8.2.3.2. Flore bactérienne d'altération.....	22
1.1.4.8.3. Pathogènes bactériens des salades de 4 ^{ème} gamme.....	23
1.1.4.8.3. 1. <i>Escherichia coli</i>	23
1.1.4.8.3. 1. 1. Taxonomie.....	23
1.1.4.8.3.1.2. Habitat	24
1.1.4.8.3. 1. 3. Caractères morphologiques	24
1.1.4.8.3. 1. 4. Caractères cultureux	24
1.1.4.8.3. 1. 5. Caractères biochimiques	24
1.1.4.8.3.1.6. Pathogénicité	25

Table des matières

1.1.4.8.3. 2. Salmonelles	25
1.1.4.8.3.2.1. Taxonomie.....	25
1.1.4.8.3. 2. 2. Habitat	26
1.1.4.8.3.2.3. Caractères morphologiques	26
1.1.4.8.3. 2. 4. Caractères cultureux	26
1.1.4.8.3.2.5. Caractères biochimiques	27
1.1.4.8.3.2.6. Pouvoir pathogène.....	27
1.1.4.8.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.1.4.8.3.3.1. Taxonomie.....	28
1.1.4.8.3. 3. 2. Habitat	28
1.1.4.8.3.3.3. Caractères Morphologique	28
1.1.4.8.3.3.4. Caractères cultureux	29
1.1.4.8.3.3.5. Caractères biochimiques	29
1.1.4.8.3.3.6. Pouvoir pathogène.....	29
1.1.4.8.3.4. Bactérie psychrotrophe (<i>Listeria monocytogenes</i>)	30
1.1.4.8.3.4.1. Taxonomie de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
1.1.4.8.3.4.2. Habitat	31
1.1.4.8.3.4.3. Caractères morphologiques	31
1.1.4.8.3.4.4. Caractères cultureux	31
1.1.4.8.3. 4. 5. Caractères biochimiques	32
1.1.4.8.3.4.6. Pouvoir pathogène.....	32
1.1.4.8.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques	34
1.1.4.8.4.1. Définition des antibiotiques	34
1.1.4.8.4.2. Origine des antibiotiques.....	35
1.1.4.8.4.2.1. Origine naturelle.....	35
1.1.4.8.4.2.2. Origine synthétique	35
1.1.4.8.4.3. Effets des antibiotiques	35

Table des matières

1.1.4.8.4.4. Sites d'action des antibiotiques	35
1.1.4.8.4.5. Classification des antibiotiques	36
1.1.4.8.4.6. Origine et types de résistances bactériennes aux antibiotiques	37
1.1.4.8.4.6.1. Origine des résistances bactériennes aux antibiotiques.....	37
1.1.4.8.4.6.2. Types de résistance aux antibiotiques	37
1.1.4.8.4.6.2.1. Résistance naturelle	37
1.1.4.8.4.6.2.2. Résistance acquise	38
1.1.4.8.4.6.2.2.1. Origine de l'émergence des résistances acquises	38
1.1.4.8.4.6.2.2.2. Multirésistance	39
1.1.4.8.4.6.2.3. Résistance bactérienne dans la chaîne alimentaire	40
1.1.4.8.5. Caractérisation moléculaire des pathogènes bactériens	40
1.1.4.8.5.1. Extraction d'ADN	40
1.1.4.8.5.2. Réaction en chaîne par la polymérase (PCR).....	41
1.1.4.8.5.3. Séquençage	41
1.1.4.8.5.4. Technique de Sanger	41
1.1.4.8.5.5. ARN ribosomal 16S comme outils d'identification des procaryotes	43
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	47
2.1. Matériel	48
2.1.1. Matériel végétal.....	48
2.1.2. Souches bacteriennes.....	48
2.1.3. Matériel technique.....	48
2.1.3. 1. Matériel de prélèvement.....	48
2.1.3. 2. Matériel de laboratoire	48
2.1.3. 3. Matériel d'analyses bactériologiques et biochimiques.....	52
2.1.3. 4. Matériel d'analyse moléculaire	55
2.2. Méthodes	56
2.2. 1. Enquête sur la consommation de salades prêtes à consommer à Abidjan.....	56

Table des matières

2.2.1.1. Choix des sites d'enquête et d'échantillonnage	56
2.2.1.2. Rubriques renseignées par l'enquête	56
2.2. 2. Collecte des échantillons et conservation au laboratoire	56
2.2.3. Détermination des paramètres physicochimiques des salades prêtes à consommer	57
2.2.3.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)	57
2.2.3.2. Détermination de l'acidité titrable (AT).....	57
2.2.3.3. Dosage du degré Brix	57
2.2.3.4. Détermination de la teneur en eau	58
2.2.4. Suivi de la croissance microbienne durant la période de conservation domestiques des salades	58
2.2.4.1. Préparation des échantillons et milieux de culture	59
2.2.4.1.1. Milieux de culture	59
2.2.4.1.2. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales	59
2.2.4.2. Dénombrement des microorganismes	59
2.2.4.2.1. Dénombrement des Germes Aérobie Mésophile (GAM) et Psychrophile (GAP)	59
2.2.4.2.2. Flore fongique (levures et moisissures)	60
2.2.5. Recherche de pathogènes bactériens de portage et psychrophiles dans les salades prêtes à consommer	60
2.2.5.1. Pathogènes bactériens de portage.....	60
2.2.5.1.1. Dénombrement de <i>Escherichia coli</i>	60
2.2.5.1.2. Recherche de <i>Salmonella</i> spp.....	60
2.2.5.1.3. Dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	61
2.2.5.1.4. Détermination des charges bactériennes	61
2.2.5.1.5. Identification bactérienne	61
2.2.5.1.5.1. Identification des caractères morphologique.....	61
2.2.5.1.5.1.1. Coloration de Gram	61
2.2.5.1.5.2. Identification des caractères biochimiques	62

Table des matières

2.2.5.1.5.2.2. Test de mannitol mobilité.....	62
2.2.5.1.5.2.3. Portoir réduit de Le Minor	62
2.2.5.1.5.2.4. Test de catalase.....	63
2.2.5.1.5.2.5. Test d'oxydase.....	63
2.2.5.2. Recherche de pathogènes psychrotrophes.....	64
2.2.5.2.1. Dénombrement.....	64
2.2.5.2.2. Identification moléculaire de pathogènes psychrotrophes	64
2.2.5.2.2.1. Préparation de l'extrait cellulaire	64
2.2.5.2.2.2. Amplification des régions hypervariables de l'ARN 16 S (F27/R520) par PCR..	64
2.2.5.2.2.3. Préparation de gel d'agarose	65
2.2.5.2.2.4. Electrophorèse des fragments des régions hypervariables de l'ARN 16 S (F27/R520) par PCR.....	65
2.2.5.2.2.5. Séquençage des souches présomptives de bactéries psychrotrophes isolées	66
2.2.6. Appréciation de la qualité microbiologique des salades de quatrième gamme.....	66
2.2.7. Evaluation du potentiel de la virulence et de la résistance aux antibiotiques des souches identifiées	67
2.2.7.1. Détermination des gènes de virulence des souches de <i>E. coli</i> et de <i>S. aureus</i> isolés..	67
2.2.7.1.1. Extraction d'ADN génomique	68
2.2.7.1.3. Recherche des gènes de virulence	69
2.2.7.1.3. 1. Amplification des gènes de shiga toxines 1 et 2 (<i>stx1</i> et <i>stx2</i>).....	69
2.2.7.1.3. 2. Amplification des gènes d'entérotoxines (<i>sea</i> et <i>seb</i>).....	70
2.2.7.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	70
2.2.7.2.1. Préparation de l'inoculum	70
2.2.6.2.2. Ensemencement.....	71
2.2.6.2.3. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique.....	71
2.2.4.2.4. Lecture.....	71
2.2.7. Analyse bioinformatique des données.....	71
2.2.8. Analyses statistiques	72

Table des matières

2.2.8.1. Analyses des données d'enquête	72
2.2.8.2. Analyses des données physico-chimiques.....	72
2.2.8.3. Analyses des données microbiologiques	72
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	89
3.1. RESULTATS	75
3.1.1. Enquête.....	75
3.1.1.1. Caractéristiques sociodémographiques de la population enquêtée	75
3.1.1.2. Niveau de connaissance de la population abidjanaise enquêtée pour les salades prêtes à consommer	77
3.1.1.3. Proportion des consommateurs de salades de 4 ^{ème} gamme	79
3.1.1.4. Fréquence des malaises après consommation des salades de 4 ^{ème} gamme	82
3.1.3. Valeurs des paramètres physicochimiques des salades prêtes à consommer évaluées ..	83
3.1.4. Evolution de la croissance microbienne dans les salades prêtes à consommer.....	87
3.1.4.1. Qualité microbienne des salades prêtes à consommer à l'ouverture des emballages .	87
3.1.4.2. Suivi de la croissance microbienne dans les salades après l'ouverture des emballages	89
3.1.4.3. Corrélation entre les charges des microorganismes dénombrés dans les salades analysées.....	91
3.1.4.4. Classification des salades en fonction de la croissance microbienne au cours de la conservation après ouverture.....	91
3.1.5. Niveau de contamination des salades de 4 ^{ème} gamme par des pathogènes bactériens ...	93
3.1.5.1. Niveau de contamination des salades par des pathogènes de portage.....	93
3.1.5.1.1. Prévalence des pathogènes bactériens de portage dans les salades de 4 ^{ème} gamme.	93
3.1.5.1.2. Qualité microbiologique des salades par rapport aux germes de portage durant la conservation.	93
3.1.5.2. Pathogènes bactériens psychrotrophes dans les salades de 4 ^{ème} gamme.....	97
3.1.5.2.1. Caractéristiques culturales et morphologiques des bactéries isolées sur gélose Oxford	97

Table des matières

3.1.5.2.2. Charges moyennes des pathogènes psychrotrophes dans les salades de 4 ^{ème} gamme de la réception à 7 jours de conservation.	99
3.1.5.2.3. Espèces de bactéries psychrotrophes isolées dans les salades	100
3.1.5.2.4. Analyses comparées des séquences de <i>L. fusiformis</i> et <i>L. monocytogenes</i>	105
3.1.6. Facteurs de virulence et sensibilité des souches isolées aux antibiotiques	108
3.1.6.1. Facteurs de virulence des souches bactériennes isolées des salades de 4 ^{ème} gamme	108
3.1.6.1.2. Prévalence de gènes responsables de la production d'entérotoxines (<i>sea</i> et <i>seb</i>) chez <i>S. aureus</i> isolé dans les salades de 4 ^{ème} gamme	108
3.1.6.1.3. Prévalence de gènes responsables de la production de Shiga-toxine (<i>stx2</i> et <i>stx1</i>) chez <i>E. coli</i> isolé dans les salades de 4 ^{ème} gamme.....	108
3.1.6.2. Profil de résistance des souches isolées aux antibiotiques	109
3.1.6.2.1. Profil de résistance de <i>E. coli</i> aux antibiotiques.....	109
3.1.6.2.2. Observation de la résistance des souches de <i>Salmonella</i> spp. face aux antibiotiques	111
3.1.6.2.3. Profil de résistance des souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	112
3.1.6.2.4. Sensibilité des bactéries pathogènes psychrotrophes provenant des salades à consommer	114
3.2. Discussion	117
3.2. 1. Niveau de consommation des salades prêtes à consommer dans la ville d'Abidjan...	117
3.2.2. Appréciation de la teneur des paramètres physico-chimiques déterminés dans les salades prêtes à consommer	119
3.2.3. Qualité microbienne des salades de 4 ^{ème} gamme à l'ouverture ouverture des emballages.	121
3.2.3. Niveau de contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes bactériens	125
3.2.3.1. Niveaux de contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes de portage.....	125
3.2.3.2. Contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes bactériens psychrotrophes	127

Table des matières

3.2.4. Niveau de virulence et de résistance aux antibiotiques des germes isolés dans les salades prêtes à consommer	131
3.2.4. 1. Prévalences des gènes d'entérotoxine (<i>sea</i> et <i>seb</i>) et de Shiga-toxine (<i>stx1</i> et <i>stx2</i>) dans les échantillons de salades étudiées.....	131
3.2.4. 2. Niveaux de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	133
3.2.4. 2. 1. Résistance des germes de portages isolés dans les salades face aux antibiotiques	133
3.2.4. 2. 2. Niveau de résistance aux antibiotiques des bactéries psychrotrophes isolées dans les salades	136
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161
REFERENCES.....	142
ANNEXES	176

Dédicace

DEDICACE

Je dédie ce manuscrit à toute ma famille. Puisse l'ETERNEL nous unir davantage. Ainsi qu'à la mémoire de mon père YAO N'zi.

Remerciements

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé aux laboratoires d'Agro-valorisation de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa et de Bactériologie-Virologie à l'unité ASSURMI de l'institut PASTEUR de Côte d'Ivoire dans le cadre de l'obtention du diplôme de Doctorat unique en Agriculture et Foresterie Tropicale. Au terme de cette étude, qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à ceux dont le soutien, la disponibilité et la contribution à divers niveaux ne m'ont pas fait défaut. Cette Thèse n'aurait pas pu être menée à terme sans la contribution scientifique et l'assistance morale de plusieurs personnes que je voudrais remercier.

Je remercie Madame TIDOU Abiba Sanogo Epouse KONE, Professeur Titulaire, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) pour m'avoir accepté dans son institution.

Je remercie aussi Monsieur KONE Tidiani, Professeur Titulaire, Vice-président de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) pour son aide apportée à la présidente pour la bonne marche de l'institution qu'elle a la lourde charge de diriger.

Je remercie également Monsieur AKAFFOU Doffou Sélastique, Professeur Titulaire, Vice-président de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) pour sa contribution à la bonne marche de ladite l'institution. Aussi, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de cette Thèse et d'améliorer le document.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Madame TONESSIA Dolou Charlotte, Maître de Conférences de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Directrice de l'Unité de Formation et de Recherche (UFR) en Agroforesterie, pour avoir favorisé le bon déroulement de ce travail.

Je remercie Monsieur BEUGRE Grah Avit Maxwell, Professeur Titulaire, Responsable du laboratoire d'Agro-valorisation de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa pour ses conseils et ses encouragements qui ont servi dans la réalisation de ce travail.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Madame DOSSO Mireille, Professeur Titulaire, Directrice de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, de m'avoir permis d'intégrer son institution.

Remerciements

Je remercie également Madame GUESSENND Nathalie, Directeur de recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Responsable de l'unité ASSURMI pour son dynamisme et ses conseils qui m'ont été profitables.

Je tiens à remercier très sincèrement mon Co-Directeur de Thèse, Monsieur ANGAMAN Djédoux Maxime, Professeur Titulaire à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, de m'avoir accepté et avoir cru en mes capacités. Aussi, je lui dis merci pour ses conseils judicieux d'encadreur et de père, également pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie mon Co-Directeur de Thèse, Madame GBONON M'Bengue Valérie Carole, Maîtres de Recherches à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, de m'avoir accepté comme étudiant et encadré. Je lui exprime également ma gratitude pour ses conseils judicieux d'encadreur qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au rapporteur de cette Thèse, Monsieur VOKO BI Rosin Don Rodrigue, Maître de Conférences à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, qui a pris de son temps pour améliorer le contenu du document.

Je tiens à exprimer également ma gratitude à Madame GOUALIE Gblossi Bernadette, Maître de Conférences à l'Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, rapporteur également de cette Thèse qui a contribué à l'amélioration du contenu de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements à Monsieur KONATE Ibrahim, Professeur Titulaire à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa d'avoir accepté d'examiner cette Thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur OUATTARA Gnénéquidou Honoré, Maître de Conférences à l'université Félix Houphouët-Boigny, d'avoir accepté également d'examiner cette Thèse.

Je remercie également les Docteurs, CONTE Caroline, Maître de Conférences de l'université Toulouse III et OUATTARA Hadja Djénéba, Assistante de l'Université Félix Houphouët-Boigny, pour leur aide apportée dans le séquençage nucléotidique des échantillons de microorganismes.

J'adresse mes remerciements aux Enseignants-Chercheurs du laboratoire d'Agrovalorisation pour les conseils et soutiens moraux bénéfiques à la réalisation de ce travail.

Remerciements

Je remercie tous les chercheurs de l'unité ASSURMI et de façon particulière Docteur TIEKOURA Konan Bertin, Attaché de Recherche à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Je leur exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude pour l'enseignement technique judicieux qu'ils ont su prodiguer au cours de ce travail.

Je tiens à remercier Docteur BOKO Adjoua Christiane Eunice pour son soutien et sa disponibilité et l'ensemble des étudiants inscrits en Thèse de Doctorat de l'équipe, entre autres KAMBOU Sansan, GBEGBE Dého Aristide, BEHE Gninaho Nonsika Julia et N'GUESSAN Kouamé Abraham ainsi que les étudiants ZAKPA Eddy Camille et GLOKPAÏ Ouliédibou Noëllie Guy-Rolande pour leur présence et leur soutien tant dans les moments de joie que de difficultés durant ce travail.

Je remercie tous les doctorants travaillant à l'IPCI et de façon particulière AFFRAN Sidjeh Arlette, GNAHORE Djéda Franck Arnaud et COULIBALY Adjah Massagnan pour leur disponibilité.

Je dis grand merci à toute ma famille, pour leur prière, leur conseil et pour leur soutien.

Je remercie infiniment ma mère qui n'a pas cessé un instant de me donner la force et l'envie de progresser dans la recherche.

Je remercie infiniment mes grands frères N'ZI Kouadio Jean-Claude et N'ZI Koffi Pacôme pour les sacrifices énormes qu'ils ont bien voulu consentir pour moi. Que le Seigneur vous garde longtemps en bonne santé sur cette terre. Ce travail n'est qu'un modeste témoignage de mon amour filial et de ma reconnaissance

Abréviations et Sigles

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

AACC	: American Association for Clinical Chemistry (Association Américaine de Chimie Clinique)
AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFNOR	: Association Française de Normalisation
ANSES	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOAC	: Association of Official Agricultural Chemists (Association des officiels chimistes agricoles)
ASSURMI	: Antibiotique des Substances Naturelles et de la Surveillance des Microorganismes Aux Anti-Infectieux.
AT	: Acidité Titrable
BCC	: Bouillon Cœur Cervele
BP	: Baird Parker
Cf	: 100 % Cœur de frisée
CASFM	; Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CIT	: Citrate
CMADA	: Critère Microbiologique Applicable aux Denrées Alimentaires
CSV	: Comma Separated Values (Valeurs séparées par des virgules)
CTILF	: Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes
CTAB	: Bromure de CélylTriméthylAmmonium
DLC	: Date Limite de Consommation
dNTP	: DésoxyriboNucléotide Triphosphate
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétique
EP	: Epinard
EFSA	: European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
EPT	: Eau Peptonée Tamponnée

Abréviations et Sigles

EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comité européen pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens)
FAO	: Food and Agriculture Organisation (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture)
GLU	: Glucose
IND	: Indole
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
IPCI	: Institut PASTEUR de Côte d'Ivoire
ISO	: Organisation Internationale de Normalisation
IR	: Indice de Réfraction
LACT	: Lactose
LPSN	: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (Liste des noms de procaryotes avec leur place dans la nomenclature)
JP	: Jeunes Pousses
Ma	: Mâches
MAP	: Modified Atmosphere Packaging (Emballage sous atmosphère modifiée)
MAN	: Mannitol
MR	: Mâches et Roquettes
OPA	: Offre Publique d'Achat
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PAC	: Prêt à consommer
Pb	: Paire de Base
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
Rq	: Roquettes
RVS	: Rappaport Vassiliadis Soja
SA	: Salades Aperitives
SCA	: Salades de Carottes
SCB	: Salades céleri Branches

Abréviations et Sigles

SCH	: Salades Choux
SChV	: Salades Chênes vertes
SCOM	: Salades Composées
SFC	: Salades de fruits composés
SFPC	: Salade Fruits de Papayes et Citrons
SFP	: Salades fruits de Papayes
SFPA	: Salades Fruits Papayes et Ananas
SFPM	: Salades fruits Papayes et Mangues
SFR	: Salades Fruits de Raisin
SME	: Salades Meli-Melo
SN	: Salades Nicoises
TAE	: Tris-Acétate-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TA	: Température Ambiante
UFC	: Unité Formant Colonies
URE	: Urée
US	: United States (États-Unis)
UJLoG	: Université Jean Lorougnon Guédé
WHO	: World Health Organization (Organisation mondiale de la santé)

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Différents types de légumes	8
Tableau II : Caractères biochimiques du genre <i>Listeria</i>	32
Tableau III : Différents types de salades collectées et nombres d'échantillons associés.....	49
Tableau IV : Equipements de laboratoires utilisés	52
Tableau V : Liste des disques d'antibiotique testés sur les souches bactériennes	54
Tableau VI : Amorces utilisées pour les identifications moléculaires.....	55
Tableau VII : Critères microbiologiques applicables à la salade de 4 ^{ème} gamme	67
Tableau VIII : Valeurs des paramètres physico-chimiques salades de 4 ^{ème} gamme évaluées	85
Tableau IX : Charges moyennes des germes dénombrés dans les salades de 4 ^{ème} gamme à l'ouverture des emballages.....	88
Tableau X : Charges moyennes microbiennes durant la période de conservation domestique	90
Tableau XI : Matrice de corrélation entre les charges des microorganismes dénombrés dans les salades étudiées.....	91
Tableau XII : Charges moyennes des germes de portage durant la période de conservation domestique	95
Tableau XIII : Charges moyennes (UFC/g) des souches suspectées de <i>L. monocytogenes</i> durant le temps de conservation	100
Tableau XIV : Similarités entre les différentes séquences des pathogènes psychrotrophes isolés des salades de 4 ^{ème} gamme et les espèces du catalogue	102
Tableau XV : Diamètres d'inhibition (en mm) des souches de <i>L. monocytogenes</i>	114
Tableau XVI : Résistance de <i>B. cereus</i> vis-à-vis des antibiotiques.....	115
Tableau XVII : Sensibilité de <i>L. fusiformis</i> vis-à-vis des antibiotiques	115
Tableau XVIII : Résistance des souches de SCN face aux antibiotiques	116
Tableau XIX : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de <i>E. coli</i>	188
Tableau XX : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de <i>Salmonella</i> spp. dans les salades	188
Tableau XXI : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de <i>S. aureus</i> dans les salades	189

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Production mondiale des fruits en millions de tonnes en	12
Figure 2 : Production mondiale des légumes en millions de tonnes en 2018.	12
Figure 3 : Consommation des produits de quatrième gamme.....	15
Figure 4 : Exemples de salades de 4 ^{ème} gamme.....	19
Figure 5 : Voies d'infection de <i>Listeria monocytogenes</i> chez l'homme.....	34
Figure 6 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques	36
Figure 7 : Différents mécanismes d'acquisition de résistance chez les bactéries	38
Figure 8 : Pression de sélection des antibiotiques.....	39
Figure 9 : Principes du séquençage selon la méthode de Sanger	43
Figure 10 : Régions hypervariables de l'ARN 16S	44
Figure 11 : Salades de feuilles de Chênes vertes (A) et salades de choux (B)	50
Figure 12 : Salade de feuilles de Chênes vertes (C) et salade de carottes (D)	50
Figure 13 : Salades de fruits composés (E) et salades jeunes pousses (F)	51
Figure 14 : Salade de légumes associées aux produits carnés (G) et salade d'épinard (H)	51
Figure 15 : Distribution du sexe de la population enquêtée.....	75
Figure 16 : Distribution de l'âge des personnes enquêtées	75
Figure 17 : Niveau d'instruction des personnes enquêtées	76
Figure 18 : Répartition des personnes enquêtées en fonction de la commune.....	76
Figure 19 : Professions des personnes enquêtées.....	76
Figure 20 : Proportion des personnes enquêtées connaissant les salades prêtes à consommer	77
Figure 21 : Distribution de la connaissance des salades de 4 ^{ème} gamme en fonction de la commune des personnes enquêtées.	78
Figure 22 : Distribution de la connaissance des salades prêtes à consommer en fonction de la profession des personnes enquêtées	78
Figure 23 : Taux de consommation des salades de 4 ^{ème} gamme de fabrication industrielle vendues dans les supermarchés de la ville d'Abidjan	80
Figure 24 : Distribution de la consommation des salades prêtes à consommer en fonction de certaines caractéristiques sociodémographiques des personnes enquêtées	80
Figure 25 : Fréquence de consommation des salades prêtes à consommer par semaine	81
Figure 26 : Préférence sur le type de salade consommée par la population abidjanaise.....	81
Figure 27 : Moments de consommation des salades prêtes à consommer	81

Liste des figures

Figure 28 : Cas de malaise lié à la consommation des salades de 4 ^{ème} gamme par semaine..	82
Figure 29 : Symptômes des malaises liés à la consommation des salades de 4 ^{ème} gamme.....	82
Figure 30 : Relation entre cas de malaises, symptômes et type de salade consommée	83
Figure 31 : Variations expliquées (A) et contribution des paramètres physico-chimiques (B) dans la représentation des dimensions	86
Figure 32 : ACP des paramètres physico-chimiques (B) et des différentes salades étudiées (A)	86
Figure 33 : Qualité microbiologique des salades en fonction de l'origine	88
Figure 34 : Heatmap Cluster des charges moyennes des microorganismes dénombrés dans les salades étudiées	92
Figure 35 : Prévalences des pathogènes bactériens de portage.....	93
Figure 36 : Regroupement des salades de 4 ^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbiologique à l'ouverture des emballages (J0).....	96
Figure 37 : Regroupement des salades de 4 ^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbiologique au troisième jour de conservation (J3)	96
Figure 38 : Regroupement des salades de 4 ^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbiologique au septième jour de conservation (J7).....	97
Figure 39 : Aspects des germes suspectés de pathogènes psychrotrophes sur la gélose Oxford	98
Figure 40 : Caractéristiques morphologiques après coloration de Gram des bactéries suspectées de pathogènes psychrotrophes isolés sur la gélose oxford base.....	98
Figure 41 : Profil électrophorétique du produit d'amplification des régions (V-V3) du gène ARNr 16S (500 pb) des souches présumptives de pathogènes psychrotrophes isolés des salades de 4 ^{ème} gamme.....	101
Figure 42 : Alignement des séquences des microorganismes isolés dans les salades 4 ^{ème} gamme	103
Figure 43 : Arbre p ARN16Shylogénétique des espèces identifiées sur la base des régions hypervariables de l'ARN16S	104
Figure 44 : Dotmatrix des séquences de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. fusiformis</i>	105
Figure 45 : Alignement des séquences de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. fusiformis</i>	106
Figure 46 : Dotmatrix de la séquence de <i>L. monocytogenes</i>	107

Liste des figures

Figure 47 : Dotmatrix de la séquence de <i>L. fusiformis</i>	107
Figure 48 : Profil électrophorétique du produit d'amplification gène de virulence (<i>sea</i>) de <i>S. aureus</i>	108
Figure 49 : Profil électrophorétique du produit d'amplification du gène de virulence (<i>stx2</i>) de <i>E. coli</i>	109
Figure 50 : Profil de résistance des souches de <i>E. coli</i> vis à vis des d'antibiotiques	110
Figure 51 : Représentation de la résistance des souches de <i>E. coli</i> aux antibiotiques par analyse factorielle des correspondances multiples	110
Figure 52 : Distribution des phénotypes de résistance des souches de <i>E. coli</i> aux antibiotiques.	111
Figure 53 : Profil de résistance des souches de <i>Salmonella</i> spp. vis-à-vis des antibiotiques	112
Figure 54 : Profil de résistances des souches de <i>S. aureus</i> isolés dans les salades de 4 ^{ème} gamme	113
Figure 55 : Prévalence de la multirésistances des souches de <i>S. aureus</i> isolés.....	113

Liste des annexes

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'enquête

Annexe 2 : Fiche de collecte d'échantillons

Annexe 3 : Matériel technique

Annexe 4 : Aspects culturels des germes recherchés

Annexe 5 : Tests d'identifications bactériennes

Annexe 6 : Electrophorèse des extraits d'ADN

Annexe 7 : Observations graphiques du séquençage des échantillons

INTRODUCTION

Introduction

Les fruits et les légumes sont les produits végétaux et représentent un élément essentiel pour une alimentation saine. Car ils constituent la principale source de macro et de micronutriments (Kaczmarek *et al.*, 2019). Ce sont des aliments faibles en gras et en énergie, relativement riches en vitamines, minéraux et d'autres composés bioactifs, en plus d'être une bonne source de fibres (Rekhy & McConchie, 2014). De façon générale, une alimentation riche en fruits et légumes est susceptible de réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de protéger contre certains types de cancer (FAO, 2015). Ainsi, la consommation de 400 à 600 g de fruits et légumes par jour est recommandée par l'OMS, la FAO et le Fonds Mondial de Recherche contre le cancer (Pollard *et al.*, 2009 ; Adjrah *et al.*, 2011).

De manière générale, les fruits et légumes, sont classés en « gammes », en fonction du mode de présentation et des techniques d'élaboration, ainsi que du procédé de conservation (Branger, 2007). Dans cette classification, figure la 4^{ème} gamme qui concerne les aliments prêts à consommer (PAC). Ces aliments concernent un groupe de produits alimentaires qui sont pré-nettoyés, principalement emballés et prêts à être consommés sans préparation ni cuisson préalable, « *ready-to-eat* » en anglais (Paudya *et al.*, 2017). Ces produits sont apparus dans les supermarchés européens à partir de 1980 (Djioua, 2010). Cependant, la modification du mode de vie des consommateurs et la grande attention portée aux aliments sains et nutritifs ont élargi la demande de produits de quatrième gamme (Cofelice *et al.*, 2019).

Dans les pays en développement, l'apparition de nouvelles habitudes alimentaires dues à une urbanisation galopante a entraîné l'arrivée des produits de la 4^{ème} gamme dans certains supermarchés et leur consommation par une certaine classe de la société. Parmi ces aliments, les salades prêtes à consommer sont des aliments constitués de fruits ou des légumes frais, crus, prêts à l'emploi (Varoquaux, 2002), pré-nettoyés, découpés, parés, pilés. Elles pourraient être conditionnés sous atmosphère contrôlée et modifiée (Buffet, 2003). Ces salades sont principalement emballées sans préparation préalable dans des matériaux possédant des propriétés particulières de perméabilité aux gaz et à l'eau et conservés par réfrigération (Leneveu-Jenvrjn *et al.*, 2018). Les salades sont devenues les plus sollicitées car de nos jours les repas sont pris de plus en plus hors domicile et les ménages consacrent moins de temps à l'élaboration des repas. Grâce à ces salades, la restauration hors domicile limite ses coûts en main d'œuvre et les individus gagnent du temps, paramètre essentiel du mode de vie moderne. De plus, la volonté de bien s'alimenter est désormais une tendance générale (Dony, 2009).

Introduction

Cependant, ces dernières années, la consommation des aliments prêts à consommer soulève des inquiétudes quant à leur sécurité. En effet, plusieurs cas d'intoxications alimentaires associées à la consommation de ces produits ont été observés dans le monde. Ainsi, en 2012 une épidémie d'origine alimentaire a été signalée dans un collège en Chine due à la consommation des ingrédients de salade (Zhang *et al.*, 2012). En mai 2014, une épidémie a été observée chez les populations militaires et civiles associée à la consommation de la salade composée prête à consommer en Norvège (MacDonald *et al.*, 2016). En avril 2019, une épidémie transfrontalière en Suède dont 37 cas et 20 cas au Danemark suite à la consommation d'épinards frais importés a été déclarée (Espenhain *et al.*, 2019). En se basant sur les statistiques actuellement disponibles, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) est l'un des plus importants agents pathogènes associés aux aliments de quatrième gamme. Cette bactérie est responsable de la listériose, qui est la 3^{ème} cause de décès des maladies d'origine alimentaire avec un taux de létalité de 20 à 30 % (Churchill *et al.*, 2019). De plus, la présence d'autres bactéries potentiellement pathogènes a été signalée dans les salades de 4^{ème} gamme. C'est le cas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Baumgartner *et al.*, 2014), *E. coli* et de *Salmonella spp.* (Mritunjay & Kumar, 2017).

En Afrique, concernant la prévalence des agents pathogènes d'origine alimentaire, bien que les données soient très hétérogènes, une caractéristique frappante est la forte présence des bactéries dans les aliments prêts à consommer. Les souches de *E. coli* représentaient en moyenne 37,6 % dans les aliments crus et 31,6 % dans les aliments prêts à consommer. La prévalence de *Salmonella spp.* était de 19,9 % contre 21,7 % ; *S. aureus*, 27,8 % contre 25,1 % et *L. monocytogenes*, 19,5 % contre 6,7 % respectivement dans ces produits (Paudyal *et al.*, 2017).

En Côte d'Ivoire, l'évolution de la société fait appel à un changement des habitudes alimentaires. Ainsi, la tendance au déménagement vers un mode de vie sain pousse la population ivoirienne à s'intéresser de plus en plus aux aliments prêts à consommer dont les salades. Cette situation a élargi la demande des consommateurs d'où l'émergence d'une diversité de salades dans les rayons des grandes surfaces de la ville d'Abidjan. Ces aliments très exposés à la contamination bactérienne doivent suivre les règles strictes de stockage et de conservation. Pourtant, les consommateurs manquent de connaissances sur la réfrigération adéquate (Marklinder *et al.*, 2004). Des études ont été réalisées sur les produits de 4^{ème} gamme vendus sur les marchés locaux d'Abidjan. Ainsi une forte contamination des germes de portage a été rapportée (Anin *et al.*, 2016). Cependant, les données scientifiques sur les salades

Introduction

prêtes à consommer produites de façon industrielle et vendues dans les grandes surfaces de la ville d'Abidjan sont pour l'heure inexistantes. Ces différents constats ont suscité les questions de recherche suivantes :

- quel est le niveau de consommation des salades prêtes à consommer en Côte d'Ivoire ? ;
- les conditions de conservations domestiques limitent-elles la prolifération des microorganismes dans les salades prêtes à consommer après ouverture des emballages ? ;
- quels sont les pathogènes bactériens capables de se développer dans les salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces de la ville d'Abidjan ? ;
- quel est le niveau de pathogénicité et de résistance aux antibiotiques des souches isolées dans les salades prêtes à consommer ?.

Pour répondre à ces questions de recherches, plusieurs hypothèses ont été émises :

- la consommation des salades prêtes à consommer serait très importante en Côte d'Ivoire ;
- les conditions de conservations domestiques seraient propices à la prolifération de certains groupes de microorganismes dans les salades de 4^{ème} gamme après l'ouverture des emballages ;
- les salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces de la ville d'Abidjan hébergeraient des pathogènes bactériens psychrotrophes et de portage ;
- les pathogènes bactériens isolés pourraient provoquer une intoxication alimentaire tout en développant une multirésistance faces aux antibiotiques.

Le présent sujet a donc été proposé pour combler le déficit d'informations et prévenir les risques sanitaires associés à la consommation des salades de quatrième gamme vendues dans les grandes surfaces (hypermarchés) de la ville d'Abidjan.

Cette étude a pour objectif principal d'évaluer les niveaux de contamination microbiologique des salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces d'Abidjan afin de prévenir les risques d'expositions aux intoxications alimentaires des consommateurs.

Les objectifs spécifiques visés sont :

- déterminer les niveaux de consommation des salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces de la ville d'Abidjan ;
- évaluer la cinétique de la croissance microbienne des salades de 4^{ème} gamme durant la période de conservation domestique après l'ouverture des emballages ;

Introduction

- rechercher des pathogènes bactériens psychrotrophes et de portage dans les salades de 4^{ème} gamme ;
- déterminer des facteurs de virulence et l'antibiorésistance des bactéries identifiées.

Le manuscrit s'organise en trois parties outre l'introduction et la conclusion. Une synthèse bibliographique qui permet de présenter les fruits et les légumes ainsi que les aliments de la quatrième gamme, les microorganismes susceptibles de s'y développer et leurs caractéristiques les antibiotiques et leur mécanisme d'action. Le matériel et les méthodes utilisés pour obtenir les résultats qui sont discutés ont été également abordés.

PREMIERE PARTIE :
GENERALITES

1.1. Fruits et légumes

1.1.1. Définition et classification

1.1.1.1. Fruit

Un fruit est ce qui résulte de la transformation d'une fleur après sa fécondation. Il contient les graines qui vont permettre à la plante de se reproduire (Xenou *et al.*, 2022). Les fruits sont classés en 6 familles :

- les fruits à noyau (prune, pêche, cerise, abricot) ;
- les fruits à pépin (pomme, poire, raisin, coing) ;
- les baies et fruits rouges (myrtille, groseille, cassis) ;
- les agrumes (citron, pamplemousse, orange, clémentine) ;
- les fruits à coque (noix, amande, châtaigne, noisette) ;
- les fruits exotiques (litchi, ananas, mangue, papaye).

1.1.1.2. Légumes

Les légumes sont connus comme les segments de plantes qui servent de nourriture aux humains et aux autres animaux. Collectivement, le mot légume désigne toute partie comestible d'un végétal, champignon, ou protiste (plusieurs algues), qui ne soit pas sucrée au goût (Ebabhi & Adebayo, 2022). Selon les espèces, les légumes frais peuvent provenir de toutes les parties du végétal : racines (carottes, navet), tubercules (pommes de terre), tiges (céleri branche), feuille (épinard), fleur (chou-fleur), fruit (tomate, courgette), etc. (Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Ainsi, tous les fruits comestibles sont considérés comme des légumes.

Il existe alors plusieurs sortes de légumes, chacun avec ses spécificités (Tableau I) :

- **le légume racine** qui est un légume dont les racines sont comestibles comme la carotte, le panais, le radis, la betterave, le navet, le fenouil, le chou-rave, le rutabaga ou le céleri-rave. Ces légumes se conservent longtemps ;
- **le légume fruit** qui est une plante potagère cultivée pour obtenir des fruits comme la tomate, le concombre, la courge, l'aubergine, la courgette ou le piment ;
- **le légume feuille** qui est un légume dont on ne consomme que les feuilles comme la laitue, l'épinard, le chou, le céleri à côte, le fenouil, le persil, la Mâche ;
- **le légume gousse ou graine** qui est un légume dont on ne consomme que l'intérieur comme les pois mange-tout, les haricots ou les fèves ;
- **le légume tubercule** est un légume dont on ne consomme que les excroissances souterraines de la plante comme la pomme de terre ou le topinambour ;

Généralités

- **le légume bulbe** qui est un légume dont on ne consomme que les bulbes comme l’ail, l’oignon, l’échalote, la ciboule et le poireau ;
- **le légume fleur** qui est un légume dont on consomme les inflorescences ou les fleurs en boutons comme l’artichaut, le brocoli ou le chou-fleur ;
- **le légume tige** qui est un légume dont on consomme des parties de la tige transformée comme le céleri branche (Tirilly & Bourgeois , 1999 ; Vierling, 2003).

Tableau I : Différents types de légumes

Légumes	Catégories
Légumes feuilles	Bette, chou, ciboulette, cresson, épinard, laitue, mâche, oseille, persil, pissenlit, poireau, céleri, fenouil, rhubarbe.
– entières	
– bases foliaires	
– pétioles	
Légumes tiges	Asperge, Chou-rave
Légumes racines	Betterave, carotte, céleri-rave, manioc, navet, panais, patate douce, radis, raifort, rutabaga, salsifis.
Légumes bulbes	Ail, échalote, oignon.
Légumes fruits	Aubergine, concombre, cornichon, courge, courgette, piment, plantain, poivron, potiron, Tomate et melon
– charnus	Gombo, haricot vert
– secs immatures	Châtaigne, noix, noisette.
– secs mures	Pousse de soja, de radis, de luzernes
Plantules entières	Choux de Bruxelles, endive, pousse de bambou.
Bourgeons	Artichaut, brocoli, chou-fleur
Inflorescences	Fève, haricot, lentille, pois.
Graines	Pomme de terre, taro, topinambour, igname, crosne du Japon.
Tubercules	Gingembre, lotus.
Rhizomes	Champignon
Carpophores	

Source : Dess (1999)

1.1.2. Intérêt nutritionnel et thérapeutique des fruits et légumes

Consommés crus ou cuits, les fruits et légumes jouent un rôle important dans la nutrition humaine. Ils sont caractérisés par leur faible teneur en matières grasses et en glucides puis leur richesse en vitamines, minéraux et fibres alimentaires (Abosedé & Raimot, 2022). En outre, grâce à leur richesse en composés phytochimiques notamment les antioxydants, ils sont qualifiés comme un aliment essentiel pris en compte dans les conseils alimentaires (Slavin &

Lloyd, 2012). De nos jours, plusieurs études ont associé une faible consommation de fruits et légumes à des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, la pression artérielle, l'hypercholestérolémie, l'ostéoporose, de nombreux cancers, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, les problèmes respiratoires ainsi que la santé mentale (Adriouch *et al.*, 2017). Le secret de ces vertus réside dans leur composition nutritionnelle.

1.1.2.1 Teneur en fibres

Les fruits et légumes sont des aliments très riches en fibres avec des teneurs variant de 1 à 5,2 g pour 100 g de matière fraîche. Ces composés permettent de réguler le transit et l'absorption des nutriments faisant de ceux-ci des aliments bénéfiques sur les paramètres physiologiques comme la satiété, l'excrétion fécale et l'activité motrice de l'intestin (Dreher, 2018). La consommation des fruits et légumes est aussi très avantageuse sur les paramètres métaboliques, notamment sur la réponse lipémique post-prandiale et, à plus long terme sur la lipémie basale et les caractéristiques de la flore colique, dus aux effets prébiotiques de certaines fibres (Arcusa *et al.*, 2021).

1.1.2.2. Teneur en vitamines

Les fruits et légumes contribuent de manière importante aux apports nutritionnels conseillés de certaines vitamines telles que la vitamine C, les folates (vitamine B9) et la vitamine A apportée par les caroténoïdes pro-vitaminiques A (Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Ces vitamines jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus cellulaires. En effet, la vitamine C est dotée de propriétés réductrices à la base de son activité biologique. Elle a une activité antioxydante et un rôle de cofacteur dans les réactions catalysées par l'oxygène. De plus, elle est reconnue pour ses capacités d'inhibition de la synthèse des nitrosamines, composés cancérigènes (Titchenal & Dobbs, 2005). La vitamine A générée par les caroténoïdes pro-vitamine A (α - et β -carotènes) joue un rôle essentiel dans la physiologie des cellules nerveuses de la rétine. Quant à la vitamine B9 des fruits et légumes, elle est représentée par le groupe des folates ou polyglutamates. Les folates participent au métabolisme des acides aminés et des acides nucléiques. Un déficit de folate chez la femme au moment de la procréation est associé à un risque de défaut de fermeture de tube neural du fœtus (Eichholzer *et al.*, 2001). La vitamine K est un cofacteur indispensable à la carboxylation de certaines protéines intervenant dans la coagulation sanguine et dans l'activation de l'ostéocalcine nécessaire à la minéralisation osseuse (Weber, 2001 ; Luo & Xu 2003 ; Lanham-New, 2008). Les légumes verts et herbes aromatiques sont les principales sources de vitamine K. Le persil et le chou vert frisé par

exemple en contiennent respectivement 1220 µg et 817 µg pour 100 g de matière sèche (Lefsrud *et al.*, 2008 ; Slimestad *et al.*, 2020).

1.1.2.3. Teneur en minéraux

Les légumes représentent un apport important de potassium. Ils apportent également, du calcium (surtout dans les choux), du magnésium, du fer et du cuivre (légumes à feuilles type épinard), du soufre (choux, oignons, ail, poireaux, navets, radis) et de nombreuses autres matières minérales. Beaucoup de ces minéraux sont indispensables pour le fonctionnement de l'organisme. Le potassium agit en étroite collaboration avec le sodium pour maintenir l'équilibre acido-basique du corps et celui des fluides. Il est nécessaire pour la transmission des impulsions nerveuses et à la contraction musculaire, y compris celle du muscle cardiaque (Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Lorsque les besoins en potassium de l'organisme ne sont pas comblés, cela agit négativement sur la pression artérielle. L'effet protecteur d'un apport alimentaire élevé de potassium sur le développement de l'hypertension artérielle est bien documenté et que des apports de potassium de 4,5 g/j sont recommandés dans le cadre de la prévention primaire de l'hypertension artérielle (Lelong, 2017). La consommation habituelle de potassium se situe entre 2340 à 5850 mg par 24 h (Mizehoun, 2015), Le potassium alimentaire est principalement sous forme de phosphate, citrate et bicarbonate. Quant au magnésium, il constitue un élément très important en biologie humaine car c'est un second cation intracellulaire. La plupart des voies métaboliques sont magnésio-dépendantes et cet élément joue un rôle clé dans l'équilibre ionique des membranes (Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Le magnésium intracellulaire jouerait un rôle clé dans l'action régulatrice de l'insuline et dans le bon fonctionnement du système vasculaire. Le déficit en magnésium peut être également exacerbé par des facteurs qui altèrent les mécanismes homéostatiques du Mg : stress, diabète. Les études épidémiologiques ainsi que des études expérimentales montrent une corrélation inverse entre le magnésium sérique et la tension artérielle (Kouassi *et al.*, 2013). Aussi, une consommation plus importante de magnésium par le biais des aliments, incluant les fruits et légumes, voire une supplémentation pourrait être également un moyen de prévention du diabète de type 2 chez les enfants obèses (Huerta *et al.*, 2005).

1.1.2.4. Composés bioactifs des fruits et légumes

Une molécule bioactive est une molécule qui possède des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif (Grigoraş, 2012). Les fruits et légumes contiennent une variété de composés bioactifs.

1.1.2.4.1. Caroténoïdes

Les caroténoïdes protègent les cellules contre les radicaux libres et notamment contre les dommages oxydatifs liés à la lumière. Ils peuvent être convertis en vitamine A selon les besoins de l'organisme. Ainsi, en cas de carence, l'organisme va puiser dans les apports de l'alimentation pour produire de la vitamine A (Brat & Brillouet, 2003). Plusieurs sont des provitamines A, et certains présentent aussi des activités anticancérogène et antioxydante (Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Ils stimulent en outre la synthèse d'anticorps. On les trouve majoritairement dans les épinards et les carottes qui en contiennent respectivement 7240 et 12 800 µg/100 g (Xu *et al.*, 2017).

1.1.2.4.2. Polyphénols

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré une forte consommation de fruits et légumes afin de réduire l'incidence de maladies cardiovasculaires (Wang, 2011). En effet, les fruits et légumes sont reconnus comme étant une source importante de polyphénols. Il s'agit entre autres des raisins noirs (91,23 mg/100 g), des pommes (56,35 mg/100 g), des goyaves (126,4 mg/100 g), des fraises (97,56 mg/100 g), des pousses de brocoli (73,78 mg/100 g) ou les artichauts (260,3 mg/100 g). Ils y sont largement représentés par les flavonoïdes, les acides phénoliques, le stilbène et les lignanes (Duchêne-Massias, 2015 ; Gollucke *et al.*, 2013 ; Amiot-Carlin & Georgé, 2017). Ces composés jouent un rôle essentiel dans l'organisme car ils sont doués d'activités antioxydante et antiradicalaire.

1.1.3. Production et gammes des fruits et légumes

1.1.3.1. Production des fruits et légumes

D'après les dernières statistiques de la FAO, la production mondiale de fruits et légumes a augmenté d'environ 50 % de 2000 à 2018. La consommation mondiale des fruits et légumes, par personne et par jour est passée de 306 g en 2000 à 390 g en 2017 (FAO, 2020). En 2018, les quantités de fruits et de légumes produites étaient respectivement de 868 millions et 1089 millions de tonnes. Les principaux fruits produits étaient par ordre de quantité les bananes, les agrumes, les melons, les pommes et les raisins (Figure 1). La figure 2 présente les principaux légumes produits en 2018. Ce sont la tomate, certaines alliacées (oignon, ail, échalote, poireau), les brassicacées (chou, chou-fleur, brocoli) et le concombre (FAO, 2021).

L'Asie de l'Est est de loin la principale zone de production, suivie de l'Asie du Sud. Hormis celles-ci, les autres grandes zones de production sont l'Amérique du Sud, l'Asie du Sud-Est ainsi que l'Europe méridionale (pour les fruits). Ces statistiques ne prennent en compte

Généralités

que les grands producteurs, une grande partie de ce que cultive les petits producteurs n'y figure pas (FAO, 2021). Il faut noter qu'en Afrique de l'Est et en Afrique de l'Ouest, la production de légumes a doublé entre 2000 et 2018 (FAO, 2020). Le monde produit davantage des fruits et légumes mais cela n'est pas suffisant. En outre, une grande partie des quantités produites est perdue avant d'arriver dans l'assiette du consommateur. La gestion de ces aliments est délicate car les fruits et légumes frais sont des produits saisonniers et périssables (Desbordes, 2017). De plus, les bassins de production sont assez spécialisés et parfois éloignés des grands bassins de consommation.

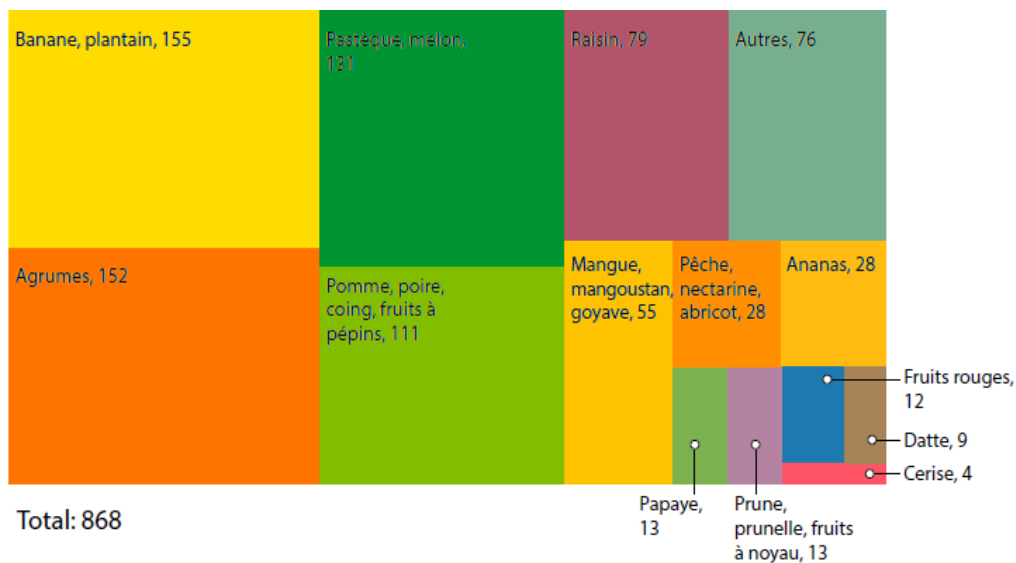


Figure 1 : Production mondiale des fruits en millions de tonnes en 2018 (FAO, 2021)

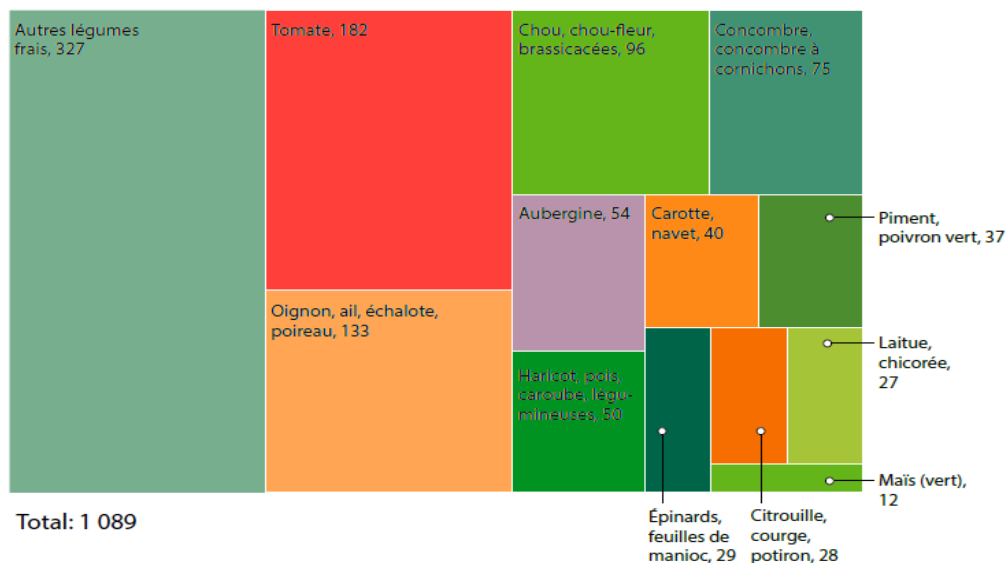


Figure 2 : Production mondiale des légumes en millions de tonnes en 2018 (FAO, 2021).

1.1.3.2. Différentes gammes de fruits et légumes

En raison de nombreuses contraintes, les filières intervenant dans le domaine ont recours à plusieurs techniques de conservation. Ainsi, les fruits et légumes frais et leurs préparations sont parfois classés en « gammes », en fonction du mode de conservation, des techniques d'élaboration et aussi du procédé de conservation. Ainsi, les produits alimentaires, et en particulier les fruits et légumes sont classés en 6 gammes.

- La **1^{ère} gamme** correspond aux fruits et légumes frais à l'état brut et n'ayant subi aucune transformation.
- La **2^{ème} gamme** concerne les produits de conserves ou semi-conserves généralement stockées à la température ambiante.
- La **3^{ème} gamme** représente les produits surgelés. Il s'agit des produits bruts ou élaborés conservés en dessous de -18 °C .
- La **4^{ème} gamme** concerne des fruits et légumes crus, frais et prêts à l'emploi. Il s'agit des produits crus, conditionnés **sous vide** ou sous atmosphère modifiée, conservés par réfrigération. Comme les salades en sachet, légumes épluchés prêts à cuire, jambons tranchés, etc...
- La **5^{ème} gamme (produits cuits sous vide)**, propose au consommateur des fruits et légumes pasteurisés ou stérilisés, conservés notamment sous chaîne du froid. Les pertes en amont et en aval de la transformation sont sensiblement les mêmes que pour la 4^{ème} gamme.
- La **6^{ème} gamme (produits déshydratés ou lyophilisés)**, il s'agit des aliments secs, généralement ionisés, de longue durée de conservation à température ambiante (Jeannequin *et al.*, 2015).

1.1.4. Fruits et légumes de quatrième gamme

1.1.4.1. Définition

Les fruits et légumes de la quatrième gamme sont des denrées alimentaires végétales qui ont été coupées, lavées, épluchées, coupées en petits morceaux, congelées, écrasées, ou pressées sans pasteurisation préalable ou mélangées (Jeannequin *et al.*, 2015). Ils sont conditionnés dans des barquettes et/ou films pouvant être mis ou non sous atmosphère gazeuse. Le challenge est de garder le produit frais sans perdre ses qualités nutritives et d'avoir une durée de vie assez importante pour permettre sa distribution. Ces produits offrent plusieurs avantages aux consommateurs, i) ils réduisent le temps de préparation et assurent une qualité régulière et

uniforme des plats préparés, ii) ils permettent de consommer des fruits et légumes de haute qualité nutritive, iii) requièrent moins d'espace pour être stockés et rangés et occasionnent moins de déchets. Le problème majeur est l'instabilité microbienne ainsi que les diverses altérations subies par le produit au cours du stockage. Leur durée de consommation limite (DLC) est généralement comprise entre 5 à 9 jours pour une conservation (optimale) à 4 °C, sans rupture de la chaîne du froid (Tirilly & Bourgeois, 1999 ; Varoquaux, 2002 ; Jeantet *et al.*, 2007).

1.1.4.2. Présentation de la filière des produits de 4^{ème} gamme

Le marché français des fruits et légumes frais élaborés était estimé, selon Eurostat, à 1,1 milliard d'euros en 2006 (prix sortie usine), tous circuits confondus. Sa croissance de 8,4 % en valeur en 2006 était supérieure à celle de l'alimentaire. Les évolutions étaient toutefois contrastées selon les segments, la croissance pour les fruits de 4^{ème} gamme était par exemple plus modérée. Cette filière doit s'adapter à un environnement en perpétuel changement. Les grandes modifications du paysage fruitier mondial entraînant la ré-organisation de l'hémisphère Sud autour de grands opérateurs internationaux. Les métiers de grossiste et d'importateur évoluent. C'est la grande distribution qui détient la clé de très nombreux marchés. En bout de chaîne, les consommateurs ont de nouvelles exigences en termes de praticité, santé, qualité, etc. Concurrencés par les produits transformés (du simple produit de 4^{ème} gamme aux produits ultra-frais, conserves et jus), les fruits et légumes frais tentent de maintenir leur part de marché. Les enjeux clés du marché sont aujourd'hui les suivants : contrer la dévalorisation causée par le développement de la politique d'innovation créatrice de valeur ajoutée et de ses « gammes économiques », proposer une gamme diversifiée en se positionnant sur les segments prometteurs du marché (fruits de 4^{ème} gamme, exotique, santé, etc.), cibler le développement à l'international en privilégiant l'Europe compte tenu des contraintes de DLC et des coûts logistiques (CTILF, 2016).

1.1.4.3. Consommation mondiale des produits de quatrième gamme

A la fin des années 90, on estime à environ 80 kg la quantité de végétaux crus prêts à l'emploi (VCPE) achetée pour 100 ménages par an, soit environ 0,5 % du volume total d'achat de fruits et légumes frais des ménages, hors pomme de terre (CTILF, 2016). Les salades représentaient à cette époque 93 % de l'offre de végétaux crus prêts à l'emploi, en volume comme en valeur. Entre 1998 et 2015, le volume acheté des végétaux crus prêts à l'emploi a connu jusqu'en 2005 une progression annuelle moyenne de 15 %. Depuis 2008, les ventes des

autres produits de 4^{ème} gamme se stabilisent tandis que celles des fruits et surtout des légumes de 4^{ème} gamme progressent notablement. Pour l'offre de fruits enregistrée, elle ne représentait que 0,2 % du volume total commercialisé en VCPE en 2004, soit 300 g de fruits prêts à l'emploi achetés par an pour 100 ménages. Aujourd'hui, ces achats sont de 13,4 kg pour 100 ménages. Quant à celle des légumes, ses ventes ont doublé entre 2010 et 2015 pour atteindre 23 kg pour 100 ménages. En 2015, la proportion des achats de VCPE représentait en volume 1,3 % du marché global des fruits et légumes frais, hors pomme de terre et 4 % en termes de dépenses réalisées par les ménages (Figure 3).

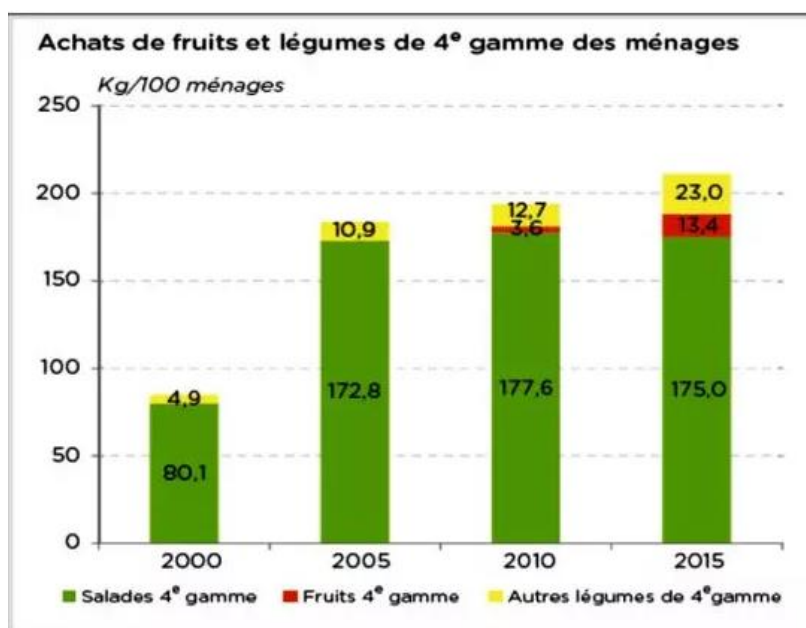


Figure 3 : Consommation des produits de quatrième gamme (CTILF, 2016)

1.1.4.4. Critères de qualité des salades de 4^{ème} gamme

Les salades de quatrième gamme sont des produits conçus pour répondre à la demande des consommateurs des produits exigeant très peu de préparation (Ayadi, 2013). La qualité du produit repose sur la combinaison de certaines propriétés organoleptiques (apparence, saveur, texture) à la valeur nutritive. L'apparence implique la taille, la forme, la couleur, et l'absence de défaut et de pourriture. La texture, quant à elle, inclut la fermeté, la jutosité, le croquant, le moelleux, le manque d'intégrité, la fuite du jus (cause principale de la baisse de qualité) ... La saveur prend en compte, le côté sucré, l'amertume, l'astringence, l'arôme... C'est une perception des goûts et des arômes de plusieurs composés. Généralement elle est influencée par leur contenu en sucre, en acide organique (acidité), en composés phénoliques (astringence) et en composés volatiles (arômes). La qualité nutritionnelle est relative aux sources de vitamines (vitamine C, vitamine A, etc.) de minéraux et de fibre (Tirilly & Bourgeois, 1999).

1.1.4.5. Conception des salades de 4^{ème} gamme

Différentes opérations unitaires résument les procédés de fabrication des produits de 4^{ème} gamme (CTILF, 2016). Ces opérations comprennent :

- ✓ la sélection d'une matière première fraîche de qualité, exempte de dégradations qui est un prérequis pour la maîtrise de la qualité sanitaire du produit ;
- ✓ le lavage qui permet de diminuer la charge microbienne et doit donc être réalisé en frottant le produit manuellement de manière minutieuse. Seule de l'eau potable peut être utilisée. Dans le cas où l'eau de lavage devient très vite sale, il convient de changer l'eau du bac et d'effectuer un second lavage des produits à l'eau potable ;
- ✓ l'étape de rinçage qui n'est obligatoire qu'en cas d'utilisation d'un auxiliaire technologique comme l'hypochlorite de sodium (eau de javel) dans un but de désinfection ;
- ✓ l'égouttage qui permet d'éliminer l'excès d'eau favorable au développement microbien ;
- ✓ les étapes de parage, épluchage et de coupe notamment. Il faut s'assurer de ne pas souiller les produits de plus en plus élaborés avec les déchets (principe de la marche en avant).

1.1.4.6. Conservation des salades de 4^{ème} gamme

Compte tenu des exigences, la réfrigération, associée à un emballage sous vide ou sous atmosphère modifiée, est le levier principal pour assurer leur conservation. La mise en place des techniques de conservation de la quatrième gamme implique une connaissance préalable des évolutions spontanées des produits, notamment de celles qui affectent la qualité marchande et sanitaire de l'aliment (Bernard de Raymond *et al.*, 2013). Cette détérioration diffère d'un végétal à un autre : brunissement des feuilles de salade, ramollissement des carottes râpées, fermentation des fruits découpés (Tirilly & Bourgeois, 1999). Ces différents changements ont lieu à cause de l'épluchage et de la découpe très fine du végétal. En effet, cela entraîne des perturbations au niveau du métabolisme du végétal, ce qui le rend plus périssable (Ayadi, 2013). Pour éviter ce phénomène, le produit doit être maintenu à l'intérieur d'un emballage qui permet de ralentir la sénescence des tissus végétaux et de contrôler le développement des micro-organismes d'altération (Tirilly & Bourgeois, 1999).

1.1.4.7. Conditionnement des salades de 4^{ème} gamme

L'emballage constitue une protection contre la perte d'humidité mais empêche la perception de l'odeur par l'acheteur. Les avancées technologiques actuelles ont permis d'avoir deux catégories d'emballages alimentaires : emballage passif et emballage actif (Ayadi, 2013).

1.1.4.7. 1. Emballage passif

L'emballage passif joue le rôle d'une barrière entre le produit et le milieu extérieur, et constitue donc une protection passive vis-à-vis de ce milieu. Il permet de ce fait une protection mécanique contre : le transfert de la quantité de mouvement, le transfert de matière, le transfert des liquides, le transfert des gaz, le transfert de l'énergie rayonnante et empêche une contamination par des microorganismes présents dans l'atmosphère (Multon, 1998).

1.1.4.7.2. Emballage actif ou intelligent

La tendance actuelle dépasse le rôle passif de l'emballage alimentaire en tant que barrière inerte entre l'aliment et le milieu extérieur, mais fait partie intégrante du processus de préparation et de conservation de l'aliment. Les technologies d'emballage actif font appel à des procédés physiques, chimiques ou biologiques qui modifient les interactions entre un emballage, un produit et/ou l'atmosphère du produit, afin d'obtenir les résultats souhaités (Yam *et al.*, 2005). Ainsi l'emballage passif a été amélioré conformément au règlement du parlement européen et du conseil N°1935/2004 du 27/10/2004: « les matériaux et objets actifs sont destinés à prolonger la durée de conservation ou à maintenir ou améliorer l'état de denrées alimentaires emballées. Ils sont conçus de façon à incorporer délibérément des constituants qui libèrent ou absorbent des substances dans les denrées alimentaires emballée ou dans l'environnement des denrées alimentaires » (Goossens, 2009). Cela permet d'obtenir de nouveaux emballages qui protègent mieux l'aliment.

L'emballage intelligent a une fonction informative, il complète l'information relative à la conservabilité (Goossens, 2009). Quant à l'emballage actif, c'est un conditionneur. Il conditionne l'air au sein de l'emballage afin de ralentir les processus de dégradation chimiques et de contrôler le comportement des microorganismes. Il s'agit entre autres de l'emballage sous atmosphère modifiée ou emballage sous vide (Goossens, 2009). Il est bon à noter que les emballages actifs ou intelligents peuvent être avantageux de point de vue technologique, économique ou environnementale (Goossens, 2009).

Dans le cas de conditionnement sous vide, l'air a été retiré au maximum dans le but d'augmenter la durée de conservation et ralentir le développement de certaines bactéries

Généralités

surtout les aérobies. Cependant, quelques bactéries anaérobies inoffensives peuvent survivre. Ces dernières acidifient superficiellement les aliments empêchant par la suite la prolifération d'autres bactéries comme *Listéria*. Le vide d'air ralentit aussi l'oxydation, empêche l'évaporation de l'eau et protège des contaminants externes. Un aliment sous vide se conserve entre une et 4 semaines selon le produit réfrigéré. Les premiers aliments à bénéficier de cette technique furent les arachides décortiquées, le café torréfié et moulu, mais ce procédé concerne désormais la viande, la volaille, les fruits de mer, les légumes et le fromage (Gorris & Peppelenbos, 1992).

Concernant atmosphère modifiée, c'est un conditionnement sous atmosphère modifiée (Modified Atmosphere Packaging ou MAP) qui constitue l'une des techniques récentes les plus répandues. Elle a été appliquée sur une gamme diversifiée de produits alimentaires dont les fruits et légumes (Bureau & Multon, 1989; Hong & Gross, 2001). Cette technique vise à prévenir la perte de fraîcheur et de qualité de l'aliment. Moyennant l'utilisation de gaz d'origine naturelle ainsi que de machines et de matériaux d'emballage appropriés, il est possible de conserver la qualité des produits et d'allonger leur durée de vie (Geeson *et al.*, 1985 ; Chitravathi *et al.*, 2015 ; O'Beirne *et al.*, 2015). Le mélange gazeux utilisé pour le MAP est constitué de gaz présents naturellement dans l'air tels :

- ✓ l'azote (N₂), inerte et stabilisant. Il sert essentiellement à chasser l'oxygène de l'emballage et par conséquent à prévenir l'oxydation des aliments. En raison de sa faible solubilité dans l'eau, l'azote empêche également le film d'emballage de s'affaisser sur le produit puisque le volume intérieur reste constant ;
- ✓ l'oxygène (O₂), aussi faible que possible afin d'empêcher la prolifération microbienne et de réduire le degré d'oxydation mais juste la quantité nécessaire pour la respiration cellulaire ;
- ✓ le dioxyde de carbone (CO₂), qui inhibe l'activité microbienne. Il est donc le gaz le plus important dans le MAP, la plupart des micro-organismes comme les moisissures et les bactéries aérobies les plus courantes sont très sensibles à sa présence mais il a moins d'influence sur les anaérobies (Geeson *et al.*, 1985 ; Chitravathi *et al.*, 2015 ; O'Beirne *et al.*, 2015).

La clé du succès du procédé MAP avec les produits frais est l'utilisation d'un film d'emballage approprié sous lequel règne une atmosphère protectrice en état d'équilibre. Des recherches menées en 2007 ont montré que le film operculé le plus adapté aux salades est

composé de polyamide orienté et de polyéthylène (OPA/PE). Quelques types des salades conditionnées sont illustrés sur la figure 4.



Figure 4 : Exemples de salades de 4^{ème} gamme (Anonyme, 2022)

1.1.4.8. Microflore de la salade prête à l'emploi (4^{ème} gamme)

1.1.4.8.1. Sources de contamination

Les denrées alimentaires végétales peuvent, à chaque étape de la chaîne alimentaire, être contaminées par des microorganismes et /ou par leur toxine provenant de plusieurs sources. La contamination peut être originelle ou survenir lors des processus de préparation de ces aliments (Gil *et al.*, 2015).

1.1.4.8.1.1. Principales voies d'introduction primaire

Lors de la production primaire, une contamination (croisée) peut se produire par le sol, les aérosols et la poussière (FAO/WHO, 2008a), les engrais, les boues d'épuration ou les amendements du sol et l'eau d'irrigation et d'arrosage (contaminée par des matières fécales) (Amorós *et al.*, 2010 ; Stine *et al.*, 2005).

En ce qui concerne l'irrigation et d'arrosage, l'origine, le type et la qualité de l'eau, le type de plante, la méthode et le type d'irrigation et d'arrosage ainsi que la période entre la dernière irrigation et la récolte jouent un rôle important dans la contamination des fruits et les légumes (Allende & Monaghan, 2015; SciCom, 2009 ; Uyttendaele *et al.*, 2015). Lors d'une inondation, selon la saison, les conditions météorologiques, l'emplacement, le type de plante et sa

destination, de potentiels dangers microbiologiques peuvent se présenter (Castro-Ibáñez *et al.*, 2015).

En cas d'utilisation d'engrais d'origine animale (lisier, fumier) sur des terres agricoles, il existe un risque de contamination des légumes par les microorganismes du sol. Le risque peut être scindé en deux phases, d'une part la transmission des pathogènes depuis l'engrais vers le sol lors de l'épandage de l'engrais et, d'autre part, la transmission de ces pathogènes aux légumes lors de la culture (Ongeng *et al.*, 2015).

1.1.4.8.1.2. Autres sources de contamination

- **Contamination pendant la récolte** : pendant la récolte, il peut se produire une contamination via les équipements, l'utilisation d'eau pour réhydrater les légumes fraîchement récoltés ou via l'eau utilisée pour rincer, transporter, trier ou refroidir les fruits et légumes (SciCom, 2017). Lors de la cueillette des fruits, les boîtes de fruits peuvent également être contaminés. Outre cela, une mauvaise hygiène du personnel peut également être la source d'une contamination (Heaton & Jones 2008), surtout lorsque les fruits et légumes sont récoltés manuellement (FAO/WHO, 2008a) et c'est surtout un facteur de risque pour la contamination par des virus humains (FAO/WHO, 2008b) tels les norovirus et le virus de l'hépatite A. Aussi, l'éclatement de fruits avant ou pendant la récolte représente un facteur de risque supplémentaire. Par des bactéries pathogènes (Jay, 1986).

- **Contamination pendant la transformation** : lors des processus de transformation minimale, il peut se produire une contamination (croisée) via l'eau de traitement (p. ex. eau de lavage ou eau de refroidissement), via les équipements et surfaces (par la formation de biofilm), via des transformateurs d'aliments (infectés) (principalement par des virus humains lors de nombreuses opérations manuelles) et lors de l'emballage. Lorsque la structure des légumes feuilles est modifiée par la découpe ou le morcellement comme c'est le cas avec les salades quatrième gamme, il peut se produire une internalisation due à un dégât mécanique, à l'application d'eau sous pression, à la mise sous vide ou au lavage (FAO/WHO, 2008a). L'eau de lavage peut, d'une part, être un moyen pour rincer ou réduire les dangers microbiologiques mais d'autre part, si sa qualité est insuffisante ou en cas de longue utilisation consécutive, elle peut être une source de contamination et potentiellement propager ou accumuler des dangers microbiologiques (FAO/WHO, 2008a).

- **Contamination lors de la distribution** : Lors de la distribution, du commerce de détail, du catering et dans un environnement domestique ou commercial, il peut se produire une

contamination (croisée) par contact direct ou indirect avec des aliments crus contaminés (d'origine animale), avec l'environnement, les équipements, les surfaces qui entrent en contact avec les aliments et les transformateurs d'aliments (infectés). Le refroidissement des produits empêche la multiplication et un emballage prévient l'exposition à la contamination (FAO/WHO, 2008a).

1.1.4.8.2. Altération microbiologique des salades de 4^{ème} gamme

1.1.4.8.2.1. Définition

La détérioration des aliments peut être définie comme un processus ou un changement qui rend un produit indésirable ou inacceptable pour la consommation. Ce phénomène est le résultat de l'action biochimique de plusieurs microorganismes. Il se traduit par une modification d'aspect, de texture, de consistance ou de flaveur de la denrée alimentaire ainsi que d'une diminution de la durée de conservation. La cause principale de détérioration des fruits et légumes est la prolifération de certaines bactéries et de certains champignons. Bien vrai que les fruits et légumes ont beaucoup d'éléments en commun, il y a aussi des différences qui déterminent le type de détérioration dont ils sont le plus sensible. Ainsi, les fruits qui sont pour la plupart plus acide favorisent le développement de certains champignons tel que les levures et les moisissures. Les légumes, par contre, sont moins acides et sont détériorés par les bactéries (Ife & Bas, 2003).

1.1.4.8.2.2. Facteurs de détérioration des salades de 4^{ème} gamme

Au niveau des salades prêtes à l'emploi, plusieurs facteurs favorisent l'entrée de ces microorganismes. En effet, les caractéristiques principales des fruits et légumes frais sont :

- la présence de surfaces coupées, abîmées ou de tissus végétaux endommagés ;
- le traitement minimum du produit n'assurant pas la stérilité ou la stabilité microbienne ;
- le métabolisme actif des tissus végétaux ;
- le confinement des produits (Nguyen-the & Carlin, 1994).

Ces caractéristiques sont propices à la pénétration et à la prolifération de divers microorganismes.

1.1.4.8.2.3. Microorganismes de détérioration des salades de 4^{ème} gamme

1.1.4.8.2.3.1. Flore fongique d'alteration

La flore fongique constitue un indicateur d'aspect défectueux dans les processus de fabrication (Becilla, 2009).

1.1.4.8.2.3.1.1. Levures

De leur nom étymologique « levare » faisant référence à la capacité de faire lever le pain en produisant du CO₂ en conditions anaérobiques et de fermenter le sucre, les levures sont des microorganismes eucaryotes, non-photosynthétiques, chimio-hétérotrophes, champignons à thalle unicellulaires immobiles, dissociés et bourgeonnant (Labrani, 2015). On distingue les levures utiles des levures d'altération. Les levures utiles fermentent le sucre en gaz carbonique ce qui permet la fabrication des produits tels que la bière ou le pain (Becilla, 2009). Celles dites d'altération induisent par des processus biochimiques, une modification des propriétés organoleptiques du produit. Les différents types de levures couramment rencontrés dans les fruits et légumes frais appartiennent à de nombreux genres : *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Torulasporea*, et *Saccharomyces* (Nguyen-the & Carlin, 1999).

1.1.4.8.2.3.1.2. Moisissures

Les moisissures sont des eucaryotes avec des noyaux typiques entourés d'une membrane et contenant des chromosomes. C'est d'ailleurs ce qui les différencie des bactéries qui sont des procaryotes avec un seul chromosome libre au sein de la cellule. Elles sont hétérotrophes, saprophytes et se développent sur des matériaux inertes tels que les papiers, bois et aliments. Les espèces couramment rencontrées sont du genre *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Epicoccum* et *Geotrichum* (Nguyen-the & Carlin, 1999).

1.1.4.8.2.3.2. Flore bactérienne d'altération

Les microorganismes psychrotrophes constituent une part importante de la microflore des fruits et légumes frais. Les germes aérobies mésophiles rencontrés sont pour la plupart des bactéries Gram négatif appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium* et *Alcaligenes* (Raviart, 1990). D'autres bactéries dites pectinolytiques ont été identifiées par de nombreux auteurs en tant qu'agents potentiels d'altération car elles constituent la principale cause de pourrissement. Les plus nombreux concernent les légumes peu transformés. Les bactéries pectinolytiques identifiées sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Cytophaga* spp. et *Erwinia* spp. Aussi, les bactéries lactiques de l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* sont fréquemment rencontrées sur les légumes (Nguyen-the & Carlin, 1999). Ces dernières modifient les sucres contenus dans les aliments pour leur donner un goût acide et aigre.

1.1.4.8.3. Pathogènes bactériens des salades de 4^{ème} gamme

La détérioration de l'aliment n'est pas la seule menace quant à la présence des microorganismes dans une denrée alimentaire. D'autres germes alimentaires dits « pathogènes » représentent un danger potentiel pour le consommateur car ils sont la cause principale de plusieurs maladies d'origine alimentaire (Dubois-Brissonnet & Guillier, 2020). Ces contaminants peuvent être originels (les lieux de culture, la terre, les intrants, l'eau d'irrigation, etc.) ou provenir des manipulateurs malades ou porteurs sains de micro-organismes pathogènes (Schiffers & Moreira, 2011). La conception des salades prêtes à l'emploi passe par plusieurs étapes de manipulation et demande un traitement sans effet léthal sur les tissus végétaux (Desbordes, 2003). Ces facteurs favorisent la prolifération de plusieurs microorganismes pouvant causer deux catégories de maladies d'origine alimentaire : les maladies infectieuses et les intoxications (Dubois-Brissonnet & Guillier, 2020). Cette pathogénicité peut être de type invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir des foyers infectieux), et/ou de type toxigènes (capacité à produire des toxines) entraînant ainsi trois types de maladies d'origine alimentaire : toxi-infection alimentaire.

1.1.4.8.3. 1. *Escherichia coli*

1.1.4.8.3. 1. 1. Taxonomie

Également appelée colibacille, *Escherichia coli* est une bactérie intestinale des mammifères dont elle compose 80 % de la flore intestinale aérobie (Tenaillon *et al.*, 2010). Cette bactérie fut découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres. Dans la nomenclature LPSN « The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature », l'espèce est classée de la manière suivante (Boone *et al.*, 2012) :

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Proteobacteria
Classe :	Gamma Proteobacteria
Ordre :	Enterobacteriales
Famille :	Enterobacteriaceae
Genre :	<i>Escherichia</i>
Espèce :	<i>Escherichia coli</i>

1.1.4.8.3.1.2. Habitat

Escherichia coli a pour hôte premier le microbiote intestinal de l'humain et des animaux homéothermes (Tenaillon *et al.*, 2010; Gordon & Cowling, 2003). Elle est présente à des concentrations supérieures à 10^6 UFC (Unité Formant Colonie)/g de contenu intestinal (Khadir & Mokhtari, 2019). Elle demeure très souvent dans le mucus recouvrant les cellules épithéliales de la paroi du tube digestif qui constitue une niche écologique favorable pour son développement de par ses conditions de température, d'humidité et de disponibilité en nutriments (Smati *et al.*, 2015).

L'environnement constitue son habitat secondaire. La bactérie y est rejetée à travers les fèces à une concentration d'environ 10^8 UFC/g de fèces. Elle se retrouve dans les eaux environnementales par le biais des effluents, tels que les eaux usées, les lisiers ou les fumiers des animaux d'élevage ou par les déjections des animaux d'élevage ou des animaux sauvages (Smati *et al.*, 2015). Contrairement à leur habitat primaire, le milieu environnemental est plutôt défavorable à leur survie (Darcan *et al.*, 2009).

1.1.4.8.3. 1. 3. Caractères morphologiques

E. coli est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 μm de long sur 0,4 à 0,6 μm de large. Elle est fine et allongée à extrémités arrondies, mobile grâce à une ciliature péritriche. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (Neidhardt & Curtiss, 1996).

1.1.4.8.3. 1. 4. Caractères cultureux

Les souches de *E. coli* se développent en 24 h à 37 °C sur les milieux gélosés en donnant des colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang, elles peuvent être hémolytiques (Yahia, 2016). Elles deviennent vert métallique sur gélose EMB (Eosin Methylene Blue Agar) et rose sur le milieu MacConkey.

1.1.4.8.3. 1. 5. Caractères biochimiques

Escherichia coli est une bactérie de la famille des Enterobacteriaceae ne possédant pas de désaminase. A la différence des genres tels que *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* et *Serratia* (typiquement groupe des KEHS, ex-tribu des Klebsielleae), elle fermente le glucose par la voie des acides mixtes (rouge de méthyle +, VP -). De plus, elle produit de l'indole à partir du tryptophane et ne produit pas d' H_2S . Elle est aussi incapable d'assimiler le citrate comme seule source de carbone en aérobiose (Benabdallah-Khodja & Yahia, 2016).

1.1.4.8.3.1.6. Pathogénicité

Les bactéries constituant l'espèce *E. coli* sont présentes dans la flore intestinale de l'homme et des animaux. Cette espèce, était reconnue comme un cohabitant normal non pathogène. Cependant, certaines souches peuvent induire des maladies. *E. coli* est donc considéré comme un organisme pathogène potentiel actuellement. Les souches pathogènes peuvent provoquer des syndromes pathologiques distincts comme différentes maladies gastro-entériques, infections de plaies, méningites, septicémies, athérosclérose, syndrome hémolytique et urémique et maladies immunologiques telles que les maladies réactives et rhumatismales (Olsvik *et al.*, 1991 ; Kuhnert *et al.*, 2000 ; Ekici & Dümen 2019). Certaines souches de *E. coli* productrices d'entérotoxines sont divisées en deux groupes : les thermostables et les thermolabiles. La toxine thermostable est connue sous le nom de toxine stable (ST) et la toxine thermolabile est appelée toxine labile (LT). Les deux toxines peuvent être trouvées ensemble ou séparément. De plus, il présente des taux de mortalité dans les cas de méningite néonatale variant entre 15 et 40 %, et 50 % des survivants continueraient à vivre avec des lésions neurologiques (Vernozy-Rozand *et al.*, 2004). Concernant les facteurs de virulence, les cinq (5) principaux pathotypes de *E. coli* diarrhéogènes d'origine alimentaire se présentent comme suit : *E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* producteur de toxine de Shiga / *E. coli* entérohémorragique (STEC/EHEC), Shigella / *E. coli* entéroinvasif (EIEC), *E. coli* entéroagrégatif (EAEC) et *E. coli* entérotoxique (ETEC) (Yang *et al.*, 2017). Parmi ces pathotypes de *E. coli*, les *E. coli* porteurs du gène stx produisent des toxines de Shiga (Stx) et sont définies comme des *E. coli* producteurs de shiga-toxines (STEC). STEC est également connu sous le nom de *E. coli* producteur de vérocytotoxine (VTEC). Les infections à STEC sont principalement d'origine alimentaire avec des aliments tels que le bœuf haché insuffisamment cuit, le lait cru, la salade, les poireaux et pommes de terre crus, les légumes, les fruits, et d'autres aliments impliqués dans les épidémies (Feng, 2014 ; Herman *et al.*, 2015). Les symptômes de l'infection par les STEC chez l'homme sont les suivants : larmolement, diarrhée, syndrome hémolytique et urémique (SHU), fièvre, crampes abdominales et vomissements. Il existe de nombreux sérotypes de STEC tels que O26, O111, O121 et O157, dont le sérotype O157:H7 est le plus souvent impliqué dans les intoxications alimentaires.

1.1.4.8.3. 2. Salmonelles

1.1.4.8.3.2.1. Taxonomie

Les salmonelles sont des bactéries découvertes dès 1884 par Theobald Smith, un pionnier américain en épidémiologie, bactériologie et en anatomopathologie qui travaillait sous la

Généralités

direction de Salmon au *Bureau of Animal Industry* (BAI). Des travaux de taxonomie sur hybridation de l'ADN indiquent que le genre *Salmonella* comporte deux espèces (*bongori* et *enterica*). La principale espèce, *Salmonella enterica*, longtemps considérée comme la seule, comprend six sous-espèces, la plus fréquente étant *Salmonella enterica subsp. enterica*. Cette dernière est subdivisée en de nombreux sérovars. Actuellement, plus de 2 600 sérovars (ou sérotypes) sont décrits (Grimont *et al.*, 2000). Le genre *Salmonella spp.* est décrit comme suit :

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Proteobacteria
Classe :	Gamma Proteobacteria
Ordre :	Enterobacteriales
Famille :	Enterobacteriaceae
Genre :	<i>Salmonella</i>

1.1.4.8.3. 2. 2. Habitat

Les salmonelles sont des pathogènes intestinaux présents dans les intestins de l'homme et des animaux, leur réservoir principal. Elles peuvent survivre plusieurs semaines en milieu sec et plusieurs mois dans l'eau. La contamination par les excréments d'animaux porteurs est très importante. Aussi, les vertébrés aquatiques, notamment les oiseaux (Anatidae) et les tortues sont d'importants vecteurs de salmonelles. Ainsi, grâce à leur capacité de survie, elles peuvent persister dans des réservoirs secondaires comme les boues d'épuration (Sahlström *et al.*, 2006), les aliments d'origine animale (Haeghebaert *et al.*, 2001) ou végétale (Kirk *et al.*, 2011).

1.1.4.8.3.2.3. Caractères morphologiques

Les salmonelles sont des bacilles dont la taille des bâtonnets est de 2 à 5 µm de longueur avec un flagelle de 0,7 à 1,5 µm de diamètre (Moreno *et al.*, 2009).

1.1.4.8.3. 2. 4. Caractères cultureux

Après incubation à 37 °C pendant 24 h sur un milieu ordinaire de pH compris entre 6,5 à 7,5, les colonies obtenues ont un diamètre de 2 à 4 mm, exception faite de certains sérovars qui donnent toujours des colonies naines telles que : *S. abortusovis* et *S. abortuse*. A l'isolement, les colonies sont blanchâtres, circulaires, limitées par un bord régulier, légèrement bombées, translucides, généralement lisses, rarement rugueuses (Bourgeois *et al.*, 1996).

1.1.4.8.3.2.5. Caractères biochimiques

Les salmonelles sont des entérobactéries Gram-négatif, non sporulant, mobiles grâce à des flagelles péritriches à l'exception de sérovars aviaires : *S. Gallinarum* et *S. Pullorum* (Andino & Hanning 2015). Les caractères permettant l'identification biochimique des salmonelles sont l'absence d'uréase, de lysine désaminase, mais également l'absence de production d'indole. Les salmonelles réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, et fermentent le glucose avec ou sans production du gaz. Cependant, elles ne fermentent ni le lactose ni le saccharose. Elles produisent aussi H₂S à partir du thiosulfate et la réaction au test à l'oxydase est toujours négative (Korsak *et al.*, 2004).

1.1.4.8.3.2.6. Pouvoir pathogène

Les salmonelles provoquent deux types de maladies : des gastro-entérites par intoxication alimentaire (salmonellose), et des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Elles possèdent un génome sous la forme d'un chromosome de près de 5 millions de paires de bases, qui code pour environ 4500 protéines. On connaît aujourd'hui plus de 2000 sérotypes de salmonelles, mais une minorité est responsable de la majorité des maladies humaines à salmonelles. Les sérotypes, *typhimurium* et *enteritidis* sont impliqués dans les gastro-entérites, alors que les sérotypes *typhi* et *paratyphi* sont impliqués dans les fièvres (Bornert, 2000). Les premiers sont confinés au système digestif, alors que les seconds sont capables de traverser la barrière intestinale pour coloniser les tissus lymphoïdes. Les endotoxines synthétisées par les salmonelles sont responsables de leur pathogénicité. On estime à 1,3 milliard le nombre de cas annuels de gastro-entérite et à 3 millions le nombre de décès par année attribuables à *Salmonella* non typhique (Murray *et al.*, 2007 ; Chimalizeni *et al.*, 2010). Dans les pays industrialisés où l'on note de faibles taux de complications invasives, le taux de mortalité lié à *Salmonella* non typhique est inférieur à 1 %, ce qui n'est pas le cas pour les pays en développement où le taux de mortalité peut atteindre 24 % (Chimalizeni *et al.*, 2010). Quant à la fièvre entérique, plus connue sous le nom de « fièvre typhoïde », elle se manifeste sous plusieurs formes (symptômes) : fièvre, maux de tête, une bradycardie, une éruption cutanée rose pâle sur l'abdomen et la poitrine, une anorexie, des douleurs abdominales, des myalgies, une sensation de malaise, une diarrhée (plus fréquente chez les enfants) ou une constipation (plus fréquente chez les adultes), une hépatosplénomégalie, un iléus segmentaire, un méningisme et des manifestations neuropsychiatriques (Ryan & Ray, 2004 ; Bronze & Greenfield, 2005). Dans certains cas, la fièvre peut conduire à de graves complications (chez 3 % des patients) caractérisée par une hémorragie causée par des perforations de la paroi de l'iléon terminal ou du côlon proximal

(Ryan & Ray, 2004 ; Bronze & Greenfield, 2005). D'après les chiffres de l'OMS, 17 millions de cas et plus de 500 000 décès sont dus chaque année à la fièvre typhoïde (Chimalizeni *et al.*, 2010). Les *Salmonella* sont donc des bactéries dangereuses, responsables d'un grand nombre de troubles d'origine alimentaire, elles ne doivent de ce fait, pas être présentes dans un aliment. Il est important de mentionner qu'à une dose plus faible, elle peut aussi infecter les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (Agence de la santé publique du Canada, 2012).

1.1.4.8.3.3. *Staphylococcus aureus*

1.1.4.8.3.3.1. Taxonomie

La famille des Staphylococcaceae regroupe plusieurs genres de Cocci Gram positifs de l'ordre des Bacillales, incluant les Staphylocoques. Plus d'une vingtaine d'espèces de staphylocoques sont actuellement identifiées, dont l'espèce principale est *Staphylococcus aureus* parfois appelé Staphylocoque doré. La classification de l'espèce *S. aureus* selon la *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) est le suivant (Prescott *et al.*, 2010) :

Règne :	Bacteria
Phylum :	Firmicutes
Classe :	Bacilli
Ordre :	Bacillales
Famille :	Staphylococcaceae
Genre :	<i>Staphylococcus</i>
Espèce :	<i>Staphylococcus aureus</i> .

1.1.4.8.3. 3. 2. Habitat

Staphylococcus aureus est un commensal, occasionnel ou permanent de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin) qui semblent constituer le principal réservoir de ce germe, secondairement localisé dans la nature (Breche *et al.*, 1988). La présence de *S. aureus* dans l'environnement est essentiellement due à une contamination par l'Homme ou par les animaux (Bergdoll, 1979 ; Breche *et al.*, 1988).

1.1.4.8.3.3.3. Caractères Morphologique

Les staphylocoques sont des coques Gram positif arrondies de 0,7 à 1 µm de diamètre. Ils sont immobiles, dépourvus de spores et présentent une capsule. Ils apparaissent le plus souvent en amas dits en grappes de raisin (Eveillard, 2007). Les amas sont particulièrement nets dans des préparations faites à partir de cultures sur milieux solides. On retrouve les

staphylocoques en amas irréguliers de bactéries ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres). Ces petits amas forment souvent des grappes et c'est grâce à l'examen direct que la bactérie a été nommée par Ogston (1884). La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais, ils peuvent perdre leur capsule après culture (Robert, 2013).

1.1.4.8.3.3.4. Caractères cultureux

In vitro, *S. aureus* est une bactérie non-exigeante car elle pousse aisément sur les milieux usuels (Eveillard, 2007). On observe en milieu liquide un trouble uniforme et sur une gélose des colonies rondes, lisses, dorées (*S. dorés* ou *S. aureus*), opaques, atteignant 2 à 3 mm de diamètre (ou un enduit confluent si l'ensemencement est massif). Ils sont catalase positifs et oxydase négatifs, aérobies - anaérobies facultatifs, fermentant le glucose sans gaz. Certaines de ces propriétés sont mises à profit dans les préparations de milieux sélectifs permettant l'isolement à partir de produits polycontaminés. Le milieu de Chapman, par exemple, inhibe le développement de nombreux contaminants par sa teneur en NaCl (7,5 %) et permet de reconnaître les colonies de staphylocoques dorés par la fermentation du mannitol. Le milieu de Baird et Parker contient notamment du tellurite (la réduction de ce sel par le *S. doré* donne aux colonies une coloration noire). Elle peut être aussi cultivée en milieu gélosé classique tel que CBA (Columbia Blood Agar), TSA (Tryptic Soy Agar) ou BHI (Brain Heart infusion), ainsi que dans les milieux liquides correspondants (Accarlas, 2014). *S. aureus* se développe entre 10 et 42 °C avec une température optimale de 37 °C et un pH compris entre 7,4 et 7,6 (Nandy *et al.*, 2013).

1.1.4.8.3.3.5. Caractères biochimiques

Staphylococcus aureus a un métabolisme aérobie prédominant et un métabolisme anaérobie facultatif. Ces bactéries possèdent une activité catalase, coagulase, phosphatase, ainsi que des nucléases thermostables mais pas d'oxydase (Nandy *et al.*, 2013). Elles sont hémolytiques, ont la capacité de liquéfier la gélatine et de fermenter de nombreux sucres comme le glucose, le saccharose, le lactose et le mannitol (Accarlas, 2014). Ce qui caractérise mieux l'espèce est la production d'une staphylo-coagulase récepteur au fibrinogène (RF), d'une protéine A et d'une thermonucléase ou DNase thermostable. Elle est aussi capable de dégrader le mannitol sur la gélose Chapman (Fauchere & Avril, 2002).

1.1.4.8.3.3.6. Pouvoir pathogène

Le staphylocoque doré (*S. aureus*) est un pathogène opportuniste pouvant causer chez les humains des infections très polymorphes, allant d'infections cutanées bénignes tels que les

furuncles et les panaris à des maladies mortelles comme les endocardites, les pneumonies, les infections du système nerveux central (Bezzar, 2014). Cette bactérie est l'une des principales causes de toxi-infections alimentaires, résultant de la consommation d'aliments contaminés par des entérotoxines (Le Loir *et al.*, 2003). En effet, l'espèce *Staphylococcus aureus* produit de nombreuses toxines dont les SE produites par certains *S. aureus* (ceux portant les gènes de ces toxines) et qui sont responsables d'épidémies liées à cette bactérie (Anses, 2011). À ce jour, 21 sérotypes différents (SEA à SEE, SEG à SEV) ont été décrits. Ces toxines, si elles sont présentes en quantité suffisante dans l'aliment, peuvent déclencher les symptômes de l'intoxication (Anses, 2022). L'intoxication alimentaire par les staphylocoques se caractérise par une apparition brutale de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales, de crampes et de diarrhée. Les symptômes disparaissent habituellement après 24 h (Le Loir *et al.*, 2003). Des affections cutanées peuvent être causées par ces toxines exfoliatives : phlyctènes, perte cutanée, papules, furuncles, impétigo, folliculite, abcès, piètre contrôle thermique, perte de liquide et infection secondaire (Murray, 2003 ; Fridkin *et al.*, 2005 ; Eisenstein, 2008).

1.1.4.8.3.4. Bactérie psychrotrophe (*Listeria monocytogenes*)

Les bactéries psychrotrophes sont des bactéries capables de s'adapter et de se développer aux températures proches de 0 °C. Ce sont des germes limitant de la conservation alimentaire par réfrigération. Certaines bactéries psychrotrophes peuvent être responsables de TIA. C'est le cas de *Listeria monocytogenes* qui occupe une place prépondérante dans ce groupe (Nahdi, 2016).

1.1.4.8.3.4.1. Taxonomie de *Listeria monocytogenes*

En 1926, Murray, Webb et Swann isolèrent un petit bacille à Gram positif du sang de lapins atteints d'une mononucléose sanguine qu'ils nommèrent *Bacterium monocytogenes*. La même bactérie fut aussi isolée par Pirie à partir de gerbilles sauvages infectés. Ce dernier proposa le nom de *Listerella* pour le genre en honneur au chirurgien « Lord Lister ». Ensuite, Murray et Pirie réalisèrent qu'ils avaient isolé la même espèce bactérienne. Ainsi, ils décidèrent de combiner les noms pour former *Listerella monocytogenes* qui sera changé pour des raisons de taxonomie en *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940). Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium*, avec *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Brochothrix* et *Bacillus* (Dumas, 2007). *Listeria* fait partie des Listeriaceae. Cette position, au sein des bactéries à Gram positif est devenue évidente avec les résultats de la taxonomie numérique, puis s'est imposée sans ambiguïté avec ceux du séquençage de l'ARN ribosomique

Généralités

(Larpent, 2000). Le genre *Listeria* compte 20 espèces dont *Listeria monocytogenes* (Orsi & Wiedmann, 2016). Sa classification systématique est la suivante :

Règne :	Bacteria
Phylum :	Firmicutes
Classe :	Bacilli
Ordre :	Bacillales
Famille :	Listeriaceae
Genre :	<i>Listeria</i> (Pirie, 1940)
Espèce :	<i>Listeria monocytogenes</i> (Pirie, 1940)

1.1.4.8.3.4.2. Habitat

Listeria est une des bactéries ubiquistes qu'on trouve presque partout ; dans le sol, en épiphyte sur les végétaux, l'eau, etc. Très résistantes, elle peut survivre aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister dans les ateliers de production de l'industrie agroalimentaire. *Listeria monocytogenes* a été isolée dans de nombreux organismes, notamment des humains et d'autres mammifères, des poissons, des crustacés et des insectes (Krauss *et al.*, 2003).

1.1.4.8.3.4.3. Caractères morphologiques

Listeria monocytogenes est un bacille à Gram positif qui se présente sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5-2,0 µm de longueur sur 0,4-0,5 µm de diamètre, aux extrémités arrondies, associés parallèlement, ou en courtes chaînes, ou en paires sous forme de V (Low & Donachie 1997 ; Acha, & Szyfres, 2003). Dans les cultures âgées et en milieux carencés, des filaments de 6 à 20 µm peuvent se former. La bactérie n'est ni capsulée ni sporulée. Elle est mobile par des flagelles péritriches quand elle est cultivée à 20-25 °C, et immobile ou faiblement mobile à 37 °C (Afssa, 2005).

1.1.4.8.3.4.4. Caractères cultureux

Listeria monocytogenes est une bactérie ubiquiste, très largement répandue dans l'environnement. C'est une bactérie non-exigeante qui peut être cultivée sur les milieux nutritifs classiques. Toutefois, elle ne se développe pas dans des milieux carencés en fer. En effet, l'apport de citrate de fer et d'esculine stimule sa croissance (Dumas, 2007). En outre, cette

Généralités

espèce bactérienne à une incroyable capacité à croître dans une large gamme de températures et notamment aux températures de réfrigération. En effet, sa croissance est démontrée expérimentalement entre -2 et $+45$ °C (Augustin *et al.*, 1999). Son optimum de croissance est compris entre 30 et 37 °C. Par contre, à 60 °C, *L. monocytogenes* est rapidement détruite, ce qui fait qu'elle n'est pas considérée comme un germe thermorésistant (Bréand *et al.*, 1998). Toutefois, certains prétraitements thermiques peuvent influencer sa thermotolérance (Pagán *et al.*, 1997).

1.1.4.8.3. 4. 5. Caractères biochimiques

Listeria est une bactérie aérobie, micro-aérophile et anaérobie facultative. Il fermente sans gaz de nombreux glucides : glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, trehalose, gentobiose, D-arabitol. Les germes de ce genre sont catalase-positifs, oxydase-négatifs et hydrolysent l'esculine. Les caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont présentés dans le tableau II. Ceux permettant de différencier les espèces de *Listeria* sont consignés dans le tableau II (Dumas, 2007).

Tableau II: Caractères biochimiques du genre *Listeria*

Réactions positives	Réactions négatives
Mobilité à 22 °C	
Catalase	Oxydase
Acidification du glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol	Production de gaz lors de la fermentation du glucose
Rouge de Méthyle/Voges-Proskauer	Uréase (Hydrolyse de l'urée)
Hydrolyse de l'esculine	Production d'Indole
Type respiratoire : aéro-anaérobie	Gélatinase (Hydrolyse de la gélatine)
Réduction du lait tournesolé	Production d'H ₂ S

1.1.4.8.3.4.6. Pouvoir pathogène

La seule espèce de *Listeria* reconnue comme un pathogène avéré pour l'homme est *L. monocytogenes*. Elle est capable de franchir la barrière intestinale et la barrière placentaire pour pénétrer le système nerveux central. C'est une bactérie intracellulaire qui peut notamment envahir les cellules épithéliales et les macrophages et s'y multiplier, la mettant à l'abri du système immunitaire (Dumas, 2007). La maladie qui en résulte est la listériose, une infection

Généralités

atypique, que l'homme contracte principalement par voie alimentaire (Bornert, 2000). Suite à l'ingestion d'un aliment contaminé, *L. monocytogenes* se retrouve dans les cellules phagocytaires de la *lamina propria*. La dissémination se fait par voie lymphatique et sanguine et permet à la bactérie d'atteindre le foie et la rate. Lorsque l'individu possède un bon système immunitaire, *L. monocytogenes* est rapidement éliminée d'où la rareté des cas de listériose comparée à la fréquence des aliments contaminés. De plus, il a été montré que des lymphocytes T dirigés contre des antigènes de *Listeria* étaient couramment retrouvés chez des personnes en bonne santé (Munk & Kaufmann 1988), ce qui pourrait s'expliquer par une stimulation courante du système immunitaire par *L. monocytogenes* fréquemment présente dans les aliments. Il semblerait donc que chez les individus en bonne santé, l'ingestion d'une faible dose de *L. monocytogenes* ne ferait que stimuler le système immunitaire.

Chez les personnes immunodéprimées par contre, si la dose ingérée est trop élevée, l'infection peut ne pas être stoppée par le système immunitaire. Elle va plutôt entraîner une prolifération importante dans le foie, entraînant le largage de bactéries dans la circulation sanguine. Ceci peut causer une septicémie, la colonisation du système nerveux central ou du placenta. Ces formes cliniques de listériose se présentent dans 80 % des cas chez des personnes avec une déficience de l'immunité à médiation cellulaire : nouveau-né, vieillard, femme enceinte ou personnes atteintes de maladies immunosuppressives (Bornert, 2000). Chez la femme enceinte, elle se traduit par un épisode fébrile, le plus souvent spontanément résolutif en quelques jours. Une remontée fébrile au moment du travail peut suivre une plus ou moins longue période d'apyrexie. Elle peut aussi passer inaperçue pour la mère et entraîner la contamination du fœtus (listériose foeto-maternelle) ou de l'enfant lors de l'accouchement (listériose néonatale). La bactérie infecte l'enfant par voie hématogène transplacentaire, entraînant mort in utero, avortement, fausse-couche ou accouchement prématuré selon le stade de la grossesse (Dumas, 2007). Chez les adultes ou les immunodéprimés, le cas le plus fréquent est la listériose invasive. Elle se manifeste à travers une bactériémie (endocardite, infections focales), une listériose neuro-meningée (méningite, méningo-encéphalite), une encéphalite et rarement des abcès cérébraux (Afssa, 2005). Il y a aussi la listériose non invasive qui se manifeste par des gastro-enterites et la listériose cutanée (McLauchlin & Low, 1994). C'est une infection rare comparée aux autres maladies transmises par les aliments, puisqu'elle a une incidence de 2 à 10 cas par million d'habitants par an (Dumas, 2007). Elle évolue généralement sous forme de cas sporadiques mais plusieurs épidémies ont été décrites (Larpen, 2000). *Listeria* avait été notamment à l'origine d'une série d'intoxications entre octobre 1999 et février

2000 qui avait touché 23 personnes, et aboutissant à 7 décès en France. Les voies d'infection de *L. monocytogenes* chez l'homme sont présentées sur la figure 5.

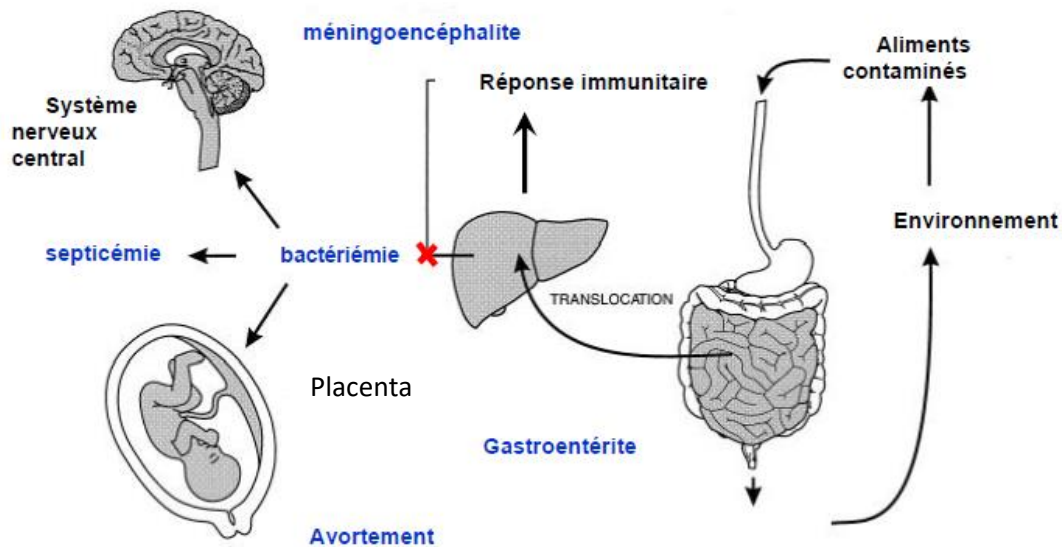


Figure 5 : Voies d'infection de *Listeria monocytogenes* chez l'homme (Vázquez-Boland et al., 2001)

1.1.4.8.4. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un enjeu de santé publique majeur. Elle est en augmentation depuis plusieurs décennies, engendrant des difficultés à traiter les patients. Elle entraîne une augmentation de la durée des soins et de la morbidité associée aux infections et peut remettre en cause le pronostic vital (Lai, 2013).

1.1.4.8.4.1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique est défini comme toute substance chimique produite par des microorganismes ayant le pouvoir d'inhiber et même de détruire les bactéries, les champignons et les virus. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre. Plus un antibiotique détruit des types de bactéries différentes, plus son spectre est large. Les antibiotiques sont caractérisés par leur :

- activité antibactérienne (spectre d'activité) ;
- toxicité sélective (mode d'action) ;
- activité en milieu organique (pharmacocinétique) ;
- bonne absorption et diffusion dans l'organisme (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

Il existe des antibiotiques d'origines naturelle ou synthétique

1.1.4.8.4.2. Origine des antibiotiques

1.1.4.8.4.2.1. Origine naturelle

Parmi les 10 000 antibiotiques d'origine naturelle recensés dans le monde, 20 % proviennent de champignons *Penicillium*, *Cephalosporium* et *Aspergillus*, 70 % proviennent d'actinomycètes microfilaments dont le genre *Streptomyces* est un producteur majeur d'antibiotiques (tétracyclines, aminoglycosides) et 10 % proviennent des bactéries (non actinomycètes), en particulier des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. La bacitracine utilisée pour certains traitements locaux en est un exemple (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

1.1.4.8.4.2.2. Origine synthétique

Les antibiotiques synthétiques sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des substances primitivement extraites de microorganismes. Parmi les antibiotiques d'origine synthétique figurent les sulfamides, métronidazole, isoniazide, acide nalidixique et les fluoroquinolones, les pénèmes. On distingue aussi des antibiotiques d'origine semi synthétique. Ils sont obtenus en modifiant en laboratoire une substance produite par un microorganisme (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

1.1.4.8.4.3. Effets des antibiotiques

En fonction de leur concentration et du temps de contact avec les bactéries, les antibiotiques peuvent être bactéricides ou bactériostatiques.

L'effet bactéricide est associé à un antibiotique qui tue définitivement les bactéries (dose forte).

L'effet bactériostatique concerne une substance qui bloque la croissance bactérienne (faible dose) (Konaté, 2005).

1.1.4.8.4.4. Sites d'action des antibiotiques

Les antibiotiques visent une cible spécifique de la cellule bactérienne, présentant ainsi une toxicité sélective, c'est-à-dire, qu'aux doses utilisées, ils n'affectent que certaines bactéries et non pas l'hôte infecté. Les principaux mécanismes d'action que l'on peut rencontrer diffèrent selon la molécule considérée. Ainsi, les antibiotiques peuvent agir, entre autres, sur : (1) la paroi bactérienne ; (2) la membrane interne ; (3) le génome bactérien ; (4) la synthèse protéique ; ou (5) la synthèse des folates (Figure 6) (Lai, 2013).

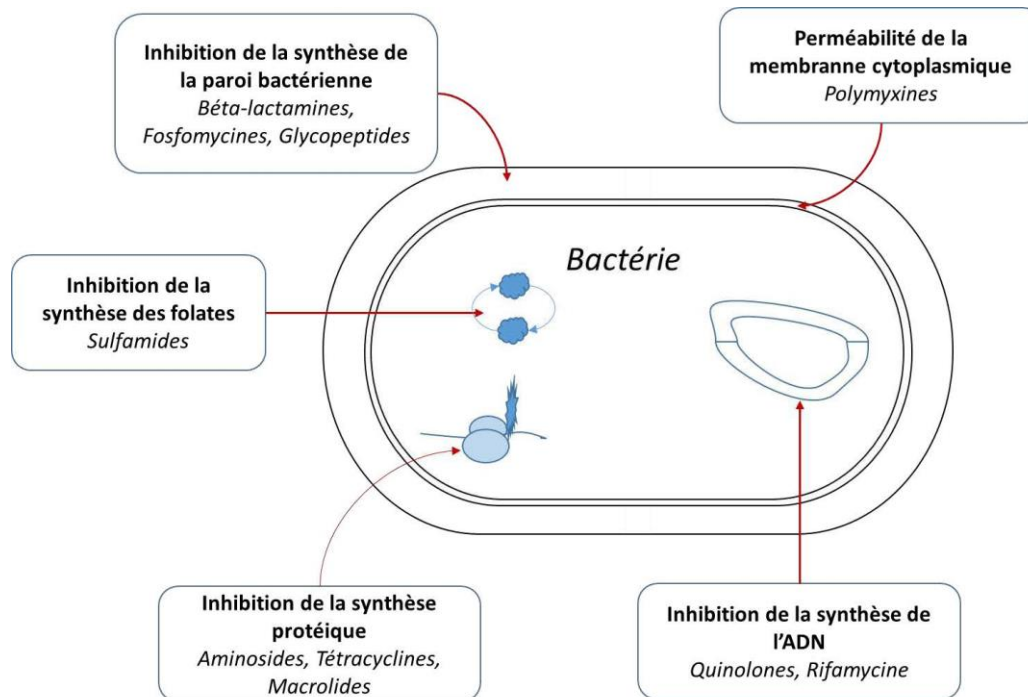


Figure 6 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Lai, 2013)

1.1.4.8.4.5. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés suivant leur structure de base, leur mécanisme d'action, leur activité et leurs propriétés pharmacologiques. On distingue :

- Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane comme les Bêtalactamines composés des Pénicillines, Céphalosporines et des Oxacephème et Monobactame
- Inhibiteurs des Bêtalactamases, il s'agit entre autres de l'acide clavulanique, tazobactame et sulbactame, Fosfomycines et Glycopeptides.
- Antibiotiques alternant les membranes de l'enveloppe bactérienne, ce sont les Polymixines, Bacitracine et Tyrothricine.
- Antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques, ce sont les Aminosides, les Macrolides-Lincosamides-Streptogramides (MLS), les Phénicolés et l'Acide fusidique.
- Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques : ils concernent les Quinolones composés des quinolones de 1^{ère} génération composées et des quinolones de 2^{ème} génération ou Fluoroquinolones, des Nitro-imidazoles, des Nitrofurannes, des Rifamycines.
- Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates qui sont composés des Sulfamides et des Diaminopyrimidines.

- Antituberculeux qui sont des médicaments utilisés dans le traitement de la tuberculose. Ce sont Rifampicine, Isoniazide, Pyrazinamide, Streptomycine, Ethambutol, Thiacetazone.
- Antifongiques composés d'Amphotéricine B, de Nystatine et de Griséofulvine (Konaté, 2005; CUCL, 2003).

1.1.4.8.4.6. Origine et types de résistances bactériennes aux antibiotiques

1.1.4.8.4.6.1. Origine des résistances bactériennes aux antibiotiques

Dès le début de l'utilisation clinique des antibiotiques, des souches bactériennes résistantes à ces molécules sont apparues. En effet, Fleming lançait déjà un avertissement face à une utilisation excessive de la pénicilline dès 1945 lors de son discours d'acceptation du prix Nobel (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

Pour chaque nouvelle classe d'antibiotiques développée et commercialisée, des souches bactériennes résistantes ont émergé. Ce phénomène a été amplifié par l'utilisation abusive des antibiotiques depuis un demi-siècle au tant chez les hommes que chez l'animal. En effet, des consommations élevées et un mésusage de ces molécules sont à l'origine de l'émergence et de la diffusion de résistances (Muller, 2017). La progression de la résistance bactérienne aux antibiotiques cause des infections difficiles à traiter et pose un problème de santé publique. Les bactéries résistantes sont souvent la cause des infections nosocomiales aggravant le pronostic des malades, prolongent leur hospitalisation et augmentent les coûts de traitement. On distingue deux types de résistance bactérienne. La résistance naturelle et la résistance acquise (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

1.1.4.8.4.6.2. Types de résistance aux antibiotiques

1.1.4.8.4.6.2.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016). La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène qui apparaît au niveau des souches d'une espèce donnée, normalement sensible à cet antibiotique.

1.1.4.8.4.6.2.2. Résistance acquise

1.1.4.8.4.6.2.2.1. Origine de l'émergence des résistances acquises

L'acquisition d'un facteur génétique qui se traduit par une réduction de la sensibilité à la molécule qui lui était fatale. Elle peut donc se faire soit par mutation chromosomique soit par acquisition des gènes transférés d'un autre micro-organisme (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016). L'apparition d'un gène de résistance chez une (Figure 7) par mutations sur des gènes chromosomiques peut être spontanée ou induite. Une mutation spontanée est un changement spontané, rare et héréditaire, qui va affecter la séquence nucléotidique du génome bactérien pendant qu'une mutation induite, concerne l'adaptation d'une bactérie à des conditions défavorables à sa croissance (notamment présence d'antibiotiques). Par ailleurs, l'apparition d'un gène de résistance par acquisition provenant d'autres souches peut se faire :

- par conjugaison, c'est-à-dire un gène est transféré d'une bactérie à une autre *via* des plasmides ou des transposons (transfert horizontal, souvent à partir de bactéries non pathogènes de l'environnement).
- par transduction, c'est-à-dire un gène est transféré d'une bactérie à une autre *via* un bactériophage (transfert intra-espèce) ;
- par transformation, suite à un transfert d'ADN nu entre deux bactéries (transfert intra- ou inter-espèce).

La pression de sélection antibiotique va ensuite jouer un rôle essentiel puisqu'elle va permettre la sélection des souches résistantes. En effet, au sein d'une flore bactérienne essentiellement sensible à un antibiotique administré (flore intestinale notamment), cet antibiotique va avoir une action inhibitrice sur les bactéries sensibles de la flore commensale, entraînant leur disparition transitoire, et laissant alors de la place aux souches ayant acquis le gène de résistance, permettant ainsi leur croissance (Figure 8) (Muller, 2017).

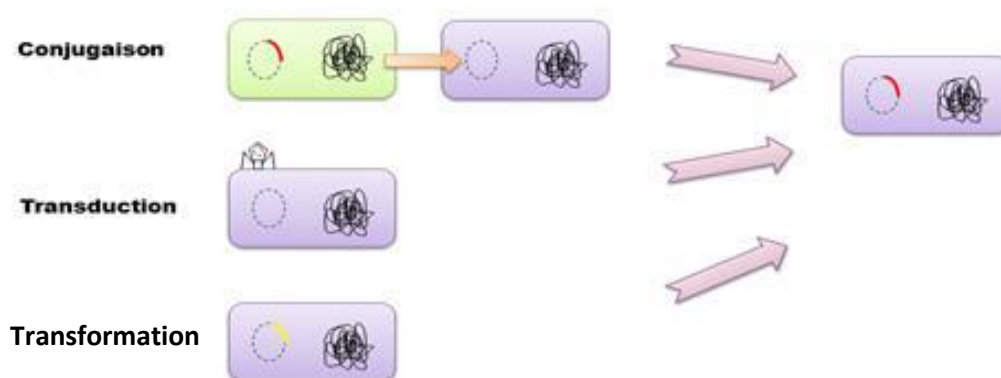


Figure 7 : Différents mécanismes d'acquisition de résistance chez les bactéries (Muller, 2017)

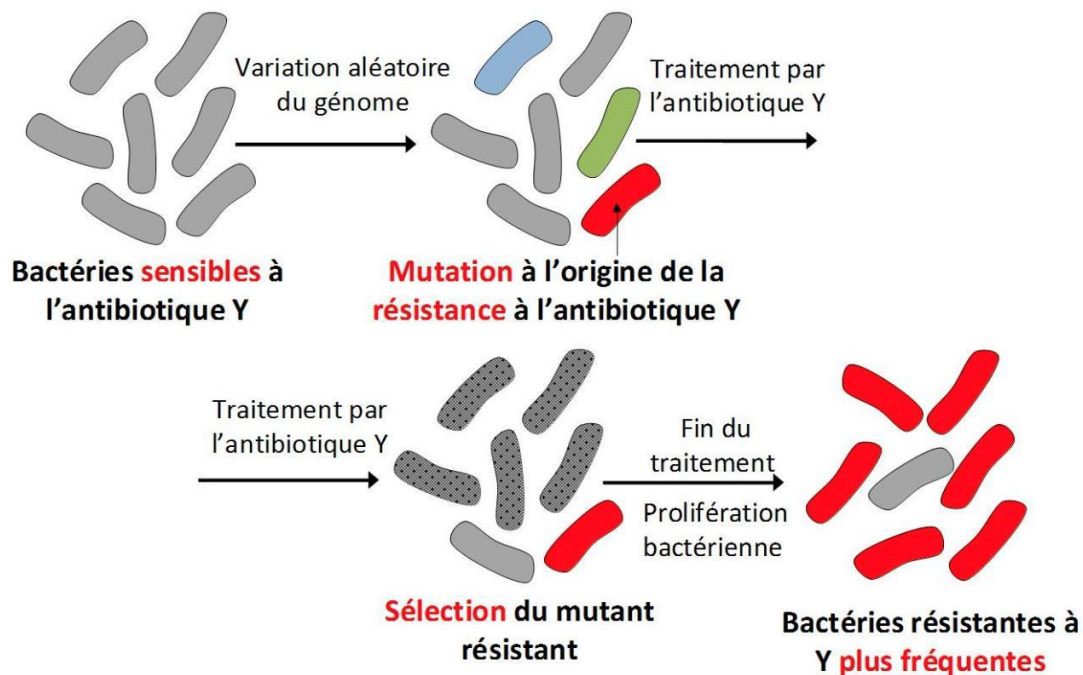


Figure 8 : Pression de sélection des antibiotiques (Rizzo *et al.*, 2013)

1.1.4.8.4.6.2.2.2. Multirésistance

La définition de la multirésistance est difficile à établir. Il est couramment admis de parler de multirésistance lorsqu'une souche bactérienne a accumulé sur son profil sauvage de sensibilité aux antibiotiques des résistances acquises telles que la souche ne reste sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Mehdi, 2008 ; Meskine & Benabdelkader, 2016).

Les scientifiques ont découvert par la suite que les gènes de résistance étaient facilement capturés, disséminés et échangés d'une bactérie à l'autre par un système de "couper/coller" génétique de structures contenant ces gènes, appelées intégrons. Mais la dynamique de ces échanges, qui conditionne le développement des multirésistances chez les bactéries, restait inexpliquée.

Les travaux de chercheurs révèlent aujourd'hui pour la première fois comment les bactéries acquièrent ces propriétés de multirésistance. Ce sont en fait les antibiotiques eux-mêmes qui provoquent la synthèse de l'enzyme bactérienne qui capture les gènes de résistance et permet leur expression dans l'intégron. Cette enzyme favorise en outre le réagencement, au hasard, des gènes de résistance au sein des intégrons. Or, l'ordre de ces gènes dans les intégrons

détermine le degré de priorité pour leur expression : les premiers sont les plus exprimés et confèrent à la bactérie les résistances correspondantes. Les derniers restent silencieux tout en étant néanmoins conservés, en réserve. Lors d'un nouveau réagencement, déclenché par la prise d'un antibiotique par exemple, ils seront susceptibles de se retrouver dans les premières positions, et d'apporter à la bactérie les résistances requises face à ce médicament. Les bactéries qui possèdent alors la bonne combinaison de gènes pourront survivre et assurer le maintien du potentiel de résistances au fil des générations (Nouri & Ziadi, 2015).

1.1.4.8.4.6.2.3. Résistance bactérienne dans la chaîne alimentaire

La dissémination de la résistance aux antimicrobiens est souvent associée à l'utilisation abusive d'agents antimicrobiens dans l'agriculture, la médecine humaine et vétérinaire. Les bactéries résistantes et les gènes de résistance aux antibiotiques peuvent facilement se propager à chaque étape de la chaîne de production alimentaire et peuvent causer des infections chez l'homme. L'émergence de l'antibiorésistance le long de la chaîne alimentaire est donc un problème majeur de santé publique mondiale (Toe, 2017).

La résistance aux antibiotiques est donc une menace croissante pour la santé publique dans le monde. Car, elle compromet la prévention et le traitement efficace d'un nombre croissant d'infections dues à des bactéries. De plus, elle augmente le coût des soins de santé en prolongeant la durée des séjours à l'hôpital, en imposant des soins plus intensifs et des médicaments plus onéreux. Les nombres d'infections dues à ces résistances sont estimés à 2 000 000 aux États Unis avec 23 000 décès par an et à 386 000 en Europe en 2007 avec 25 000 décès par an. En Afrique, les quelques rares données disponibles indiquent que la région partage la tendance mondiale de l'augmentation de la résistance (Toe, 2017).

1.1.4.8.5. Caractérisation moléculaire des pathogènes bactériens

L'identification moléculaire est une technique qui permet de déceler l'identité d'une espèce à travers les molécules d'Acide désoxyribonucléique (ADN). Cette étude se réalise en plusieurs étapes.

1.1.4.8.5.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une méthode permettant d'isoler l'ADN des cellules ou tissus. L'utilisation d'une technique d'isolement de l'ADN donnée devrait conduire à une extraction efficace avec une bonne quantité et qualité d'ADN, pur et dépourvu de contaminants, tels que l'ARN et les protéines. Des solutions préparées dans les laboratoires ainsi que des kits disponibles dans le commerce sont utilisés pour l'extraction de l'ADN à partir de cellules ou

tissus. L'extraction d'ADN implique la lyse des cellules et la solubilisation de l'ADN, suivies de méthodes chimiques ou enzymatiques pour éliminer les macromolécules, les lipides, l'ARN ou les protéines (Gupta, 2019).

1.1.4.8.5.2. Réaction en chaîne par la polymérase (PCR)

La PCR est l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN connue dont la méthode consiste en une répétition de cycles thermiques de dénaturation, d'hybridation et d'extension de la polymérase (Mullis *et al.*, 1986). La PCR est réalisée dans un thermocycleur et implique trois étapes principales à savoir, (i) la dénaturation de la matrice d'ADN double brin à 92-95 °C ; (ii) annelage des amorces ou hybridation à 50-70 °C, et (iii) l'extension des molécules d'ADN double brin à 72 °C. Le nombre de cycle peut varier de 30 à 40 selon le programme utilisé. La PCR nécessite divers composants chimiques dont le MgCl₂, le tampon (pH 8,3-8,8), les désoxynucléosides triphosphates (dNTP), les amorces spécifiques, l'ADN cible et l'ADN polymérase thermostable (Gupta, 2019).

Il existe différents types de PCR parmi lesquels la PCR multiplex, la PCR en temps réel, la PCR nichée ou PCR modifiée, la PCR de transcriptase inverse ou RT-PCR, la PCR à démarrage à chaud, la Touchdown PCR, la PCR d'assemblage, la PCR spécifique à la méthylation, le Test LAMP ou amplification isotherme médiée par boucle (Erlich, 1989 ; Niemz *et al.*, 2011 ; Gupta, 2019).

1.1.4.8.5.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue dans celle-ci. Étant donné l'unicité et la spécificité de la structure de l'ADN chez chaque individu, la séquence de l'ADN permet de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, comme, par exemple, le diagnostic, les études génétiques, l'étude de paternité, la criminologie, la compréhension de mécanismes physiopathologiques, la synthèse de médicaments, les enquêtes épidémiologiques. Les deux premières techniques de séquençage d'ADN sont : la technique de Maxam-Gilbert et celle de Sanger décrites en 1977. Cependant, la méthode de Sanger reste à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires (Lamoril *et al.*, 2008).

1.1.4.8.5.4. Technique de Sanger

Le séquençage de Sanger est une technique de séquençage ciblée qui utilise des amorces d'oligonucléotides pour rechercher des régions spécifiques de l'ADN (Figure 9). Le

Généralités

séquençage de Sanger commence par la dénaturation de l'ADN double brin. L'ADN simple brin est ensuite annelé à des amorces oligonucléotidiques et allongé à l'aide d'un mélange de désoxynucléotides triphosphates (dNTP), qui fournissent l'Adénine (A), de la cytosine (C), de la Thymine (T) et de la guanine (G) nécessaires pour construire la nouvelle structure à double brin. En outre, une petite quantité de didésoxynucléotide triphosphates (ddNTP) terminant la chaîne pour chaque nucléotide est incluse. La séquence continuera à s'étendre avec dNTPs jusqu'à ce qu'un ddNTP se fixe. Comme les dNTP et ddNTPs ont des chances égales de s'attacher à la séquence, chaque séquence se terminera à des longueurs différentes. Chaque ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) comprend également un marqueur fluorescent. Lorsqu'un ddNTP est attaché à la séquence d'élongation, la base devient fluorescente en fonction du nucléotide associé. Par convention, A est indiqué par une fluorescence verte, T par du rouge, G par du noir, et C par du bleu. Un laser à l'intérieur de la machine automatisée utilisée pour lire la séquence détecte une intensité de fluorescence qui se traduit par un « pic ». Lorsqu'une variante hétérozygote se produit dans une séquence, les loci seront capturés par deux colorants fluorescents d'intensité égale. Lorsqu'un variant homozygote est présent, la couleur fluorescente attendue est complètement remplacée par la couleur de la nouvelle paire de bases (Gomes & Korf, 2018). Les nouvelles technologies de séquençage et les capacités analytiques ont révélé le gène de l'ARNr 16S très utile pour décrire la diversité et la caractérisation des communautés microbiennes (Valenzuela-González *et al.*, 2015).

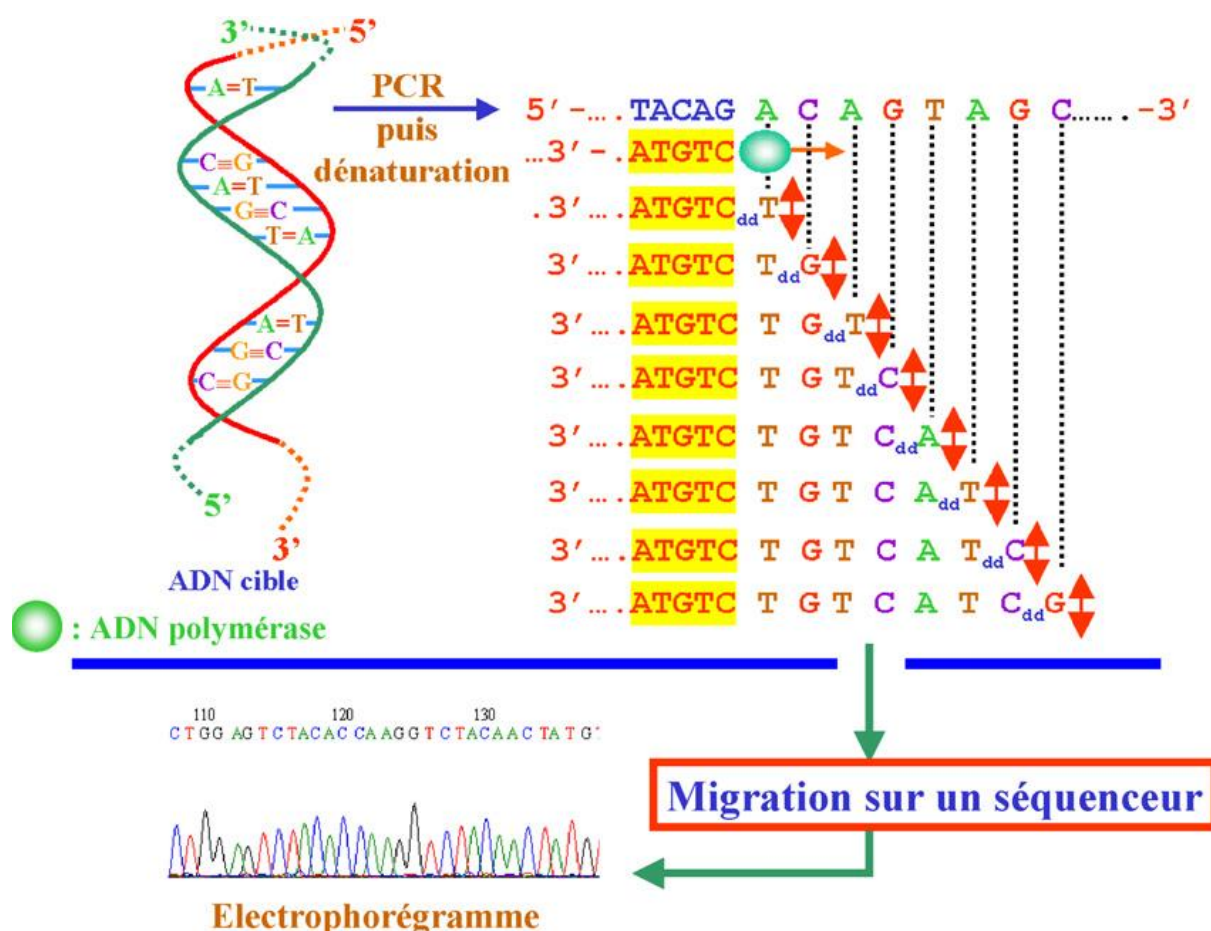


Figure 9 : Principes du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008)

1.1.4.8.5.5. ARN ribosomal 16S comme outils d'identification des procaryotes

L'ARN est plus petite molécule constituée d'un enchaînement de ribonucléotides Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G), Uracile (U)), reliés entre eux par des liaisons nucléotidiques. L'ARN16S constitue la petite sous unité des ribosomes des procaryotes. Les gènes codant cet ARN sont appelés ADNr 16S (16S rDNA en anglais) et leur séquence est très utilisée en phylogénie pour reconstruire l'histoire évolutive des organismes dans la mesure où sa vitesse d'évolution relativement lente permet d'établir des divergences génétiques anciennes (Woese & Fox, 1977). Ces gènes sont présents en plusieurs copies au sein de chaque organisme sauf chez les Eucaryotes et les virus (Case *et al.*, 2007 ; Plyusnin *et al.*, 2020) . Chez les bactéries, les trois gènes d'ARNr sont organisés en un groupe de gènes qui s'exprime sous la forme d'un seul opéron, qui peut être présent en plusieurs exemplaires dans le génome (Pei *et al.*, 2010). Les gènes de l'ARNr 16S des bactéries contiennent généralement neuf « régions hypervariables » qui présentent une diversité de séquences considérable entre les différentes espèces bactériennes et peuvent être utilisées pour l'identification des espèces (Van de Peer *et al.*, 1996). Les régions hypervariables sont flanquées de segments conservés dans la plupart des bactéries,

ce qui permet l'amplification par PCR des séquences cibles à l'aide d'amorces universelles d'une taille de 1500 pb. Les séquences spécifiques à une espèce dans une région hypervariable donnée constituent des cibles utiles pour les tests de diagnostic et d'autres recherches scientifiques. Ces régions hypervariables couvrent les nucléotides localisés entre 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 et 1435-1465 pour V1 à V9 respectivement (Figure 10). Ainsi, chaque région hypervariable du gène de l'ARNr 16S est flanquée d'une séquence conservée et cela permet de concevoir des amorces PCR « universelles » capables d'amplifier les régions hypervariables de l'ARNr 16S d'un grand nombre d'espèces bactériennes différentes (Chakravorty et al., 2007).

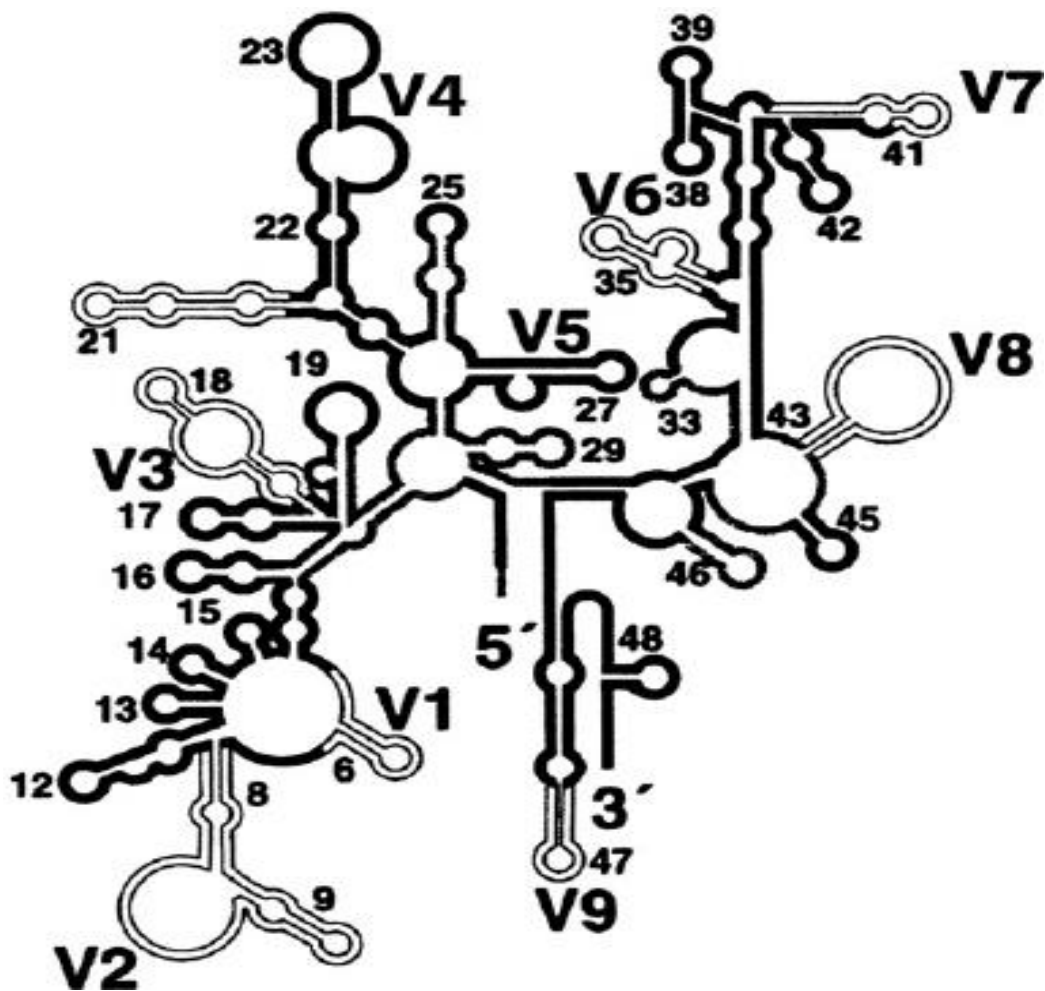


Figure 10 : Régions hypervariables de l'ARN 16S (Cui et al., 2016)

DEUXIEME PARTIE :
MATERIEL ET
METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel végétal

Le matériel d'étude était constitué de vingt (20) types de salades prêtes à l'emploi composées de fruits ou de légumes (Tableau III). Il s'agit des salades conditionnées dans les sachets (500 g) ou dans les barquettes (125 g) en plastique polyéthylène téréphtalate (PET). Toutefois, ces salades sont d'origines diverses (Europe et Côte d'Ivoire). Cependant, elles ont été collectées dans les grandes surfaces de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Au total, 98 échantillons ont été collectés dont quelques-uns sont illustrés dans les figures 11, 12, 13 et 14.

2.1.2. Souches bactériennes

Des souches de références bactériennes de la collection *American Type Culture Collection* (ATCC) et des souches locales de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) ont été utilisées comme témoins pour la validation des méthodes de l'antibiogramme. Il s'agit entre autres de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 et de la souche de *Salmonella* A517.

2.1.3. Matériel technique

Le matériel technique était constitué de matériel qui a servi à l'échantillonnage et du matériel de laboratoire.

2.1.3. 1. Matériel de prélèvement

Le matériel de prélèvement est composé d'une glacière contenant des accumulateurs de froid servant à la conservation des échantillons durant le transport. Aussi, un appareil numérique de marque SAMSUNG a été utilisé pour la prise de vue des différents échantillons. Des fiches d'enquêtes (Annexe 1) et de prélèvements (Annexe 2) ont été également élaborées pour la collecte d'informations durant l'enquête et l'échantillonnage.

2.1.3. 2. Matériel de laboratoire

Tous les équipements prépondérants qui ont servi de matériel de laboratoire sont consignés dans le tableau IV. Quelques photographies de ces équipements sont présentées en Annexe 3.

Matériel et Méthodes

Tableau III : Différents types de salades collectées et nombres d'échantillons associés

Types de Salade	Composition	Origine	Conditionnement	Quantité collectée
100 % Cœur de frisés (Cf)	Cœurs de frisés	Europe	Sachet	5
Baby Epinards (Ep)	Feuilles d'épinards	Europe	Barquette	5
Jeunes Pousses (JP)	Laitue, roquette, épinards, blettes rouges, sang de taureau.	Europe	Barquette	5
Mâches (Ma)	Feuilles de mâches	Europe	Barquette	5
Duo Mâches Roquettes (MR)	Feuilles de mâches et de roquettes	Europe	Barquette	5
Roquettes (Rq)	Feuilles de roquettes	Europe	Barquette	5
Céleri Branches (SCB)	Branches de céleri	Europe	Barquette	3
Salades Aperitives (SA)	Laitue, concombre, tomates, carottes, viande hachée	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Carottes (SCa)	Racines de carottes	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Choux (SCh)	Feuilles de choux	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Feuilles de Chênes Vertes (SChV)	Feuilles de chênes vertes	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Composées (SCom)	Laitue, tomates, haricot vert, maïs, carottes, petits pois, choux, jambon, œuf	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits d'Ananas (SFA)	Fruits d'ananas	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits Composées (SFC)	Ananas, kiwi, pastèque, raisin, mandarine, mangues	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits d'Ananas + Mangues (SFAM)	Ananas et de mangues	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits de Papaye + Ananas (SFPA)	Papayes et d'ananas	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits de Papaye + Citron (SFPC)	Papaye et de citron	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades de Fruits de Raisin (SFR)	Raisin	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Meli mélo (SMe)	Plusieurs variétés de feuilles de chênes vertes	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Salades Nicoises (SN)	Laitue, tomate, haricot vert, concombre, jambon, œuf	Côte d'Ivoire	Barquette	5
Totaux	-	-	-	98



Figure 11 : Salades 100 % Cœur de frisée (A) et salades de chou (B)

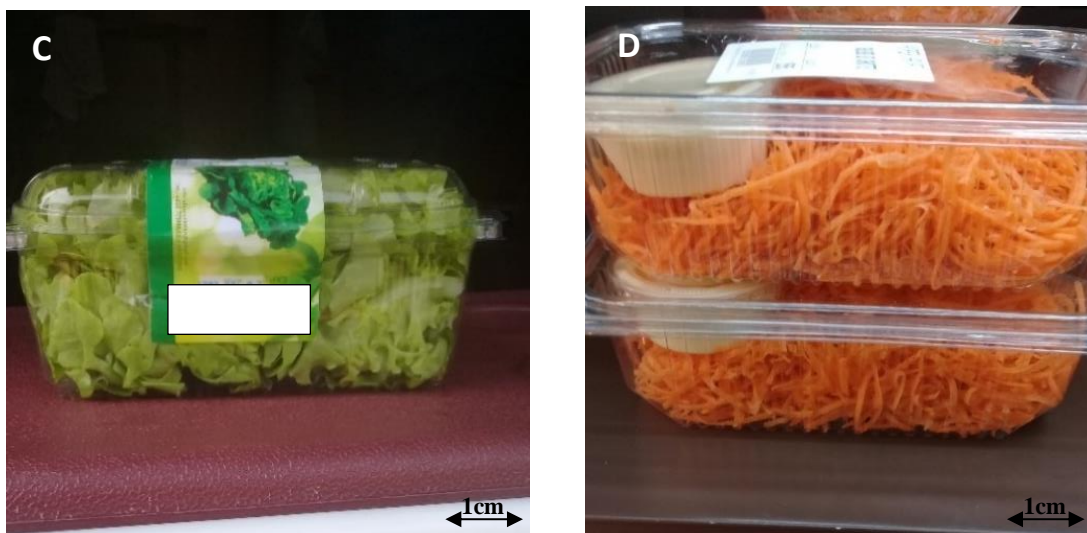


Figure 12 : Salade de feuilles de Chênes vertes (C) et salade de carottes (D)

Matériel et Méthodes



Figure 13 : Salades de fruits composés (E) et salades jeunes pousses (F)



Figure 14: Salade de légumes associées aux produits carnés (G) et salade d'épinard (H)

Matériel et Méthodes

Tableau IV : Equipements de laboratoires utilisés

Désignations	Marques	Rôles
pH-mètre	Hanna HI 9124	Mesurer le pH
Etuve	BINDER®	Incuber les différentes cultures bactériennes et déterminer la teneur en eau
Réfrigérateur	DAEWOO®	Conserver des souches, des produits et réactifs à basse température
Refractomètre	ATAGO N-1α	Lire le degré Brix
Mortier en porcelaine	AVIGNON	Broyer les échantillons
Balance numérique	OHAUS CS SERI®	Utiliser pour les pesées.
Autoclave H+P	VARIOKLAV®	Stériliser les milieux de cultures, embouts et tubes
Bain marie	Fisher Scientific Polytest 12	Dissoudre, régénérer les milieux de cultures
Centrifugeuse	SIGMA 2-16P®	Séparer les différentes phases des solutions
Thermocycleur	miniPCR bio™	Amplifier les fragments d'ADN
Dispositif d'électrophorèse	VILBER®	Faire la migration des fragments d'ADN
Lecteur de gel	VILBER®	Observer les amplicons
Bec Bunsen		Créer les conditions aseptiques
Applicateur de disques	BIORAD®	Poser les disques d'antibiotiques
Densimat	VITEK®	Mesurer la turbidité de la suspension bactérienne
ADAGIO	BIORAD®	Lire et interpréter les résultats d'antibiogramme

2.1.3. 3. Matériel d'analyses bactériologiques et biochimiques

Concernant, les analyses bactériologiques, le matériel est composé de milieux de cultures et réactifs. L'ensemble du matériel a servi à la recherche et à la caractérisation des microorganismes mais également aux tests de sensibilité. L'Eau Peptonée Tamponnée (EPT)

Matériel et Méthodes

(Condalab) a été utilisée pour les dilutions et la préparation des solutions mères. En outre, le bouillon $\frac{1}{2}$ de Fraser Base (ALPHATM BIOSCIENCES) a été utilisé pour les enrichissements des bactéries du genre *Listeria*. Par ailleurs, la gélose Baird-Parker (BP) (VM929593024) et le tellurite de potassium additionné de jaune d'œuf ont servi au dénombrement de *S. aureus*. Concernant la recherche des souches de *E. coli*, la gélose *E. coli* chromogène Base (CONDA) a été utilisée. Quant aux Salmonelles, elles ont été recherchées grâce au bouillon rapport vassiliadis (RV) (CONDA) et le milieu Hektoën (CONDA). Les dénombrements de la flore aérobie totale et de la flore fongique ont été effectués respectivement sur la gélose Plate Count Agar (PCA) (Condalab) et le milieu Sabouraud additionné de Chloramphénicol. La culture de *L. monocytogenes* a été possible sur la gélose Oxford *Listeria* Agar Base (ALPHATM BIOSCIENCES). Les géloses ordinaire et Luria Bertani ont servi à la purification des souches bactériennes. Le Bouillon Cœur Cerveille (BCC) (VM929593024) et le glycérol ont été utilisés pour la conservation des souches. La gélose Mueller Hinton (MH) (CONDA) a permis de réaliser l'antibiogramme. Une solution de NaCl (0,85 %) a été utilisée pour la préparation d'inoculum bactériens. Les tests d'identifications biochimiques ont été possibles grâce aux consommables suivants : gélose d'ADN, HCl (5 %), eau physiologique, eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), réactif de KOVACS, disques d'oxydase, milieu Mannitol (CONDA), l'urée, la gélose Hajna-Kligler (CONDA). Aussi, la coloration de Gram a nécessité les réactifs comme, le Lugol, la Fuchsine, le violet de gentiane et l'alcool. La soude (NaOH) et la phénolphthaléine ont servi aux dosages de l'acidité des échantillons.

Outre les milieux et réactifs, d'autres consommables ont été utilisés. C'est le cas des boîtes de Pétri utilisées pour la préparation des milieux de cultures, les tubes à vis pour les identifications biochimiques et les tubes à centrifugeuse de types Falcon stériles de 15 et 50 mL pour la centrifugation des échantillons. Les antibiotiques utilisés sont consignés dans le tableau V.

Matériel et Méthodes

Tableau V : Liste des disques d'antibiotique testés sur les souches bactériennes

Familles	Nom	Sigle	Charges (µg)
Bêtalactamines	Benzylpénicilline	PENG	1 IU
	Céfoxitine	FOX	30
	Ceftriaxone	CRO	30
	Ticarcilline + acide clavulanique	TCC	85
	Céfixime	FIX	5
	Céfépime	FEP	30
	Mécillinam	MEC	10
	Ticarcilline	TIC	75
	Céfuroxime	CXM	30
Macrolide, Lincosamide, Streptogramines	Ampicilline	AMP	10
	Clindamycine	CMN	2
Fluroquinolones	Érythromycine	ERY	15
	Norfloxacin	NXN	10
	Nitroxoline	NIR	30
	Ciprofloxacine	CIP	5
	Moxifloxacine	MXF	5
Carbapénème	Acide nalidixique	NAL	30
	Imipénème	IPM	10
	Meropénème	MEN	10
Tétracycline	Tigécycline	TGC	15
Aminosides	Kanamycine	KMN	30
	Gentamicine	GMN	10
	Netilmicine	NTM	10
	Amikacine	AKN	30
Divers	Acide Fusidique	FAD	10
	Rifampicine	RIF	5
	Fosfomycine	FOS	200
	Chloramphénicol	CHL	30
	Nitrofurane	FTN	300

Matériel et Méthodes

2.1.3. 4. Matériel d'analyse moléculaire

Les produits tels que, le cetyltriméthylammonium Bromide (CTAB) (BioChemica), le chlorure de sodium (NaCl), L'Acide Ethylènediaminetétraacétique (EDTA), le chlorure d'hydrogène (HCl), l'hydroxyde de Sodium (NaOH), le Tris, le chloroforme, l'isopropanol, le phénol, l'éthanol, protéinase K, ARNase et de l'eau ultra pure ont servi à l'extraction de l'ADN génomique des échantillons. Le matériel de l'amplification a été constitué d'un Mini-thermocycleur (MiniPCR Bio™) et des amorces spécifiques dont les caractéristiques sont consignées dans le tableau VI. Le milieu réactionnel utilisé est composé de tampon PCR 10X contenant du chlorure de magnésium (MgCl₂) des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), l'eau ultra pure (H₂O), des amorces. L'agarose lyophilisé a servi pour la préparation du gel de migration électrophorétique. En outre, la solution Tris-Acétate-EDTA (TAE) a été utilisée comme tampon pour l'électrophorèse et comme solvant pour la préparation du gel d'agarose. La solution de Gelred a été employée comme agent intercalant nécessaire pour la visualisation des fragments d'ADN à l'aide d'un transilluminateur à rayon ultraviolet.

Tableau VI: Amorces utilisées pour les identifications moléculaires

Germes	Gènes	Séquences (5'→3')	Tailles (pb)	Références
<i>L. monocytogenes</i> et autres pathogènes psychrotrophes	Régions hypervariables (V1-V3) de l'ARNr 16S	F27 : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R520 : ACCGCGGCTGCTGGC	500	(Soumahoro <i>et al.</i> , 2020)
	<i>stx 1</i>	F : ACACTGGATGATCTCAGTGG R : CTGAATCCCCCTCCATTATG	614	(Yaron <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. coli</i>	<i>stx 2</i>	F : CCATGACAACGGACAGCAGT R : CCTGTCAACTGAGCACTTTG	779	(Yaron <i>et al.</i> , 2000)
	<i>S. aureus</i>	<i>sea</i>	F : GGTTATCAATGTGCGGGTGG R : CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102
<i>seb</i>		F : GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC R : CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	(Mehrotra <i>et al.</i> , 2000)

2.2. Méthodes

2.2. 1. Enquête sur la consommation de salades prêtes à consommer à Abidjan

Pour la détermination des grandes surfaces de vente des salades de 4^{ème} gamme et l'obtention d'informations relatives à la consommation, une enquête prospective faite sur la base de questionnaire (Annexe 1) et d'observations a été menée sur une période de 6 mois allant de Septembre 2019 à Février 2020 dans la ville d'Abidjan. Elle a concerné les dix (10) communes de la ville d'Abidjan. Notamment, Abobo, Adjamé, Attécoubé, Bingerville, Cocody, Koumassi, Marcory, Plateau, Port-Bouët, Treichville.

2.2.1.1. Choix des sites d'enquête et d'échantillonnage

La détermination des sites d'enquête et d'échantillonnage s'est faite par choix raisonné. Elle s'est appuyée sur une prospection sommaire d'un (1) mois préalable à l'enquête faite dans la ville d'Abidjan. Cette prospection a permis d'identifier les grandes surfaces de la ville d'Abidjan dans lesquelles la vente des salades de 4^{ème} gamme s'effectue. Conformément à l'étude de prospection, le prélèvement a été effectué dans 2 communes de la ville d'Abidjan précisément, Cocody et Marcory.

2.2.1.2. Rubriques renseignées par l'enquête

L'enquête a porté sur les caractéristiques sociodémographiques (commune, sexe, âge, religion, niveau d'étude, situation matrimoniale et la profession) et surtout sur les questions relatives à la consommation des salades prêtes à consommer vendues dans les supermarchés. Il s'est agi évidemment du type de salade consommée, le moment et la fréquence de consommation, les malaises et symptômes liés à la consommation de ces salades.

2.2. 2. Collecte des échantillons et conservation au laboratoire

L'échantillonnage des salades de 4^{ème} gamme a porté sur 98 échantillons composés de salades de fruits et de légumes. Parmi celles-ci, certaines salades étaient composées que de produits végétaux et d'autres sont associées aux produits carnés. L'échantillonnage a été réalisé dans 5 grandes surfaces d'Abidjan dont 2 à Marcory et 3 à Cocody. La collecte des salades conditionnées dans les sachets (500 g) ou dans les barquettes (125 g) en plastiques polyéthylène téréphtalate (PET) a été réalisée de façon aléatoire. Après la collecte, les différents échantillons ont été étiquetés et mis dans une glacière contenant des accumulateurs de froid (+ 4 °C) pour être transportés au laboratoire d'Agro-valorisation de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) de Daloa. Les échantillons ont été ensuite stockés à une température de - 80 °C. Cette partie du travail a été effectuée de façon périodique en fonction de la disponibilité des

échantillons dans les rayons des supermarchés. La première période a duré quatre (04) mois (de Juin à Septembre 2020). La seconde période part de Décembre 2020 à Février 2021 (3 mois) et la dernière s'est effectuée d'Avril à Mai 2021 (2 mois). Au total neuf (09) mois ont été nécessaires pour le prélèvement.

2.2.3. Détermination des paramètres physicochimiques des salades prêtes à consommer

2.2.3.1. Détermination du potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH a été déterminé selon la méthode AOAC (1984). Cinq (05) g d'échantillon de salades ont été pesés et broyés puis introduits dans un tube à centrifugeuse de type Falcón de 50 mL puis additionné de 20 mL d'eau distillée. L'ensemble a été centrifugé puis un volume de 10 mL du surnageant a été prélevé dans un bécher de 15 mL. Le pH a été mesuré après calibrage du pH-mètre, en plongeant l'électrode dans les 10 mL de solution. La valeur a été lue sur l'écran du pH-mètre portable (Hanna HI 9124). Ainsi, trois répétitions ont été effectuées pour chaque échantillon.

2.2.3.2. Détermination de l'acidité titrable (AT)

L'acidité titrable (en mEq/100 g), a été déterminée suivant la méthode colorimétrique décrite par la norme française NF V05-101 (AFNOR, 1974). Cinq grammes d'échantillon ont été pesés et broyés dans un tube à centrifugeuse de type Falcón de 50 mL puis additionné de 20 mL d'eau distillée. L'ensemble a été centrifugé puis 5 mL du surnageant ont été prélevés dans un bécher. Ensuite, un titrage a été réalisé avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH à 0,1 N) après ajout de 2 gouttes de phénolphaléine. Le volume V_1 de la solution de NaOH versé à l'équivalence a été noté. L'acidité titrable (AT) est obtenue selon la formule de l'équation (1) :

$$AT (mEq/100 g) = \frac{N_1 \cdot V_1 \cdot 10^5}{m \times V_0} \quad (1)$$

N_1 : Normalité de NaOH ; m : Prise d'essai ; V_0 : Volume de la solution prélevé pour le titrage. Trois déterminations ont été faites pour chaque échantillon.

2.2.3.3. Dosage du degré Brix

La détermination de l'extrait sec soluble a été réalisée selon Dadzie & Orchard (1997) à l'aide d'un réfractomètre. Une goutte de filtrat de chaque échantillon préalablement tempéré à 20 °C et broyés, a été déposée sur le prisme d'un réfractomètre (Atago N-1 α , modèle N, McCormick fruit Tech). Cet appareil a été ensuite pointé en direction d'une source lumineuse

pour la lecture du degré Brix correspondant au taux d'extrait sec soluble de l'échantillon. La valeur lue a été multipliée par le facteur de dilution de cette solution. La teneur en résidu sec soluble de la solution diluée a été exprimée selon la formule (2) :

$$\text{IR} = M \times f \quad (2)$$

où M est la valeur lue au réfractomètre et f est le facteur de dilution, IR est l'indice de réfraction. Les valeurs moyennes ont été obtenues à l'issue de trois essais.

2.2.3.4. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau (TE) est déterminée selon la méthode AACC (1990). Un creuset vide est d'abord nettoyé, séché et pesé (M0). Ensuite, le creuset contenant l'échantillon (1 g) est de nouveau pesé (M1) puis placé à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures. Après ce temps de séchage, le creuset est sorti de l'étuve, puis refroidi avant d'être pesé (M2) à nouveau. Les résultats exprimés représentent la moyenne de trois essais et la teneur en eau est donnée par l'expression mathématique (3).

$$TE (\%) = \frac{M1 - M2}{M1 - M0} \times 100 \quad (3)$$

2.2.4. Suivi de la croissance microbienne durant la période de conservation domestiques des salades

Cette étude a consisté à un dénombrement germes par intervalle de temps (J0 ; J3 ; J7). En effet, J0 est la période d'analyse des échantillons à la réception des échantillons. J3 est la période d'analyse après 3 jours de conservation des échantillons après ouverture de l'emballage. Quant à J7, il s'agit de la période d'analyse après 7 jours de conservations après l'ouverture de l'emballage. A cet effet, les échantillons ont été retirés du congélateur de température -80 °C et après ouverture ont été conservés à une température domestique (7 °C) dans un réfrigérateur. Le choix de la température de conservation durant les analyses fait référence aux travaux de marklinder *et al.* (2004). Chaque échantillon a été analysé 3 fois. Le dénombrement des microorganismes a porté sur les Germes Aérobie s Mésophile s (GAM), Germes Aérobie s Psychrophiles (GAP) et la Flore Fongique (FF).

2.2.4.1. Préparation des échantillons et milieux de culture

2.2.4.1.1. Milieux de culture

Les milieux de culture durant l'étude ont été préparés en fonction des besoins et des germes recherchés en suivant le mode opératoire indiqué sur l'étiquette de la boîte de chaque milieu. Ensuite, ces milieux ont été portés à l'ébullition dans un bain marie à une température de 100 °C. Enfin, ils ont été autoclavés à 121 °C excepté le milieu Hektoën.

2.2.4.1.2. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Une suspension mère et les dilutions décimales ont été préparées conformément à la norme AFNOR NF V08-010-2 (1996). Une suspension mère a été préparée à partir d'une quantité de 10 g de chaque échantillon de salade de quatrième gamme délayée dans 90 mL de diluant (EPT). A partir de cette suspension les dilutions ont été réalisées. En effet, un volume de 1 mL de la suspension mère a été prélevé à l'aide d'une pipette sérologique graduée stérile de 2 mL et introduit dans un volume de 9 mL de diluant (EPT) contenu dans un autre tube à vis. Ensuite, après homogénéisation à l'aide d'un vortex, la dilution obtenue constitue la dilution 10^{-1} . Enfin, par le même procédé, des dilutions décimales en série ont été réalisées jusqu'à la dilution 10^{-6} pour les échantillons à l'ouverture des emballages mais pour les autres jours après ouverture des emballages la dilution s'est faite jusqu'à 10^{-9} . Ces manipulations ont été effectuées dans des conditions aseptiques autour d'un bec Bunsen.

2.2.4.2. Dénombrement des microorganismes

2.2.4.2.1. Dénombrement des Germes Aérobie Mésophile (GAM) et Psychrophile (GAP)

Le dénombrement des GAM a été effectué sur la Gélose PCA selon la norme UNI EN ISO 4833-1 : 2013. En effet, un ensemencement dans la masse a été effectué en prélevant à l'aide d'une pipette stérile de 2 mL, une quantité de 1 mL de chaque dilution et l'introduit dans une boîte de Pétri. Ensuite, une quantité de 15 mL du milieu PCA préalablement préparé et conservé à une température de 47 °C (\pm 2 °C) au bain-marie a été coulée dans les boîtes contenant les échantillons. Le mélange a été homogénéisé par agitation manuelle pendant 1 minute. Après solidification, une seconde couche du même milieu (5 mL de gélose) a été coulée puis incubée. Enfin, l'ensemble a été incubé après solidification à une température de 30 °C pendant 72 h pour les germes aérobies mésophiles et à une température de 7 °C pendant 72 h pour les germes aérobies psychrophiles. Les boîtes dont les colonies sont comprises entre 30 et 300 ont été retenues pour le dénombrement.

2.2.4.2.2. Flore fongique (levures et moisissures)

Les levures et moisissures ont été dénombrées selon la norme ISO 21527-1 (2008). La technique utilisée était l'ensemencement par étalement en surface. Ainsi, un volume de 0,1 mL de chaque dilution a été étalé sur gélose Sabouraud-chloramphénicol déjà coulé dans des boîtes de Pétri. Puis, les boîtes ont été incubées à 25 °C pendant 72 h à l'étuve. Après les 72 h d'incubation, les colonies présomptives ont été dénombrées.

2.2.5. Recherche de pathogènes bactériens de portage et psychrophiles dans les salades prêtes à consommer

2.2.5.1. Pathogènes bactériens de portage

2.2.5.1.1. Dénombrement de *Escherichia coli*

Le dénombrement de *E. coli* a été réalisé selon la Norme ISO16649-3 (2016) par la technique d'ensemencement dans la masse. A cet effet, une quantité de 1 mL de chaque solution (10^{-1} à 10^{-4}) a été prélevée à l'aide d'une pipette stérile de 2 mL et introduite dans une boîte de Pétri. Ensuite, une quantité de 15 mL du milieu *E. coli* chromogène préalablement préparée et conservée à une température de 47 °C (+/- 2 °C) au bain-marie a été coulée. Le mélange a été homogénéisé par agitation manuelle pendant 1 minute. Après solidification, une seconde couche de 5 mL a été coulée puis les boîtes sont incubées à une température de 44 °C pendant 24 h. Les colonies caractéristiques de *E. coli* ont été dénombrées et isolées pour les tests d'identification biochimique.

2.2.5.1.2. Recherche de *Salmonella spp.*

La recherche de ce germe a été effectuée par la technique de microbiologie classique selon la norme ISO 6579-1 (2017). D'abord, un pré-enrichissement a été réalisé avec une prise d'essai de 25 g de salades homogénéisée dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT) puis incubée à 37 °C pendant 24 h. Ensuite, un enrichissement sélectif a été réalisé en introduisant une quantité de 0,1 mL du milieu pré-enrichi dans 10 mL de rapport vassilliadis (RV10) puis le tout est incubé à 44 °C pendant 24 h. Après ces 24 h d'incubation, un isolement a été effectué par la technique des stries d'épuisement, en prélevant un aliquot 0,1 mL de culture d'enrichissement suivi de l'ensemencement sur le milieu Hektoën. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, 3 colonies caractéristiques de *Salmonella spp.* ont été isolées puis identifiées par des tests biochimiques.

2.2.5.1.3. Dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Les techniques de microbiologie classique selon les normes ISO 6888-1 (2021) ont été utilisées. Une quantité de 0,1 mL de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-4}) a été prélevée à l'aide d'une pipette sérologique de 2 mL stérile et introduite dans une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé Baird Parker déjà coulé et séché. La quantité de 0,1 mL a été étalée sur la gélose avec des billes d'étalement. Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h. Les colonies caractéristiques de *S. aureus* ont été dénombrées puis isolées pour les tests d'identification biochimique.

2.2.5.1.4. Détermination des charges bactériennes

La concentration moyenne ou charge bactérienne a été rapportée selon la norme ISO 7218 (2007). Le calcul du nombre de microorganismes par gramme d'échantillon (UFC / g) à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Pétri choisies est réalisé par l'équation mathématique (4) :

$$N = \frac{\sum Ci}{(N_1 + 0,1N_2)d \cdot V} \quad (4)$$

N : Nombre moyen de colonies en UFC / g de salades ;

$\sum Ci$: Somme des colonies caractéristiques comptées sur toutes les boîtes retenues ;

N1 : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

N2 : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : Taux de dilution correspondant à la première dilution ;

V : Volume de l'inoculum prélevé.

2.2.5.1.5. Identification bactérienne

2.2.5.1.5.1. Identification des caractères morphologique

2.2.5.1.5.1.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram consiste en une coloration différentielle de la paroi bactérienne utilisant le violet de gentiane et la fushine de couleur rose. Dans le cadre de cette étude, un frottis a été réalisé à partir d'une colonie puis le frottis séché à l'air et fixé à la chaleur pendant 1 minutes. Le frottis a été par la suite recouvert de violet de gentiane et rincé à l'eau de robinet après 1 minutes d'attente. Ensuite, la lame a été recouverte de Lugol et au bout d'une minutes elle a été décolorée à l'alcool (90°) pendant 30 secondes. Enfin, la lame a été recolorée

de fushine et pendant 30 secondes puis rincée à l'eau de robinet et séchée. Chaque frottis a été observé au microscope optique à l'objectif 100 en présence de l'huile a immersion.

2.2.5.1.5.2. Identification des caractères biochimiques

2.2.5.1.5.2.2. Test de mannitol mobilité

Le milieu mannitol mobilité est un milieu semi solide qui permet d'étudier simultanément la dégradation du mannitol (la dégradation en anaérobiose conduit à la formation de fructose qui est un produit de dégradation du mannose) et la mobilité. L'ensemencement du milieu a été fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube avec l'isolat à tester à l'aide d'une pipette Pasteur. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, le virage du milieu au jaune indique un test mannitol positif et au rouge, mannitol négatif.

Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement troublant le milieu faiblement gélosé. Les bactéries immobiles croissent uniquement le long de la piqûre centrale (Delarras, 2007).

2.2.5.1.5.2.3. Portoir réduit de Le Minor

Le portoir réduit de Le Minor est composé de plusieurs milieux à savoir : citrate de Simmons, Lysine-Fer, Hajna-Kligler, Urée-Indole. Le Portoir réduit de Le Minor a été réalisé uniquement sur les entérobactéries au cours de cette étude.

Le milieu Citrate de Simmons a été reparti dans en tubes en raison de 5 mL/tube, stérilisé et refroidi en position incliné en pente (sans culot). L'ensemencement a été fait par strie sur la pente et le tube est incubé à 37 °C pendant 24 h. Le virage du milieu du vert au bleu traduit l'utilisation du citrate par l'isolat étudié pendant que le milieu vert traduit la non utilisation du citrate.

Le milieu Lysine-fer a été également reparti en tubes en raison de 10 mL/tube, stérilisé et refroidi en position incliné en pentes avec culot. L'ensemencement a été fait par piqure centrale dans le culot et des stries sur la pente. Le tube a été incubé à 37 °C pendant 24 h. Il permet de mettre en évidence la production de Lysine décarboxylase (LDC), Lysine désaminase (LDA). En fonction de la coloration, les résultats sont interprétés comme suit :

- culot jaune : glucose fermenté, LD-
- culot violet : glucose probablement fermenté mais masqué par la LDC +.

- pente violette : LDA –
- pente rouge vineuse : LDA +
- précipité noir : H₂S + (certaines bactéries LDA + H₂S + apparaissent H₂S -)

Le milieu Kligler-Hajna a été reparti en tubes en raison de 10 mL/tube, stérilisé et refroidi en position incliné en pentes avec culot. Il permet de mettre en évidence l'utilisation du lactose, le glucose et la production de gaz et le sulfure d'hydrogène (H₂S). La méthode d'ensemencement est la même que celle de Lysine-fer. Dans le culot, le glucose est attaqué par la fermentation avec ou sans production de gaz qui disloquerait la masse de la gélose. L'acidification du milieu fait virer le milieu au jaune. Sur la pente, le lactose est attaqué par oxydation avec une faible acidification qui fait virer le milieu au jaune. Une couleur noire dans le milieu traduit la présence de sulfure d'hydrogène (H₂S) et le culot qui vire au jaune donne le glucose positif.

Le milieu urée-indole a été utilisé pour la recherche d'uréase dans le cas de l'urée et la tryptophanase (tryptophane désaminase) le celui de l'indole. Une suspension de bactérie a été réalisée dans 0,5 mL du milieu urée et incubée à 37 °C pendant 24 h. Le virage du milieu de l'orange au rose traduit la présence de l'uréase. Quant à l'indole, quelques gouttes du réactif de KOVACS ont été ajoutées au milieu urée et la formation d'anneau rouge à la surface du milieu après un certain temps traduit la présence d'indole dans le milieu.

2.2.5.1.5.2.4. Test de catalase

L'enzyme catalase a pour effet de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en eau et oxygène, selon la réaction suivante :



Le test de catalase a consisté à déposer une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) sur une lame, puis à mettre en contact avec une colonie isolée, prélevée directement à partir d'une gélose avec une pipette Pasteur boutonnée. S'il y a formation de bulles d'air, alors la bactérie est catalase positive. En absence de bulles d'air elle est dite catalase négative (Abdelali, 2016).

2.2.5.1.5.2.5. Test d'oxydase

Pour ce test, un disque imprégné du réactif d'oxydase a été déposé sur lame port objet-objet. Sur ce disque, un fragment de colonies a été étalé. Lorsque le réactif vire au violet ou au mauve le résultat est positif (oxydase +) dans le cas contraire le test est négatif (Delarras, 2007).

2.2.5.1.5.2.6. Test de la DNase

Le principe a consisté à un ensemencement des boîtes de gélose d'ADN par des stries courtes des isolats à identifier avec deux souches témoins (négatif et positif). Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, Les boîtes de Pétri sont aspergées avec une solution d'HcL (5%). L'acide chlorhydrique précipite l'ADN polymérisé et opacifie le milieu. La dégradation de l'ADN se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance (Kateete *et al.*, 2010).

2.2.5.2. Recherche de pathogènes psychrotrophes

Les microorganismes recherchés sont des pathogènes bactériens psychrotrophes en l'occurrence *Listeria monocytogenes* et d'autres pathogènes capables de se développer sur le milieu oxford. La recherche de ces microorganismes a été possible grâce à plusieurs techniques de la microbiologie classique et de la biologie moléculaire.

2.2.5.2.1. Dénombrement

La recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée par un dénombrement conformément à la norme ISO 11290-2 (2017). En effet, tous les échantillons ont été soumis à un enrichissement en milieu liquide du bouillon Fraser ½ base incubée à 30 °C pendant 24 h. Ensuite, le bouillon obtenu a subi une série de dilution décimale jusqu'à 10^{-3} . Puis une quantité de 0,1 mL de chaque diluât a été inoculée sur le milieu Oxford base. L'incubée à 37 °C pendant 24 à 48 h. Les colonies entourées d'un halo noir ont été dénombrées puis la concentration moyenne ou charge bactérienne a été rapportée selon la norme ISO 7218 (2007). Trois (03) colonies par échantillon ont été isolées sur le même milieu sélectif (Oxford), pour vérifier une conformité entre les différentes souches isolées. Enfin, une purification par repiquage des souches a été effectuée sur gélose Luria Bertani (LB) suivie d'une coloration de Gram.

2.2.5.2.2. Identification moléculaire de pathogènes psychrotrophes

2.2.5.2.2.1. Préparation de l'extrait cellulaire

La préparation de la suspension bactérienne a été effectuée en délayant une colonie bactérienne dans un tube Eppendorf contenant 100 µL d'eau distillée. Ensuite une dilution au $1/50^{\text{ème}}$ de la suspension a été effectuée. La suspension bactérienne obtenue a été utilisée pour la PCR.

2.2.5.2.2.2. Amplification des régions hypervariables de l'ARN 16 S (F27/R520) par PCR

La méthode utilisée est appelée PCR sur colonie (Gupta, 2019). Elle a consisté à amplifier des régions hypervariables du gène 16S qui fait environ 500 pb. Les amorces universelles

Matériel et Méthodes

utilisées sont F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et R520 (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3'). Le mélange réactionnel composé d'un volume final de 50 μ L contenant 15 μ L H₂O stérile ; 25 μ L de solution 2X Phusion Master Mix ; 2,5 μ L amorce F27 ; 2,5 μ L amorce R520 et 5 μ L de la suspension bactérienne. L'amplification a été réalisée suivant le programme décrit par Yao *et al.* (2017), dont une dénaturation initiale à 95 °C pendant 4 min puis 35 cycles de réactions. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation à 95 °C pendant 1 min, une phase d'hybridation des amorces à 54 °C pendant 1 min et une phase d'élongation à 72 °C pendant 1 min. Ces 35 cycles sont suivis d'une extension finale de 10 min à 72 °C. Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit OMEGA bio-tek, E.Z.N.A. Gel Extraction Kit avant d'être séquencés en utilisant l'amorce F27. Le Kit OMEGA bio-tek E.Z.N.A. Gel Extraction Kit est composé d'un volume d'ADN 5X, des mini-colonnes d'ADN à centrifugation 1min/13000 g, de 700 μ L wash buffer. Afin de purifier les produits de PCR, une centrifugation pendant 1 min à 13000 g a été effectuée après ajout du Kit de purification. Ensuite le tampon d'éluion d'une quantité de 30 μ L a été ajouté et l'ensemble a été incubé à la température ambiante durant 2 min. Finalement une autre centrifugation a été effectuée 13000 g durant 1 min.

2.2.5.2.2.3. Préparation de gel d'agarose

Un gel d'agarose de 1,2 % (m/v) a été préparé pour la migration des produits d'amplifications. La préparation a consisté à peser une quantité de 1,2 g d'agarose et à l'introduire dans un volume de 98,8 mL de tampon TAE 1X contenu dans un récipient (erlenmeyer). L'ensemble est porté à l'ébullition à une température de 100 °C dans un microonde jusqu'à l'obtention d'un mélange incolore. La solution obtenue a été coulée dans une cuve munie de peigne à une température 47 °C (+/- 2 °C). Après solidification, le gel est utilisé pour la réalisation de l'électrophorèse.

2.2.5.2.2.4. Electrophorèse des fragments des régions hypervariables de l'ARN 16 S (F27/R520) par PCR

L'électrophorèse du produit de l'amplification ou amplicon a été réalisé sur gel d'agarose de 1,2 %. Cette technique a pour but de séparer les fragments (des molécules) en fonction de leurs tailles et de leurs charges dans un champ électrophorétique. Ainsi, les molécules de petites tailles migrent plus rapidement, sur une période donnée et plus loin que les molécules de grandes tailles. L'électrophorèse a consisté à prélever un volume de 6 μ L de chaque produit de PCR et réalisé un mélange avec 2 μ L de tampon de charge 6X (VWR, Sciences) dans des tubes

Matériel et Méthodes

Eppendorf de capacité 1,5 mL stériles. Ensuite, les mélanges sont introduits dans les puits du gel à l'aide d'une micropipette ajustable. Aussi, dans le premier puits de chaque gel, un marqueur de poids moléculaire d'une taille de 100 pb est introduite à raison de 7 µL. La migration est réalisée sous une tension électrique de 125 volts pendant 30 minutes dans un tampon de TAE 1X. Après migration, le gel a été incubé dans un bain contenant un volume de 500 mL de TAE 1X additionné d'un volume de 7 µL du GelRed pendant 45 min. La visualisation des bandes correspondant aux fragments des gènes est alors effectuée dans un transilluminateur sous la lumière à rayons ultra-violet. En somme, les échantillons dont la taille des bandes correspond à la taille attendue au regard du marqueur moléculaire sont qualifiés de résultats positifs.

2.2.5.2.2.5. Séquençage des souches présomptives de bactéries psychrotrophes isolées

Les amplicons issus de la PCR précédente ont été purifiés avec le Kit BigDyeXterminator (Thermo Fisher Scientific) avant d'être analysés sur le séquenceur capillaire ABI3730XL 96 (Thermo Fisher Scientific). Cette partie du travail a été réalisée au Laboratoire Paul Sabatier de l'Université de Toulouse III (France). En outre, la méthode de séquençage utilisée est celle de Sanger.

2.2.6. Appréciation de la qualité microbiologique des salades de quatrième gamme

Les résultats obtenus après analyse microbiologique sont comparés aux critères de référence fixés par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) pour apprécier la qualité microbiologique ou la conformité des échantillons analysés. Les résultats sont interprétés selon un plan à deux classes pour *Salmonella* spp dont la présence rend l'aliment impropre à la consommation humaine, et un plan à trois classes a été utilisé pour tous les autres microorganismes étudiés (Tableau VII).

Dans un plan d'échantillonnage à deux classes, les échantillons analysés sont divisés en deux catégories, satisfaisant et insatisfaisant, basées sur une valeur limite « $m=M$ ». Cependant, dans un plan à trois classes m représente le seuil minimal du nombre de germes présent dans un gramme de produit analysé. Si le résultat trouvé est inférieur ou égal à m alors la qualité microbiologique du produit est considérée comme satisfaisante. En outre M désigne le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants. Ainsi, les résultats trouvés entre m et M , correspondent à une qualité microbiologique Acceptable.

Tableau VII : Critères microbiologiques applicables à la salade de 4^{ème} gamme (Mutsch, 2018)

Germes	Critères microbiologiques (UFC/g)		Signification	Références
	m	M		
<i>Escherichia coli</i>	10 ²	10 ³	Santé 2/CSA	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ²	10 ³	Santé 2/CSA	
Levures, Moisissures	10 ⁴	10 ⁵	CHP	Jouve (C.E.
Germes Aérobie Totales	10 ⁷	10 ⁸	CHP	n°2073/2005).
<i>L. monocytogenes</i>	100 dans 25 g d'aliment		Santé 2/CSA	
<i>Salmonelles</i>	Absence dans 25 g d'aliment		Santé 1/CSA	

- CHP : Critère d'hygiène du procédé
- CSA : Critères de sécurité alimentaire
- Santé 1 : Le danger indiqué représente un risque direct et élevé pour la santé de la population avec des conséquences imminentes sérieuses.
- Santé 2 : Le danger indiqué pour la santé représente un risque pour la santé des êtres humains si les microorganismes sont excédés les seuils

2.2.7. Evaluation du potentiel de la virulence et de la résistance aux antibiotiques des souches identifiées

2.2.7.1. Détermination des gènes de virulence des souches de *E. coli* et de *S. aureus* isolés.

Cette partie du travail a été réalisé à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa. Précisément, au Laboratoire d'Agro valorisation (Unité Pédagogique de Biochimie et de microbiologie).

2.2.7.1.1. Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des bactéries a été effectuée selon deux méthodes. D'abord, l'extraction concernant les bactéries à Gram négatif a été réalisée conformément à la méthode utilisant le phénol/chloroforme (Lee *et al.*, 2003). Un volume de 1,5 mL de la préculture bactérienne au milieu LB a été centrifugé à 16000 tr/1 min pour sédimenter les cellules. Ensuite, le surnageant a été retiré. Le culot a été remis en suspension dans 600 µL de tampon de lyse composé de 9,34 mL de tampon Tris-EDTA (TE) (10 mM de Tris-Cl (pH 8,0) ; EDTA 1 mM (pH 8,0)), 600 µL de 10 % SDS et de 60 µL de protéinase K (20 mg.mL⁻¹). L'ensemble est passé au vortex pour une bonne homogénéisation du culot. Une incubation de 1 h à 37 °C a été effectuée. Un volume de 600 µL de phénol/chloroforme (v/v) a été ajouté sur les 600 µL de lysat et bien homogénéisé en retournant vigoureusement le tube jusqu'à ce que les phases soient complètement homogène. Après, une centrifugation a été exécutée à 16000 tours pendant 5 min à la température ambiante. Ensuite, un volume égal (v/v) de chloroforme (400 µL) a été ajouté à la phase aqueuse (400 µL) pour neutraliser l'effet du phénol. Encore une fois, les tubes ont été bien homogénéisés en les retournant. Puis, une centrifugation a été effectuée à 16000 tours pendant 5 min. Afin de précipiter l'ADN, un volume de 600 µL d'isopropanol (conserver dans un congélateur à -20 °C) égal à 3 fois le volume du surnageant (200 µL) a été ajouté et homogénéisé. Les tubes ont été par la suite incubés à -20 °C pendant 30 min. Après une centrifugation à 16000 tours pendant 15 min à une température de 4 °C le surnageant a été éliminé. Le culot de l'ADN a été lavé avec 1 mL d'éthanol à 70 % stocké à la température ambiante. Et, les tubes ont été centrifugés à 16000 tours pendant 2 min puis le surnageant a été éliminé. Pour sécher l'ADN, une incubation à 37°C pendant 30 min a été effectuée. Enfin, l'ADN génomique isolé a été suspendu dans le tampon (TE) de conservation (30 µL) et conservé à - 20 °C.

L'extraction d'ADN des bactéries à Gram positif a été réalisée par la méthode utilisant le CTAB (Gerard, 2016). L'extraction de l'ADN a débuté par une centrifugation d'un volume de 1,5 mL de la préculture bactérienne en milieu LB à 16000 tours pendant 5 min pour sédimenter les cellules. Puis, le surnageant a été éliminé. Un volume de 1,5 mL de tampon d'extraction CTAB1 composé de 20 g/L CTAB ; 1,4 mol/L NaCl ; 0,1 mol/L Tris ; 0,02 mol/L Na-EDTA ajusté à pH 8,0 à l'aide de HCl ou de NaOH et 5 µL de RNase (20 mg/mL) ont été ajoutés et homogénéisés (à l'aide d'un vortex). Les tubes ont été incubés pendant 30 min à 60 °C suivi d'une incubation (agiter après 15 min pour remettre la matière en suspension). Ensuite, une quantité de 10 µL de protéinase K (20 mg/mL) a été ajoutée et les tubes ont été vortexés.

Matériel et Méthodes

Durant 30 minutes (agiter après 15 min pendant l'incubation pour remettre la matière en suspension) les tubes ont encore été incubés à 60 (± 2) °C. Après une centrifugation pendant 10 minutes à 15000 g un volume de 900 μ L de surnageant a été transféré dans une nouvelle cupule à usage unique contenant 900 μ L de chloroforme. L'ensemble a été vortexé pendant 30 secondes. Ensuite une centrifugation durant 15 minutes à 15000 g a été effectuée et un volume de 650 μ L de surnageant a été transféré dans une nouvelle cupule à usage unique de 2 mL puis 1300 μ L de tampon de précipitation CTAB2 composé de 5 g/L CTAB, 0,04 mol/L NaCl ont été ajoutés. Le tout a été incubé pendant 60 minutes à température ambiante sans agitation. Pendant 15 minutes à 15000 g les tubes ont été centrifugés et le surnageant a été éliminé. Afin de purifier l'ADN, 700 μ L de la solution de NaCl (CTAB3) et 700 μ L de chloroforme ont été ajoutés au culot. Le mélange ainsi obtenu a été vortexé à « fond » pendant 30 secondes. Après avoir centrifugé ce mélange pendant 10 minutes à 15000 g, 600 μ L de la phase aqueuse ont été transférés dans une nouvelle cupule à usage unique de 2 mL et 2 fois cette phase (1200 μ L) d'un volume d'isopropanol froid (-20 °C) a été ajouté puis inversé manuellement 4 ou 5 fois. Les tubes ont été par la suite incubés pendant 20 minutes à température ambiante suivie d'une centrifugation de 15 minutes à 15000 g. Après cette étape, le surnageant a été éliminé et 500 μ L d'éthanol à 70 % ont été ajoutés au culot et de façon délicate les tubes ont été inversés 4 ou 5 fois. Cette étape a été suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 15000 g ainsi qu'une élimination du surnageant. Après ce lavage, les tubes ouverts ont été séchés dans une étuve pendant 30 minutes à 55 °C. L'ADN extrait a été suspendu dans 30 μ L du tampon TE et conservé dans un congélateur à une température de -20 °C.

2.2.7.1.3. Recherche des gènes de virulence

La recherche de gène de virulence a été effectuée également à l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa. Précisément, au Laboratoire d'Agro valorisation (Unité Pédagogique de Biochimie et de microbiologie).

2.2.7.1.3. 1. Amplification des gènes de shiga toxines 1 et 2 (*stx1* et *stx2*)

Afin de déterminer la virulence des souches d'*E. coli*, des PCR simplex ont été effectuées pour détecter les gènes de shigatoxine 1 et 2 (*stx1* et *stx2*). La méthode utilisée se réfère à celle décrite par Tahamtan *et al.* (2010) selon laquelle le mélange réactionnel final était de 20 μ L. Ce mélange était composé de 10 μ L de la solution 2 X Phusion Master Mix, 2 μ L d'amorces (sens et antisens) (Tableau VI), 2 μ L de la solution d'ADN et 6 μ L d'eau stérilisée nucléase free. Une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min a été effectuée et soumis à 30 cycles

d'amplification dans un thermocycleur d'ADN (Eppendorf Mastercycler Gradient). Les paramètres des cycles d'amplification ont été les suivants : une dénaturation pendant 30 s à 94 °C, une hybridation des amorces pendant 30 s à 56 °C, et une extension des amorces pendant 30 s à 72 °C avec auto-extension pendant 10 min à 72 °C. Six microlitres (6 µL) de produit PCR colorés avec 1 µL du tampon de charge 6X ont été analysés par électrophorèse sur gel agarose à 1,2 % (Tahamtan *et al.*, 2010).

2.2.7.1.3. 2. Amplification des gènes d'entérotoxines (*sea* et *seb*)

Staphylococcus aureus secrète 7 stéréotypes d'entérotoxines qui sont des protéines thermostables responsables d'intoxications alimentaires (Hennekinne *et al.*, 2013). Deux d'entre elles sont fréquemment détectées dans les intoxications (*sea*, *seb*). Ces deux entérotoxines ont été l'objet de recherche dans cette étude. La recherche des 2 gènes de virulence (*sea*, *seb*) a été effectuée par des PCR simplex. Les amplifications de l'ADN ont été réalisées à l'aide d'amorces décrites dans le Tableau VI. L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un Mini thermocycleur avec le programme de PCR suivant la méthode décrite par Mehrotra *et al.* (2000). Une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 min a été suivie de 35 cycles d'amplification (dénaturation à 94 °C pendant 2 min, hybridation à 57 °C pendant 2 min et extension à 72 °C pendant 1 min), se terminant par une extension finale à 72 °C pendant 7 min. Le produit de la PCR a été soumis à une électrophorèse sur un Gel d'agarose à 2 %.

2.2.7.2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

La méthode utilisée est la technique de diffusion de l'antibiotique en milieu gélosé. Cette technique est subdivisée en plusieurs étapes selon la méthode proposée par le comité d'antibiogramme de la société Française de microbiologie.

2.2.7.2.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture de 24 h des souches à tester, une suspension bactérienne a été réalisée en solution de NaCl (0.85%) de volume 2 mL pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de Mc Farland ; ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ cellules/mL. Pour ce faire, plusieurs colonies de même morphologie (si possible) ont été prélevées afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Ces colonies ont été mises en suspension dans de l'eau physiologique. Cette méthode convient pour toutes les bactéries. La suspension bactérienne ainsi obtenue a été standardisée à l'aide du témoin 0,5 Mc Farland. L'ajustement de la densité de l'inoculum réalisé a été effectuée à l'aide d'un Densitomètre. (CASFM/EUCAST, 2021).

2.2.6.2.2. Ensemencement

Il a consisté à plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et à éliminer l'excès de liquide en tournant cet écouvillon sur les parois du tube. Il est important d'éliminer l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif. La totalité de la surface de la gélose Mueller Hinton (MH) a étéensemencée dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

2.2.6.2.3. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique

Cette étape a consisté à déposer chaque disque imprégné de l'antibiotique à tester fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée, manuellement, avec une pince métallique stérile ou à l'aide d'un distributeur de disques d'antibiotiques. Les disques une fois déposés, ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide. Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Les différents antibiotiques à poser sur les germes identifiés ont été listés dans le tableau V. Les boîtes ont été incubées dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques, sans excéder 30 min. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies. Les boîtes ont été incubées à 37 °C en aérobiose pendant 16 à 24 h.

2.2.4.2.4. Lecture

La lecture a été faite par mesure du diamètre de la zone d'inhibition obtenu autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'un système automatisé (ADAGIO). Les diamètres de la zone d'inhibition sont spécifiques à chaque germe (CASFM/EUCAST, 2021). L'interprétation est sensible (S) ou résistante (R) ou intermédiaire (I).

2.2.7. Analyse bioinformatique des données

L'analyse bioinformatique a été réalisée sur les données issues du séquençage moléculaire des microorganismes potentiellement pathogènes des salades analysées. En effet, les séquences obtenues après séquençage ont été comparées à des séquences homologues contenues dans la base de données de séquences du National Center for Biotechnology Information (NCBI) en utilisant le programme Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) (Boumba *et al.*, 2022). Après identification des espèces, les séquences d'ADN des différents échantillons ont été alignées avec le logiciel Jalview en utilisant l'algorithme Clustal Omega avec les paramètres par défaut. Ainsi, la construction de l'arbre phylogénétique a été effectuée sur le logiciel

MEGA11. Aussi, une analyse qualitative des séquences de *L. fusiformis* et de *L. monocytogenes* a été effectuée par une Dotmatrix. De plus, des alignements globaux entre les deux espèces *L. fusiformis* et de *L. monocytogenes* à travers le programme needle ont été réalisés pour traduire la similarité des nucléotides.

2.2.8. Analyses statistiques

2.2.8.1. Analyses des données d'enquête

La saisie de données brutes de l'enquête a été effectuée sur le logiciel Epi Info version 7.2.5.0. Ensuite, les données ont été exportées sur le Microsoft Excel 2019 puis converties en fichier CSV (séparateur : point-virgule) afin de réaliser les analyses statistiques sur le logiciel R version R64×4.1.2 dans Rstudio. En effet, les différents tests ont été possible sur le logiciel R grâce l'utilisation de plusieurs packages comme Ade4, questionr, gtsummary, GGally, ggplot2, vcd. Enfin, les différences significatives ont été prouvés par les tests de khi2 ou tests de khi2 résiduel (Boko & Angaman, 2021).

2.2.8.2. Analyses des données physico-chimiques

La variabilité des données physico-chimiques des types de salades a été observée grâce à la réalisation du cosinus carré. Une visualisation des échantillons a été réalisée dans un espace bidimensionnel en fonction des paramètres évalués par une Analyse en Composante Principale (ACP). Ces analyses ont été réalisées à travers le logiciel R de version R64×4.1.2 dans Rstudio (Boko & Angaman, 2021).

2.2.8.3. Analyses des données microbiologiques

La significativité de l'évolution des charges bactériennes en fonction du temps de conservation a été appréciée grâce au test LSD de Fisher. De ce fait une analyse de variance (ANOVA) au seuil de 5 % à travers le package Rcmdr du logiciel R a été effectuée. HeatMap clustering a été réalisé afin de regrouper les salades en fonction de leur concentration en microorganismes. Pour mieux apprécier la qualité microbiologique des salades contaminées, une analyse des correspondances multiples (ACM) a été réalisée. Cette dernière a été aussi réalisée sur les données de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Ces analyses font également référence à celles décrites par Boko & Angaman (2021) réalisées à travers le logiciel R de version R64×4.1.2 dans Rstudio.

**TROISIEME PARTIE :
RESULTATS ET
DISCUSSION**

3.1. RESULTATS

3.1.1. Enquête

3.1.1.1. Caractéristiques sociodémographiques de la population enquêtée

Au cours de cette étude, 1169 personnes ont été interrogées. Les résultats ont révélé que les personnes enquêtées étaient majoritairement des hommes avec un effectif de 627 soit 54 % contre 542 femmes, soit 46 % (Figure 15). Les personnes interrogées avaient en majeure partie un âge compris entre 25 et 35 ans avec une proportion de 31 % suivies des personnes dont l'âge était compris entre 15 et 25 ans soit une proportion de 29 % (Figure 16). La population de plus de 65 ans était minoritaire avec un taux de 0,20 %. Cette population, qui a fait l'objet d'étude était dominée par les célibataires (70 %), avec un niveau d'instruction dominé par le niveau supérieure (61 %) contrairement aux analphabètes qui sont minoritaires avec un taux de 3 % (Figure 17). Par ailleurs, cette étude a enregistré plus de personnes qui avaient pour lieu d'habitation Cocody et Yopougon avec des proportions respectives de 40 et 29 % (Figure 18). La plupart d'entre-elles sont des personnes sans emploi (32 %) et des cadres du secteur privé (29 %) comme le montre la figure 19.

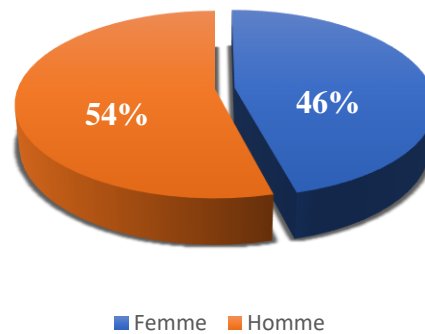


Figure 15 : Distribution du sexe de la population enquêtée

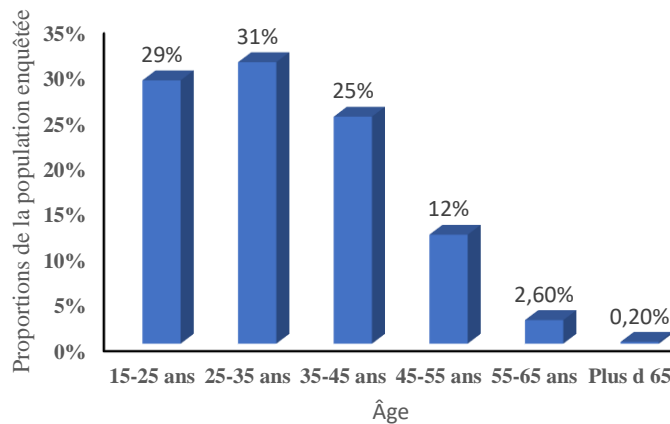


Figure 16 : Distribution de l'âge des personnes enquêtées

Résultats et Discussion

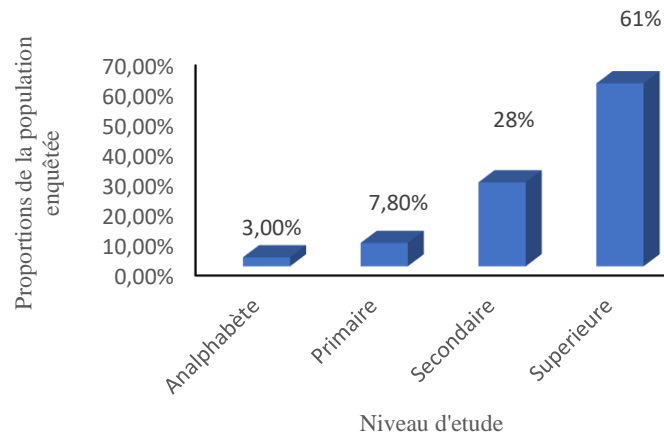


Figure 17 : Niveau d'instruction des personnes enquêtées

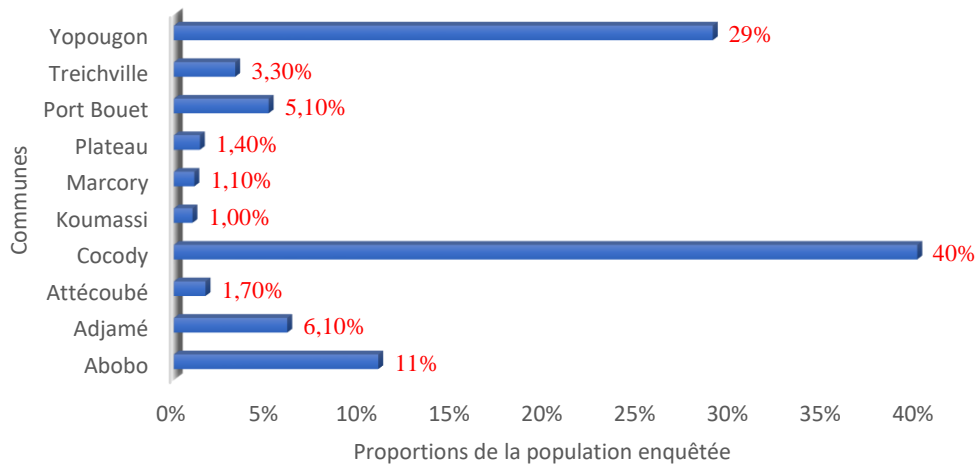


Figure 18 : Répartition des personnes enquêtées en fonction de la commune

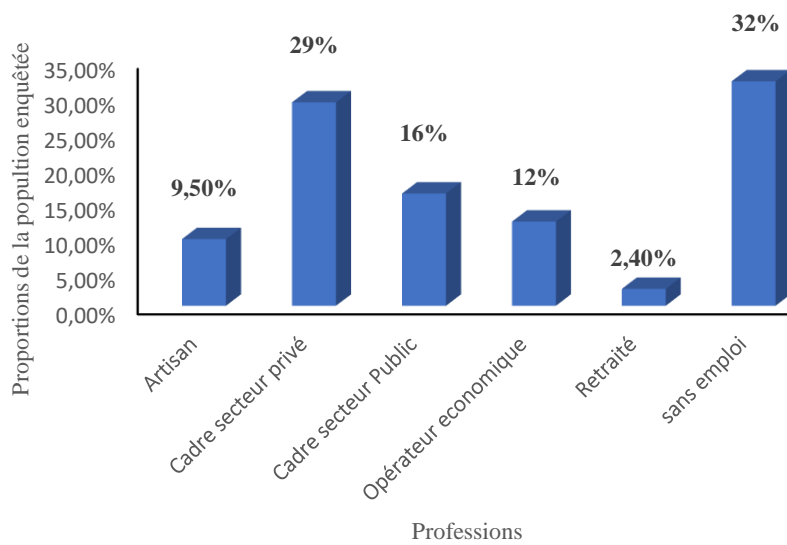


Figure 19 : Professions des personnes enquêtées

Résultats et Discussion

3.1.1.2. Niveau de connaissance de la population abidjanaise enquêtée pour les salades prêtes à consommer

La plupart des personnes enquêtées connaissent les salades prêtes à consommer soit 78 % de la population enquêtée, contre 22 % qui ne connaissent pas (Figure 20). Ainsi, la distribution de la connaissance des salades prêtes à consommer en fonction des caractéristiques sociodémographiques s'est avérée significative au niveau du taux de connaissance en fonction de la commune ($\text{Khi}^2 = 75,796$; $\text{df} = 9$; $\text{p-value} = 1,1.10^{-12}$). Au niveau de Cocody les personnes qui connaissent ces aliments sont largement supérieures à celles qui n'en connaissent pas (Figure 21). Cependant, au niveau d'Adjamé et à Abobo le nombre de personnes ne connaissant pas les salades prêtes à consommer est largement supérieur à celui de ceux qui connaissent (Figure 22). Le taux de connaissance en fonction de la profession s'est avéré également significatif ($\text{Khi}^2 = 41,566$; $\text{df} = 5$; $\text{p-value} = 7,211.10^{-8}$). La représentation graphique du Khi^2 montre que la connaissance des salades prêtes à consommer dans la ville d'Abidjan est liée à la profession (Figure 23). Ainsi, les cadres supérieurs du privé sont les plus informés de l'existence des salades prêtes à consommer. Par contre les artisans sont les moins informés.

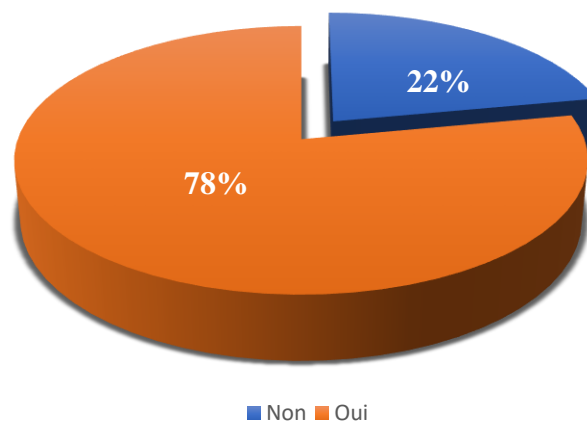


Figure 20 : Proportion des personnes enquêtées connaissant les salades prêtes à consommer

Résultats et Discussion

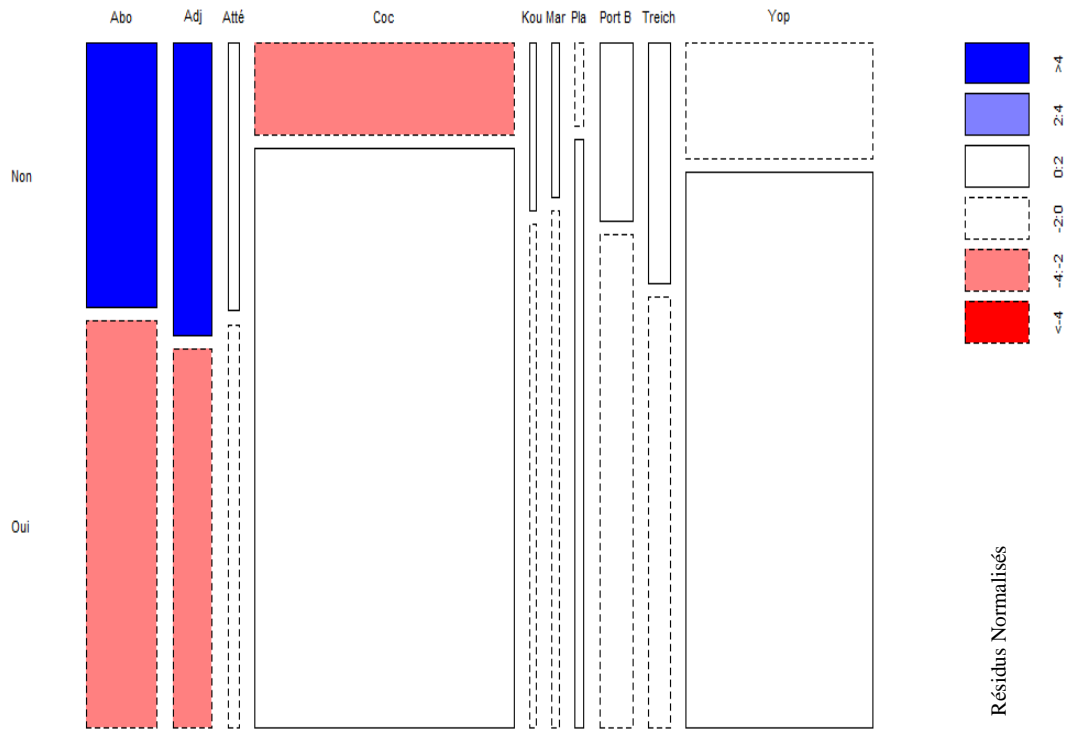


Figure 21 : Distribution de la connaissance des salades de 4^{ème} gamme en fonction de la commune des personnes enquêtées.

Abo : Abobo ; **Adj :** Adjamé ; **Atté :** Attécoubé ; **Coc :** Cocody ; **Kou :** Koumassi ; **Mar :** Marcory ; **Pla :** Plateau ; **Port B :** Port-Bouët ; **Treich :** Treichville ; **Yop :** Yopougon.

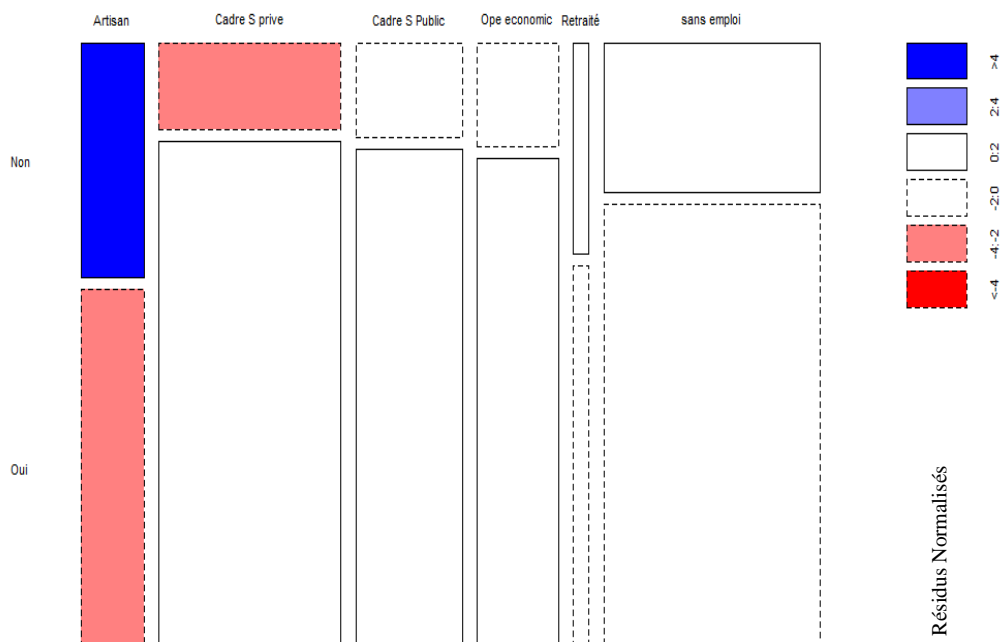


Figure 22 : Distribution de la connaissance des salades prêtes à consommer en fonction de la profession des personnes enquêtées

Cadre S privé : Cadre du secteur privé ; **Cadre S public :** Cadre du secteur public ; **Ope economic :** Opérateurs économiques

3.1.1.3. Proportion des consommateurs de salades de 4^{ème} gamme

L'enquête réalisée montre que plus de la moitié de la population interrogée consomme ces aliments soit un taux de 59 % contre 41 % qui n'en consomme pas (Figure 24). La distribution de la consommation en fonction de la connaissance montre que 75 % des personnes qui connaissent les salades de 4^{ème} gamme en consomment. Ainsi, une réalisation de tableaux croisés dynamiques a été effectuée en se basant sur les résultats de l'enquête (Figure 25). L'analyse des résultats met en exergue la consommation des salades de 4^{ème} gamme en fonction de certaines caractéristiques sociodémographiques comme : la commune, le sexe, l'âge, le niveau d'instruction et la profession. Une différence significative a été observée au niveau de la consommation en fonction de la commune ($\text{Khi}^2 = 54,389$, $\text{df} = 9$, $\text{p-value} = 1,592 \cdot 10^{-8}$). Il a été constaté que le taux de consommation des salades de 4^{ème} gamme est plus élevé dans la commune de Cocody. En effet, sur l'ensemble des personnes résidant dans la commune de Cocody interrogé, une proportion de 70,9 % consomme ces aliments contre 29,1 % qui n'en consomme pas. Les tests statistiques ont aussi montré que la consommation est liée au sexe ($\text{Khi}^2 = 8,9187$; $\text{df} = 1$; $\text{p-value} = 0,002823$). En effet, la proportion des femmes qui consomme les salades de 4^{ème} gamme est largement supérieure (63,7 %) à la valeur attendue. Il en est de même au niveau des hommes (54,9 %). La consommation des salades 4^{ème} gamme est également liée à la profession ($\text{Khi}^2 = 46,42$; $\text{df} = 5$; $\text{p-value} = 7,46 \cdot 10^{-9}$). Le constat est fait au niveau des opérateurs économiques où le nombre des personnes qui consomment (69,2 %) est supérieur à celui des personnes qui n'en consomment pas (30,8 %). La même observation a été faite au niveau des cadres du secteur privé dont 67,2 % contre 32,8 %. Par contre, cette consommation n'est significativement pas influencée par l'âge de la population enquêtée ($\text{p-value} = 0,1477 > 0,05$ avec résidus de khi2 compris entre -3 et 3) ni par le niveau d'instruction ($\text{df} = 3$, $\text{p-value} = 0,2286$). Aussi, une proportion de 57 % des enquêtées consomment au plus une fois par semaine contre 43 % qui en consomme au moins une fois par semaine ($\text{Khi}^2 = 14,806$; $\text{df} = 1$; $\text{p-value} = 0,0001192$) (Figure 26). Cependant, la consommation en fonction du type de salade (Figure 30) ne révèle pas de différence significative ($\text{Khi}^2 = 0,013062$, $\text{df} = 1$; $\text{p-value} = 0,909 > 0,05$). Enfin, les salades sont plus consommées au diner et au déjeuner (Figure 27) qu'au petit déjeuner et autres.

Résultats et Discussion

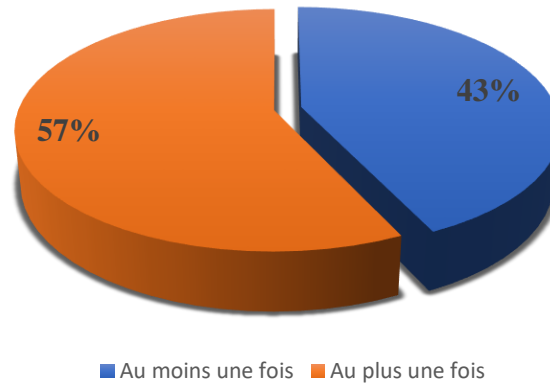


Figure 25 : Fréquence de consommation des salades prêtes à consommer par semaine

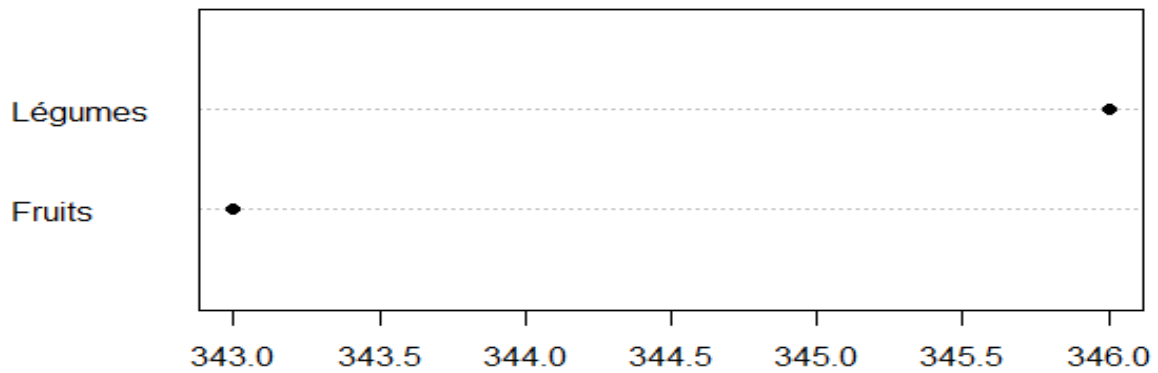


Figure 26 : Préférence sur le type de salade consommée par la population abidjanaise

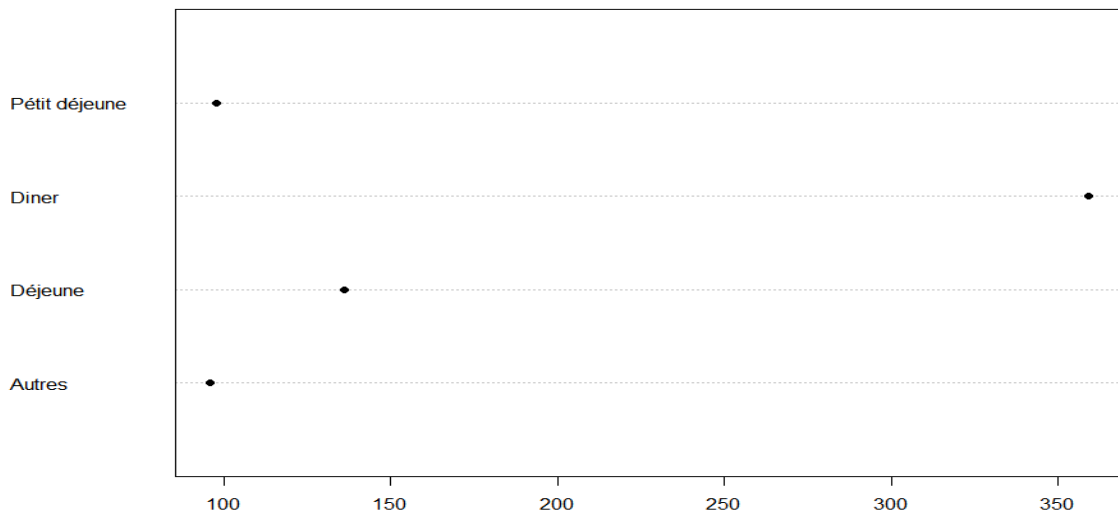


Figure 27 : Moments de consommation des salades prêtes à consommer

Résultats et Discussion

3.1.1.4. Fréquence des malaises après consommation des salades de 4^{ème} gamme

Par rapport aux cas d'infection liés à la consommation de ces aliments une proportion 25 % de la population a affirmé avoir eu un malaise après consommation (Figure 28). Le symptôme le plus fréquemment rapporté est la diarrhée dans 54 % des cas (Figure 29). De plus, l'analyse bivariée (Mosaic plot en 3 dimensions) (Figure 30) montre qu'il n'existe pas de corrélation entre le type de salade consommée et les symptômes ($p\text{-value} = 0,2859 > 0,05$). Aussi, il n'y a pas de lien entre le type de salade consommée et les malaises à travers les proportions représentées par les différentes couleurs ($p\text{-value} = 0,1097 > 0,05$).

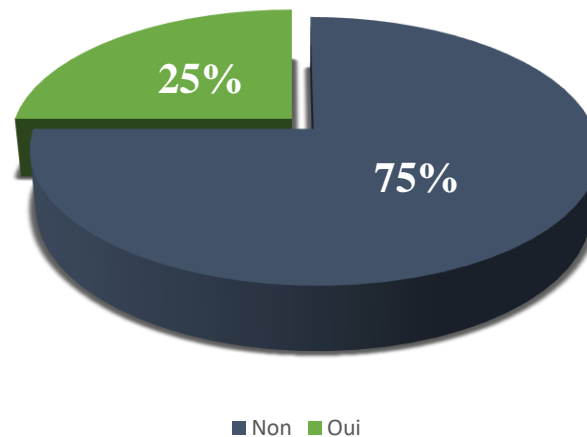


Figure 28 : Cas de malaise lié à la consommation des salades de 4^{ème} gamme par semaine

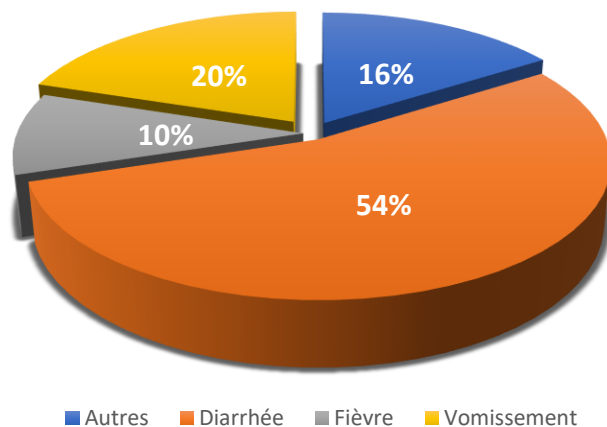


Figure 29 : Symptômes des malaises liés à la consommation des salades de 4^{ème} gamme

Résultats et Discussion

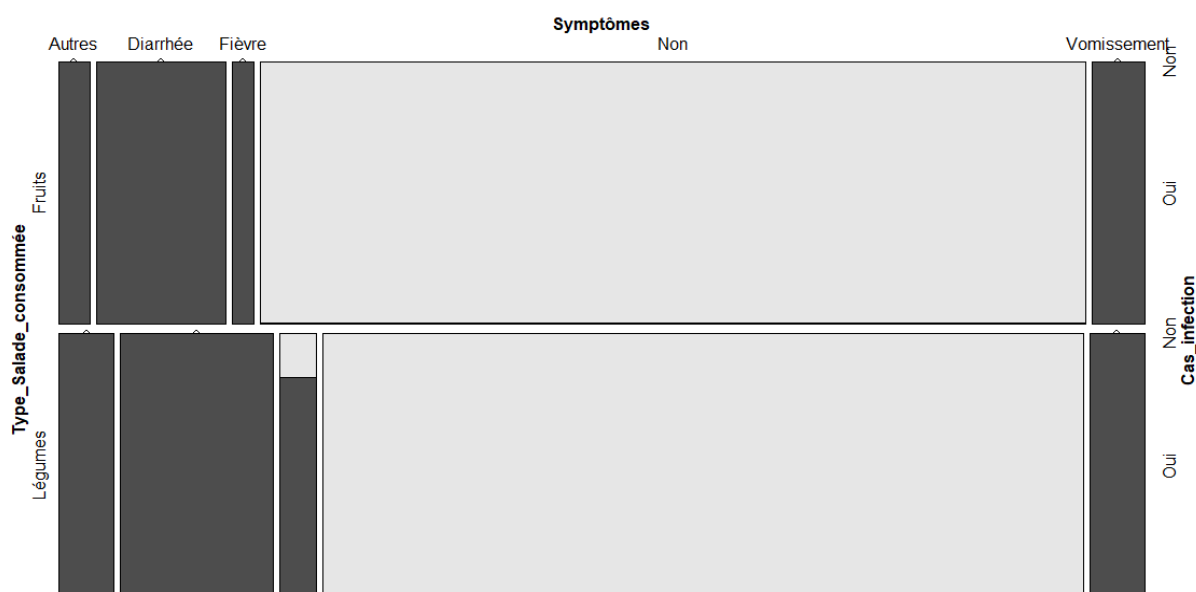


Figure 30 : Relation entre cas de malaises, symptômes et type de salade consommée

3.1.3. Valeurs des paramètres physicochimiques des salades prêtes à consommer évaluées

Le tableau VIII montre les valeurs des paramètres physico-chimiques des salades étudiées. Selon les résultats, les salades analysées ont des teneurs en eau qui varient entre $80,00 \pm 0,02$ et $95,92 \pm 0,16$ %. Les salades Meli Melo (SME), feuilles de Chênes Vertes (SChV) et 100 % cœur de frisée (Cf) ont enregistré les valeurs les plus élevées avec $95,92 \pm 0,16$ %, $95,30 \pm 0,63$ % et $95,08 \pm 0,41$ % respectivement.

Les pH enregistrés sont compris entre $2,70 \pm 0,12$ chez les salades de fruits composés (SFC) et $7,91 \pm 0,78$ chez les salades Epinards (Ep). Il s'est avéré que les différents types de salades analysées au cours de cette étude ont généralement un pH inférieur à 7 sauf les salades d'Epinards (Ep), de Mâches (Ma) et Mâches + Roquettes (MR) avec des valeurs respectives de pH $7,91 \pm 0,78$; $7,29 \pm 0,66$ et $7,42 \pm 0,66$. L'acidité des salades a oscillé entre 92 ± 6 chez les salades (JP) et 1144 mEq/100g chez la (SFC). En outre, l'analyse statistique a révélé une différence significative entre les valeurs d'acidité de ces salades.

Quant à l'extrait sec soluble des salades étudiées, l'analyse statistique a révélé une différence significative. Les salades SCB et SChV ont présenté les indices de réfraction les plus faibles avec respectivement $1,00 \pm 0,00$ et $1,01 \pm 0,17$. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées au niveau des salades SFR ($15,05 \pm 0,09$) et SFP ($13 \pm 1,2$).

L'observation du graphe « Scree plot » montre clairement que 2 composantes peuvent être extraites pour l'analyse en composante principale. En réalité, 80,30 % des informations

Résultats et Discussion

contenues au niveau des données physico-chimiques sont conservées par les 2 premières composantes (Figure 31). Aussi, la visualisation du cosinus carré montre que les dimensions (Dim.1 et Dim.2) sont les plus importantes pour expliquer la variabilité des jeux de données physico-chimiques des salades analysées (Figure 31). L'Analyse en Composante Principale (ACP) a été réalisée sur les paramètres physico-chimiques. Ainsi, les variétés de salades et les paramètres physico-chimiques ont été représentés de façon simultanée dans les dimensions 1 et 2 (Figure 32). L'analyse révèle que les salades étudiées ont des caractéristiques qui diffèrent d'une salade à l'autre au point où les salades SFR et SFC se démarquent des autres. Il ressort aussi, de cette analyse que les salades SME, Cf, SN, SCB, SChV et SFPM sont caractérisées par leur forte teneur en eau. Par ailleurs, les salades SCH, JP, MR, Ma, Rq et Ep sont caractérisées par leur pH élevé. En outre, les salades SFC, SCOM, SA sont marquées par leur acidité élevée. Cependant, l'indice de refraction élevé est la principale caractéristique des salades SFR, SFPC, SFPA, SCA et SFP (Figure 32).

Résultats et Discussion

Tableau VIII : Valeurs des paramètres physico-chimiques salades de 4^{ème} gamme évaluées

	Salades	pH	IR (°BRIX)	AT (mécq.g/100 g)	TE (%)
Salades essentiellement de 4^{ème} gamme avec un seul ingrédient	Ep	7,91 ± 0,78 ^h	1,81 ± 0,18 ^a	120 ± 20 ^{ab}	88,48 ± 0,15 ^{bc}
	Ma	7,29 ± 0,66 ^{fh}	2,26 ± 0,05 ^{ab}	160 ± 20 ^{cd}	92,35 ± 0,05 ^{cdf}
	Rq	6,29 ± 0,44 ^{deh}	4,04 ± 1,11 ^{bc}	104 ± 4 ^{ab}	92,00 ± 1,00 ^{cde}
	SCB	5,00 ± 0,72 ^{ce}	1,00 ± 0,00 ^a	132 ± 2 ^{bc}	93,00 ± 0,2 ^{df}
	SCA	4,17 ± 1,39 ^{ac}	7,56 ± 0,36 ^d	172 ± 2 ^{de}	90,40 ± 0,20 ^{bd}
	SCH	6,80 ± 0,57 ^{eh}	5,11 ± 0,10 ^c	240 ± 2 ^g	94,70 ± 1,00 ^{ef}
	SFR	3,61 ± 0,25 ^{ac}	15,05 ± 0,09 ^f	304 ± 3 ^h	80,00 ± 0,02 ^a
	SFP	4,58 ± 0,35 ^{acd}	13,00 ± 1,20 ^f	172 ± 1 ^{de}	89,68 ± 0,01 ^{bd}
Salades mixtes essentiellement de 4^{ème} gamme	Cf	4,10 ± 1,09 ^{ac}	2,56 ± 0,60 ^{ab}	132 ± 32 ^{bc}	95,08 ± 0,41 ^{ef}
	MR	7,42 ± 0,66 ^{gh}	2,22 ± 0,20 ^{ab}	184 ± 4 ^{de}	91,76 ± 0,09 ^{cde}
	JP	6,64 ± 1,06 ^{eh}	1,73 ± 0,05 ^a	92 ± 6 ^a	92,41 ± 0,36 ^{df}
	SME	5,37 ± 0,05 ^{cef}	04 ± 0,03 ^{bc}	224 ± 4 ^{fg}	95,92 ± 0,16 ^f
	SChV	5,41 ± 0,22 ^{cefg}	1,01 ± 0,17 ^a	200 ± 2 ^{ef}	95,30 ± 0,63 ^{ef}
	SFPA	3,51 ± 0,30 ^{ac}	10,45 2,14 ^e	332 ± 1 ^h	90,04 ± 0,34 ^{bd}
	SFPC	2,83 ± 0,37 ^a	10,16 ± 0,64 ^e	412 ± 1 ⁱ	89,68 0,01 ^{bd}
	SFC	2,70 ± 0,12 ^a	10,00 ± 1,00 ^e	1144 ± 2 ^l	90,39 ± 0,02 ^{bd}
Salades mixtes (salades de 4^{ème} gamme et produits carnés)	SFPM	4,85 ± 0,32 ^{bce}	3,05 ± 0,11 ^{ac}	772 ± 1 ^k	95,06 ± 0,04 ^f
	SA	4,27 ± 0,47 ^{acd}	2,97 ± 0,33 ^{ac}	800 ± 1 ^k	86,52 ± 4,02 ^b
	SN	3,94 ± 0,78 ^{ac}	2,93 ± 0,15 ^{ab}	172 ± 4 ^{de}	92,73 ± 2,93 ^{df}
	SCOM	4,23 ± 0,05 ^{ab}	3,14 ± 0,37 ^{ac}	612 ± 2 ^j	89,37 ± 1,95 ^{bd}

Ep : Epinards ; *Ma* : Mâches ; *Rq* : Roquettes ; *Cf* : 100% Coeur de frisés ; *MR* : Mâches + Roquettes ; *JP* : Jeunes Pousses ; *SCB* : Céleri Branche ; *SCA* : Salades Carottes ; *SA* : Salades Aperitives ; *SCH* : Salades Choux ; *SN* : Salades Nicoises ; *SCOM* : Salades Composées ; *SME* : Salades Meli Melo ; *SFC* : Salades de Fruits Composées ; *SChV* : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; *SFPC* : Salades de Fruits de Papaye + Citron ; *SFR* : Salades de Fruits de Raisin ; *SFPA* : Salades de Fruits de Papaye +Ananas ; *SFP* : Salades de Fruits Papaye ; *SFPM* : Salades de Fruits d'Ananas +Mangues.

IR : Indice de réfraction ; pH : potentiel d'hydrogène ; AT : Acidité Titrable ; TE : Teneur en eau

Les mêmes lettres dans la même colonne montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes. Cependant, il y a une différence significative lorsque les lettres sont différentes.

Résultats et Discussion

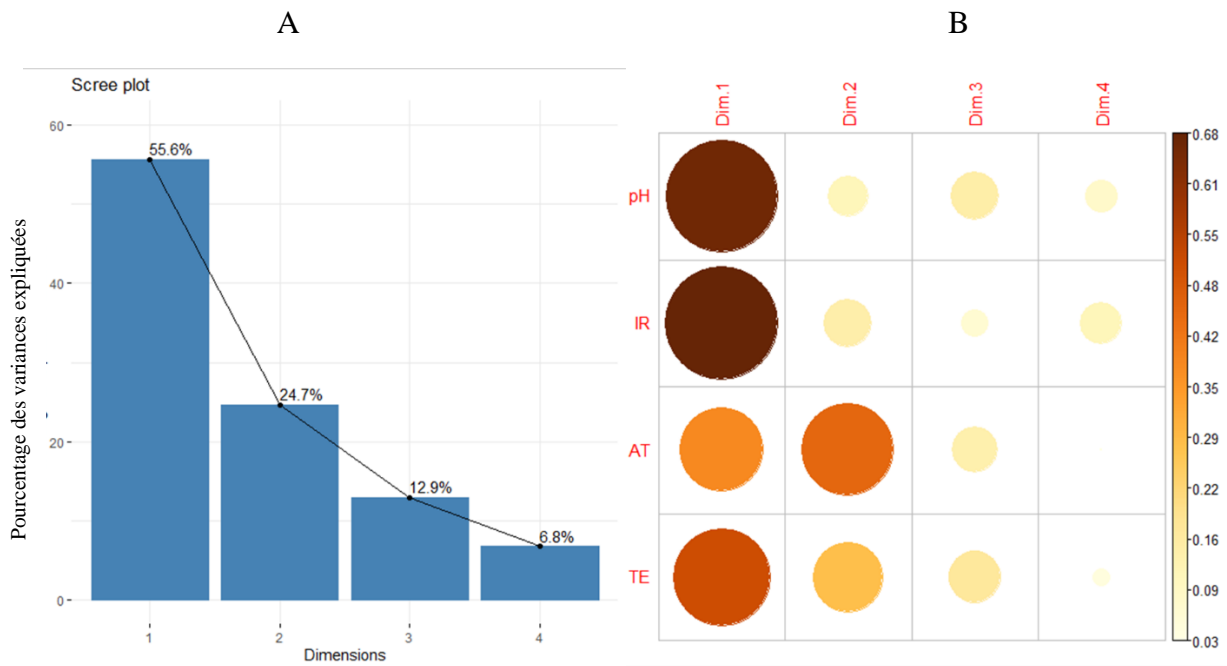


Figure 31 : Variance expliquées (A) et contribution des paramètres physico-chimiques (B) dans la représentation des dimensions

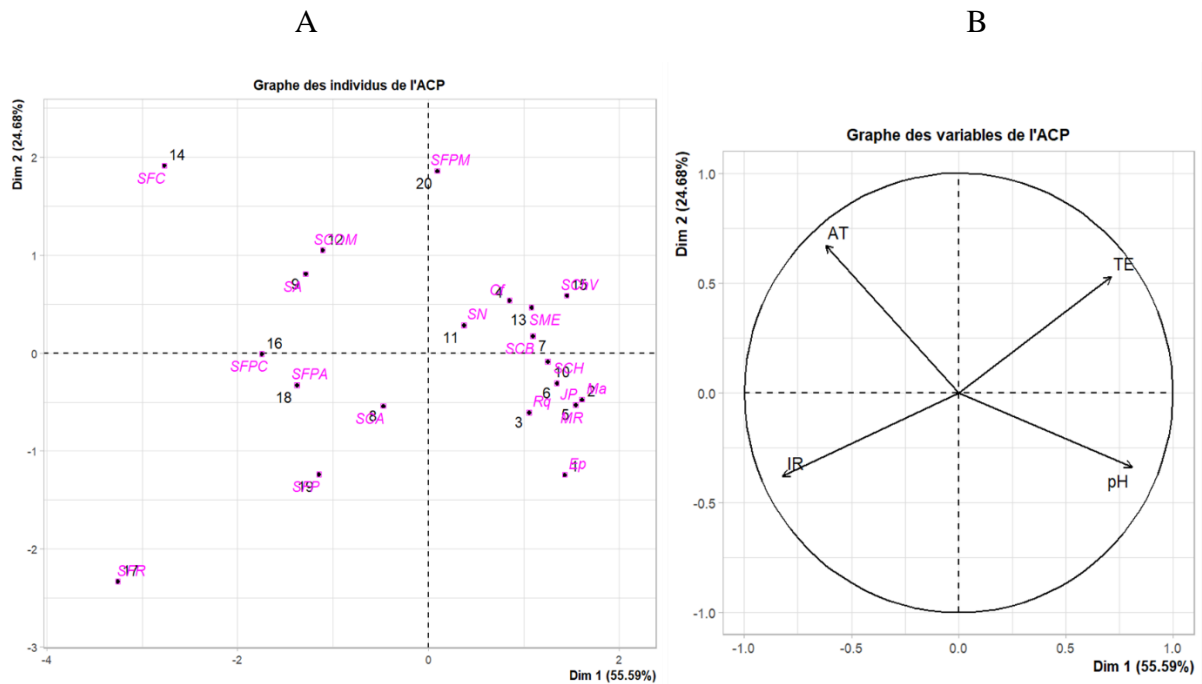


Figure 32 : ACP des paramètres physico-chimiques (B) et des différentes salades étudiées (A)

IR : Indice de réfraction ; pH : potentiel d'hydrogène ; AT : Acidité Titrable ; TE : Teneur en eau

3.1.4. Evolution de la croissance microbienne dans les salades prêtes à consommer

3.1.4.1. Qualité microbienne des salades prêtes à consommer à l'ouverture des emballages

A l'ouverture des emballages des différents échantillons de salades, les dénombrements de germes ont révélé la présence des Germes Aérobie Mésophile (GAM), de Psychrophiles (GAP) et de Flore Fongique (FF) revivifiables. L'aspect des colonies est présenté en annexe 4. Les charges moyennes obtenues à l'issue de ces analyses sont consignées dans le tableau IX. Celles des GAM varient entre $5,65.10^2 \pm 15$ et $1,69.10^8 \pm 1,11.10^7$ UFC/g. La plus petite charge a été observée au niveau des salades de Mâches (Ma) et la plus grande dans les salades Meli Melo (SME). La salade de Chêne Verte (SChV) détient une charge en GAM aussi importante ($1,62.10^8 \pm 1,11.10^7$ UFC/g) que celle des salades SME. Concernant les GAP, les charges moyennes varient entre $2,80.10^3 \pm 6,72.10^2$ et $1,88.10^8 \pm 2,04.10^7$ UFC/g avec la plus faible charge pour des salades de fruits composées de papaye et de citron (SFPC). La plus grande charge concerne les SChV suivie des SME ($1,32.10^8 \pm 1,13.10^3$ UFC/g). Quant à la flore fongique, elle a été absente dans certaines variétés de salades, mais abondante dans les SME avec une charge moyenne de $7,73.10^6 \pm 4,90.10^3$ UFC/g et les Salades de Fruits Papaye (SFP) de charge moyenne $6,33.10^6 \pm 0$ UFC/g. L'appréciation de la qualité microbiologique à l'ouverture de l'emballage a révélé une qualité plus satisfaisante au niveau des salades provenant d'Europe. Tandis que la plupart des salades produites en Côte d'Ivoire ont eu une qualité insatisfaisante (figure 33).

Résultats et Discussion

Tableau IX : Charges moyennes des germes dénombrés dans les salades de 4^{ème} gamme à l'ouverture des emballages

Types de salades	Salades	Germes		
		GAM (UFC/g)	GAP (UFC/g)	FF (UFC/g)
Salades essentiellement de 4 ^{ème} gamme avec un seul ingrédient	Ep	1,50.10 ⁵ ± 1,62.10 ⁴ a	1,45.10 ⁵ ± 1,55.10 ⁴ a	3,40 .10 ² ± 0 a
	Ma	5,65.10 ² ± 15 a	1,52.10 ⁵ ± 1,78.10 ⁴ a	<1
	Rq	1,75.10 ⁴ ± 2,25.10 ³ a	4,59.10 ⁴ ± 6,62.10 ³ a	<1
	SCB	1,08.10 ⁸ ± 0 e	1,83.10 ⁷ ± 0 b	6,57.10 ⁴ ± 2,80.10 ² b
	SCA	6,00.10 ⁶ ± 0 ab	7,20.10 ⁶ ± 0 de	4,26.10 ³ ± 0 a
	SCH	1,24.10 ⁸ ± 1,51.10 ⁷ e	8,93.10 ⁷ ± 5,97.10 ⁶ e	6,83.10 ⁵ ± 0 f
	SFR	5,42.10 ⁵ ± 1,45.10 ⁴ a	5,05.10 ⁵ ± 0 a	1,52.10 ⁴ ± 1,97.10 ² a
	SFP	1,27.10 ⁷ ± 9,43.10 ⁶ ab	1,59.10 ⁵ ± 1,68.10 ⁴ a	6,33.10 ⁶ ± 0 e
Salades mixtes essentiellement de 4 ^{ème} gamme	Cf	1,86.10 ³ ± 132 a	9,32.10 ⁴ ± 4,26.10 ³ a	<1
	MR	7,95.10 ² ± 15 a	5,46.10 ³ ± 10 ² a	<1
	JP	8,65.10 ⁷ ± 1,92.10 ² d	1,22.10 ⁴ ± 50 a	3,47.10 ² ± 12 a
	SME	1,69.10 ⁸ ± 1,11.10 ⁷ f	1,32.10 ⁸ ± 1,13.10 ³ f	7,73.10 ⁶ ± 4,90.10 ³ j
	SChV	1,62.10 ⁸ ± 1,11.10 ⁷ f	1,88.10 ⁸ ± 2,04.10 ⁷ g	1,07.10 ⁶ ± 0 g
	SFPC	1,05.10 ⁴ ± 6,38.10 ² a	2,80.10 ³ ± 6,72 .10 ² a	2,71.10 ⁵ ± 0 e
	SFPM	5,94.10 ⁵ ± 5,53.10 ⁵ ab	3,38.10 ⁶ ± 1,49.10 ⁶ ab	1,07.10 ⁶ ± 4,17.10 ² g
SFPA	5,47.10 ⁷ ± 5,53.10 ⁶ ab	7,22.10 ⁶ ± 0 a	2,73.10 ⁵ ± 0 e	
Salades mixtes (salades de 4 ^{ème} gamme et produits carnés)	SA	2,26.10 ⁷ ± 1,10.10 ⁷ b	7,36.10 ⁶ ± 0 ab	1,42.10 ⁶ ± 0 h
	SN	1,55.10 ⁶ ± 1,15.10 ⁴ a	4,11.10 ⁷ ± 1,36.10 ⁶ c	1,16.10 ⁵ ± 4,17.10 ² c
	SCOM	1,67.10 ⁵ ± 7,80.10 ⁴ a	6,76.10 ⁷ ± 0 d	2,01.10 ⁵ ± 9,80.10 ³ d
	SFC	1,40.10 ⁷ ± 6,63.10 ⁶ ab	1,31.10 ⁷ ± 0 ab	1,93.10 ⁵ ± 1,40.10 ⁴ d
Critères		m = 10⁷ ; M = 10⁸	m = 10⁷ ; M = 10⁸	m = 10⁴ ; M = 10⁵

Ep : Epinards ; Ma : Mâches ; Rq : Roquettes ; Cf : 100% Coeur de frisés ; MR : Mâches + Roquettes ; JP : Jeunes Pousses ; SCB : Céleri Branche ; SCA : Salades Carottes ; SA : Salades Aperitives ; SCH : Salades Choux ; SN : Salades Nicoises ; SCOM : Salades Composées ; SME : Salades Meli Melo ; SFC : Salades de Fruits Composées ; SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron ; SFR : Salades de Fruits de Raisin ; SFPA : Salades de Fruits de Papaye + Ananas ; SFP : Salades de Fruits Papaye ; SFPM : Salades de Fruits d'Ananas + Mangues

Les lettres en minuscules différentes dans la même colonne traduisent une différence significative entre les charges moyennes des microorganismes.

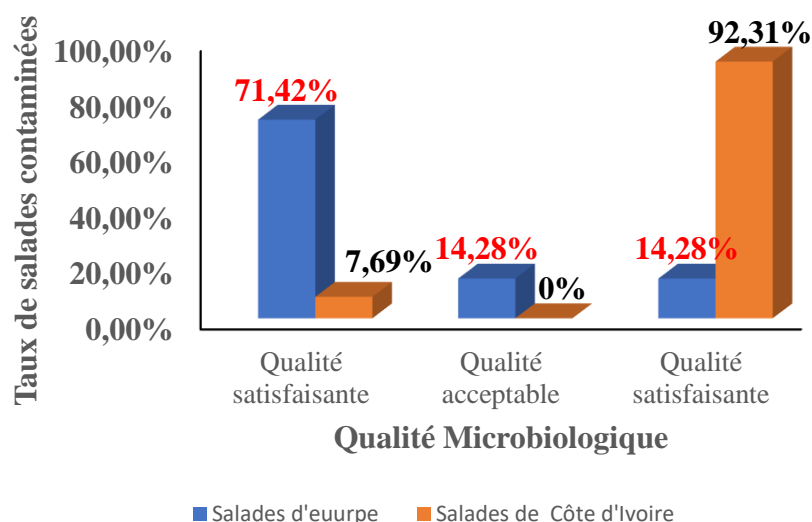


Figure 33 : Qualité microbiologique des salades en fonction de l'origine

Résultats et Discussion

3.1.4.2. Suivi de la croissance microbienne dans les salades après l'ouverture des emballages

Pour le suivi de la croissance des microorganismes durant la période de conservation, le dénombrement par intervalle de temps a donné les charges consignées dans le Tableau X. Après ouverture des emballages une évolution significative a été observée au niveau des charges microbiennes des salades analysées. D'abord, les charges moyennes des germes aérobies mésophiles sont comprises entre $5,65.10^2 \pm 15$ et $1,69.10^8 \pm 1,11.10^7$ UFC/g à l'ouverture des emballages (J0), entre $9,30.10^3 \pm 8,00.10^2$ et $4,89.10^9 \pm 6,15.10^6$ UFC/g au troisième jour d'analyse (J3) et de $4,93.10^4 \pm 4,75.10^3$ à $5,43.10^9 \pm 7,20.10^6$ UFC/g au septième jour des analyses. Les analyses statistiques ont montré une augmentation significative des charges moyennes des germes aérobies mésophiles dans tous les échantillons analysés après ouverture des emballages durant la période de conservation sauf chez la SCOM. Concernant les germes aérobies psychrophiles, les charges de $2,80.10^3 \pm 6,72.10^2$ à $1,88.10^8 \pm 2,04.10^7$ UFC/g à la réception des échantillons (J0) ont atteint les valeurs comprises entre $1,16.10^4 \pm 2,99.10^2$ et $6,59.10^8 \pm 0$ UFC/g au troisième jour (J3) puis entre $3,55.10^4 \pm 6,09.10^3$ et $4,53.10^9 \pm 3,25.10^5$ UFC/g au septième jour (J7). Au niveau de ce groupe de microorganismes, l'augmentation des charges moyennes s'est avérée significative pour tous les échantillons durant la conservation domestique. Enfin, les charges de la flore fongique variant entre $3,40.10^2 \pm 0$ et $7,73.10^6 \pm 4,90.10^3$ UFC/g au premier jour ont atteint les valeurs comprises entre $6,17.10^2 \pm 17$ à $1,50.10^9 \pm 9,97.10^3$ UFC/g au troisième jour et de $7,85.10^2 \pm 5$ et $5,50.10^9 \pm 4,92.10^4$ UFC/g au septième jour d'analyse. Outre, les salades Ma, Rq, Cf, et MR où il a eu absence de FF, les champignons se sont développés de façon significative dans les autres échantillons qui ont fait l'objet d'étude. Les charges les plus élevées ($5,5.10^9 \pm 0,49.10^5$ UFC/g) ont été observées dans les salades de fruits (SFPM).

Résultats et Discussion

Tableau X: Charges moyennes microbiennes durant la période de conservation domestique

xGermes Salades	Germes aerobies Mesophiles (UFC/g)			Germes aerobies Psychrophiles (UFC/g)			Flore Fongique (UFC/g)		
	J0	J3	J7	J0	J3	J7	J0	J3	J7
Ep	1,50.10 ⁵ ± 1,62.10 ⁴ a A	1,65.10 ⁶ ± 2,02.10 ⁵ a A	2,97.10 ⁷ ± 1,93.10 ⁷ bc B	1,45.10 ⁵ ± 1,55.10 ⁴ a A	1,70.10 ⁶ ± 3,11.10 ⁵ a A	2,32.10 ⁷ ± 8,80.10 ⁶ B	3,40.10 ² ± 0 a A	7,50.10 ² ± 0 a A	1,36.10 ² ± 3,40.10 ² a B
Ma	5,65.10 ² ± 15 a A	1,28.10 ⁶ ± 2,25.10 ⁵ a A	1,58.10 ⁷ ± 2,70.10 ⁶ ac B	1,52.10 ⁵ ± 1,78.10 ⁴ a A	1,72.10 ⁶ ± 3,11.10 ⁵ a A	2,34.10 ⁷ ± 8,82.10 ⁶ a B	<1	<1	<1
Rq	1,75.10 ⁴ ± 2,25.10 ³ a A	6,00.10 ⁴ ± 8,53.10 ³ a B	2,18.10 ⁵ ± 9,10 ³ a C	4,59.10 ⁴ ± 6,62.10 ³ a A	5,13.10 ⁵ ± 1,21.10 ⁴ a A	1,16.10 ⁷ ± 1,22.10 ⁶ a B	<1	<1	<1
Cf	1,86.10 ³ ± 132 a A	9,30.10 ³ ± 8,00.10 ² a B	4,93.10 ⁴ ± 4,75.10 ³ a C	9,32.10 ⁴ ± 4,26.10 ³ a A	3,19.10 ⁵ ± 2,80.10 ⁴ a B	2,22.10 ⁶ ± 2,50.10 ⁴ a C	<1	<1	<1
MR	7,95.10 ² ± 15 a A	1,48.10 ⁶ ± 3,25070 a B	8,41.10 ⁶ ± 7,10 ² a C	5,46.10 ³ ± 10 ² a A	1,62.10 ⁶ ± 1,23.10 ⁵ a B	6,37.10 ⁶ ± 4,25.10 ³ a C	<1	<1	<1
JP	8,65.10 ⁷ ± 1,92.10 ² d A	1,39.10 ⁸ ± 1,63.10 ³ g B	1,48.10 ⁸ ± 7,75.10 ³ fg C	1,22.10 ⁴ ± 50 a A	1,63.10 ⁸ ± 2,23.10 ⁶ b B	8,05.10 ⁷ ± 10000 a C	3,47.10 ² ± 12 a A	6,17.10 ² ± 17 a B	7,85.10 ² ± 5 a C
SCB	1,08.10 ⁸ ± 0 e A	1,24.10 ⁸ ± 0 f B	1,38.10 ⁸ ± 0 ef C	1,83.10 ⁷ ± 0 b A	6,65.10 ⁷ ± 0 e B	1,37.10 ⁸ ± 2 ^a C	6,57.10 ⁴ ± 2,80.10 ² b A	9,56.10 ⁴ ± 0 c B	2,95.10 ⁶ ± 0 b C
SCA	6,00.10 ⁶ ± 0 ab A	1,53.10 ⁷ ± 4,35.10 ⁶ b B	8,06.10 ⁷ ± 0 d C	7,20.10 ⁶ ± 0 de A	1,09.10 ⁸ ± 0 g B	1,94.10 ⁸ ± 0 a C	4,26.10 ³ ± 0 a A	9,56.10 ⁴ ± 0 b B	1,35.10 ⁷ ± 0 e C
SA	2,26.10 ⁷ ± 1,10.10 ⁷ b A	1,06.10 ⁸ ± 0 e B	1,40.10 ⁸ ± 0 ef C	7363095 ± 0 ab A	1,01.10 ⁸ ± 0 f B	1,26.10 ⁸ ± 0 a C	1,42.10 ⁶ ± 0 b A	1,47.10 ⁷ ± 0 b B	1,57.10 ⁷ ± 3,87.10 ⁴ b C
SCH	1,24.10 ⁸ ± 1,51.10 ⁷ c A	2,62.10 ⁹ ± 0 i B	3,60.10 ⁹ ± 0 i C	8,93.10 ⁷ ± 5,97.10 ⁶ e A	1,68.10 ⁸ ± 0 j B	2,09.10 ⁸ ± 0 a C	6,83.10 ⁵ ± 0 f A	2,52.10 ⁶ ± 1,10.10 ⁴ f B	3,56.10 ⁶ ± 3,72.10 ⁴ c C
SN	1,55.10 ⁶ ± 1,15.10 ⁴ a A	8,12.10 ⁷ ± 3,93.10 ⁶ d B	1,85.10 ⁸ ± 0 b C	4,11.10 ⁷ ± 1,36.10 ⁶ c A	1,15.10 ⁸ ± 0 b B	2,05.10 ⁸ ± 0 a C	1,16.10 ⁵ ± 4,17.10 ² c A	1,33.10 ⁶ ± 9,97.10 ³ e B	9,32.10 ⁶ ± 4,93.10 ⁴ f C
SCOM	1,67.10 ⁵ ± 7,80.10 ⁴ a A	1,14.10 ⁷ ± 6,15.10 ⁶ b A	1,28.10 ⁷ ± 7,20.10 ⁶ ab A	6,76.10 ⁷ ± 0 d A	1,58.10 ⁸ ± 0 i B	2,37.10 ⁸ ± 0 a C	2,01.10 ⁵ ± 9,80.10 ³ d A	1,26.10 ⁷ ± 0 B	9,67.10 ⁷ ± 0 i C
SME	1,69.10 ⁸ ± 1,11.10 ⁷ f A	4,89.10 ⁹ ± 6,15.10 ⁶ j B	5,43.10 ⁹ ± 7,20.10 ⁶ j C	1,32.10 ⁸ ± 1,13.10 ³ f A	4,05.10 ⁸ ± 6,10.10 ⁴ k B	5,00.10 ⁸ ± 1,47.10 ⁶ a C	7,73.10 ⁶ ± 4,90.10 ³ j A	7,81.10 ⁷ ± 0 m B	3,25.10 ⁸ ± 0 m C
SFC	1,40.10 ⁷ ± 6,63.10 ⁶ ab A	8,44.10 ⁷ ± 4,92.10 ⁶ d B	1,22.10 ⁸ ± 5,76.10 ⁶ e C	1,31.10 ⁷ ± 0 ab A	4,73.10 ⁷ ± 4,45.10 ⁶ d B	2,48.10 ⁸ ± 0 a C	1,93.10 ⁵ ± 1,40.10 ⁴ d A	5,25.10 ⁷ ± 7,75.10 ⁴ ± 0 k B	1,37.10 ⁸ ± 0 k C
SChV	1,62.10 ⁸ ± 1,11.10 ⁷ f A	1,51.10 ⁹ ± 6,15.10 ⁶ h B	1,23.10 ¹⁰ ± 7,50.10 ⁶ k C	1,88.10 ⁸ ± 2,04.10 ⁷ g A	6,59.10 ⁸ ± 0 l A	4,53.10 ⁹ ± 3,25.10 ⁵ b A	1,07.10 ⁶ ± 0 g A	3,50.10 ⁷ ± 0 j B	3,50.10 ⁷ ± 0 i C
SFPC	1,05.10 ⁴ ± 6,38.10 ² a A	1,78.10 ⁴ ± 75 a B	9,30.10 ⁴ ± 87 a C	2,80.10 ³ ± 6,72.10 ² a A	1,16.10 ⁴ ± 2,99.10 ² a A	3,55.10 ⁴ ± 6,09.10 ³ a B	2,71.10 ⁵ ± 0 e A	8,74.10 ⁵ ± 0 d B	8,69.10 ⁶ ± 0 e C
SFR	5,42.10 ⁵ ± 1,45.10 ⁴ a A	6,35.10 ⁶ ± 2,84.10 ² ab B	9752670 ± 2670 a C	5,05.10 ⁵ ± 0 a A	1,04.10 ⁶ ± 0 a B	2,76.10 ⁶ ± 0 a C	1,52.10 ⁴ ± 1,97.10 ² a A	7,80.10 ⁷ ± 0 i B	2,05.10 ⁸ ± 0 i C
SFPA	5,47.10 ⁷ ± 5,53.10 ⁶ ab A	1,30.10 ⁸ ± 1,77.10 ⁵ f B	1,63.10 ⁸ ± 1,33.10 ⁷ g C	7,22.10 ⁶ ± 0 a A	1,08.10 ⁵ ± 0 a B	1,23.10 ⁵ ± 0 a C	2,73.10 ⁵ ± 0 e A	1,33.10 ⁶ ± 0 e B	7,32.10 ⁶ ± 0 d C
SFP	1,27.10 ⁷ ± 9,43.10 ⁶ ab A	2,76.10 ⁷ ± 6,43.10 ⁵ c B	3,23.10 ⁷ ± 1,33.10 ⁶ e B	1,59.10 ⁵ ± 1,68.10 ⁴ a A	1,72.10 ⁶ ± 2,11.10 ⁵ a A	3,01.10 ⁷ ± 1,93.10 ⁶ a B	6,33.10 ⁶ ± 0 e A	2,60.10 ⁷ ± 0 i B	5,35.10 ⁸ ± 0 n C
SFPM	5,94.10 ⁵ ± 5,53.10 ⁵ ab A	1,35.10 ⁷ ± 3,18.10 ⁵ b B	1,76.10 ⁷ ± 1,33.10 ⁶ ac C	3,38.10 ⁶ ± 1,49.10 ⁶ ab A	2,21.10 ⁷ ± 0 c B	2,62.10 ⁷ ± 0 a C	1,07.10 ⁶ ± 4,17.10 ² g A	1,50.10 ⁹ ± 9,97.10 ³ n B	5,50.10 ⁹ ± 49250 o C

Ep : Epinards ; Ma : Mâches ; Rq : Roquettes ; Cf : 100% Coeur de frisés ; MR : Mâches + Roquettes ; JP : Jeunes Pousses ; SCB : Céleri Branche ; SCA : Salades Carottes ; SA : Salades Aperiatives ; SCH : Salades Choux ; SN : Salades Nicoises ; SCOM : Salades Composées ; SME : Salades Meli Melo ; SFC : Salades de Fruits Composées ; SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron ; SFR : Salades de Fruits de Raisin ; SFPA : Salades de Fruits de Papaye +Ananas ; SFP : Salades de Fruits Papaye ; SFPM : Salades de Fruits d'Ananas +Mangues

Résultats et Discussion

3.1.4.3. Corrélation entre les charges des microorganismes dénombrés dans les salades analysées

Le tableau XI présente la matrice de corrélation entre la croissance des microorganismes analysés a l'ouverture des emballages (J0). Il en ressort qu'il existe une relation positive hautement significative ($r = 0,91$) entre la charge moyenne des germes aérobies mésophiles (GAM) et celle des germes aérobies psychrophiles (GAP). En revanche, il n'existe pas de corrélation entre la flore fongique (FF) et celles des bactéries (GAM et GAP), avec les coefficients respectifs de $-0,08$ et $-0,07$.

Tableau XI : Matrice de corrélation entre les charges des microorganismes dénombrés dans les salades étudiées

	GAM	GAP	FF
GAM	1,00	0,91	-0,08
GAP		1,00	-0,07
FF			1,00

GAM : Germes aérobies mésophiles ; **GAP** : Germes aérobies psychrophiles ; **FF** : Flore Fongique

3.1.4.4. Classification des salades en fonction de la croissance microbienne au cours de la conservation après ouverture

La réalisation du HeatMap clustering a permis de regrouper les salades en fonction de leur charge en microorganismes (Figure 34). Les analyses suggèrent que les salades SChV sont propices à la prolifération des bactéries. Ces salades sont très représentées par GAP.J7, GAM.J7, GAP.J3, GAP.J0, GAM.J0 et GAM.J3 avec des valeurs correspondantes qui tendent vers 1. Par ailleurs, les salades SME sont marquées par la forte présence de GAM à J0 et à J3 ainsi que par la flore fongique à J0 et à J7 (valeur très proche de 1). Cependant, les salades de fruits comme SFP et SFPM composées respectivement de papaye, de papaye + mangue ont de fortes charges en levures et moisissures (FF) avec des valeurs correspondantes qui tendent aussi vers 1. De façon générale, les salades SFPC, Cf, Rq, Ma, MR, Ep, SFR et SFC sont regroupées dans la même classe en fonction de leurs charges microbiennes dont les valeurs correspondantes

Résultats et Discussion

sont comprises, entre 0,00 et 0,25. Cette observation est aussi faite chez les salades SCH et SCB (valeurs entre 0,25 et 0,50) pour lesquelles les tests statistiques n'ont relevé aucune différence significative. Cette classe pourrait être suivie de celle regroupant les salades SFPA, SA, SN, SCA, SCOM avec des valeurs correspondantes qui varient entre 0,50 et 0,75. Enfin, la dernière classe représente les salades qui ont enregistrées les plus fortes charges dont les valeurs correspondantes sont proches de 1. Il s'agit entre autres des salades SChV, SME, SFP et SFPM.

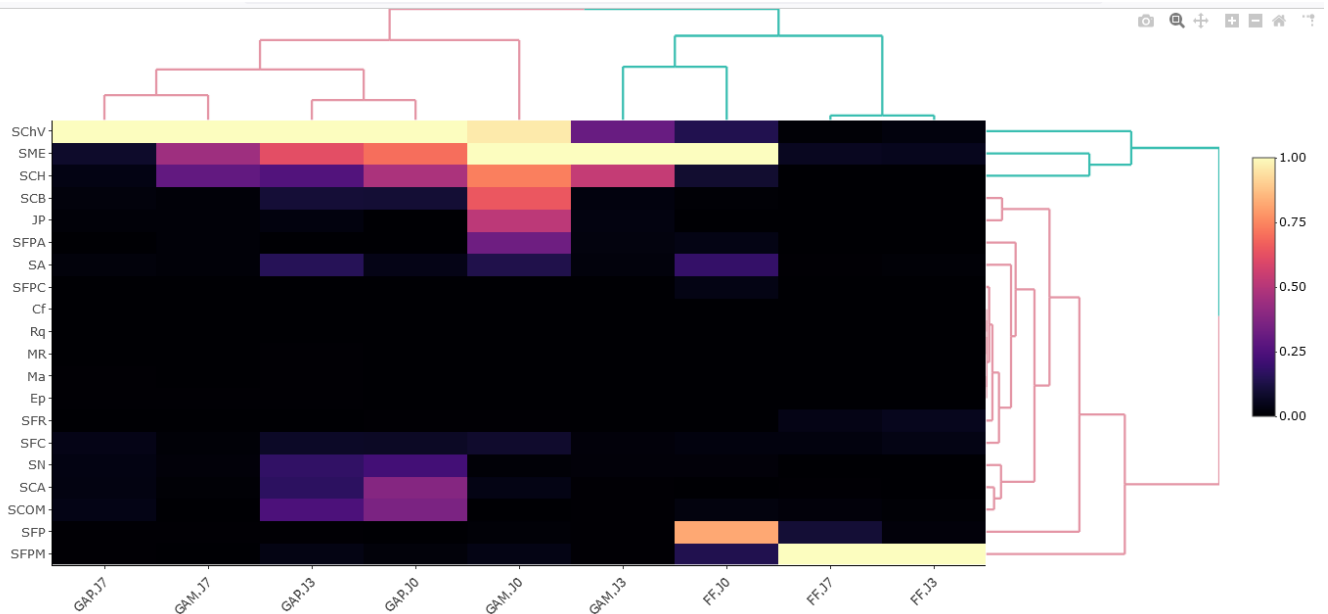


Figure 34 : Heatmap Cluster des charges moyennes des microorganismes dénombrés dans les salades étudiées

GAM. JO : Germes aérobie mésophile à la réception ; GAM. J3 : Germes aérobie mésophile a 3 jours de conservation ; GAM J7 : Germes aérobie mésophile a 7 jours de conservation.

GAP JO : Germes aérobie psychrophile a la réception, GAP.J3 : Germes aérobie psychrophile a 3 jours de conservation, GAP J7 : Germes aérobie psychrophile a 7 jours de conservation.

FF.JO : Flore Fongique a la réception, FF. J3 : Flore Fongique a 3 jours de conservation, FF. J7 : Flore Fongique a 7 jours de conservation.

Ep : Epinards, Ma : Mâches, Rq : Roquettes, Cf : 100% Coeur de frisés, MR : Mâches + Roquettes, JP : Jeunes Pousses, SCB : Céleri Branche, SCA : Salades Carottes, SA : Salades Aperitives, SCH : Salades Choux, SN : Salades Nicoises, , SCOM : Salades Composées, SME : Salades Meli Melo, SFC : Salades de Fruits Composées, SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron, SFR : Salades de Fruits de Raisin, SFPA : Salades de Fruits de Papaye +Ananas, SFP : Salades de Fruits Papaye, SFPM : Salades de Fruits d'Ananas +Mangues..

Résultats et Discussion

3.1.5. Niveau de contamination des salades de 4^{ème} gamme par des pathogènes bactériens

3.1.5.1. Niveau de contamination des salades par des pathogènes de portage

3.1.5.1.1. Prévalence des pathogènes bactériens de portage dans les salades de 4^{ème} gamme

Au cours de cette partie, 38 échantillons de salades ont été analysés. Plusieurs souches présomptives de *E. coli*, *Salmonella* spp. et de *S. aureus* ont été isolées et soumises aux tests d'identifications morphologiques, biochimiques et moléculaires. Les caractéristiques biochimiques des microorganismes sont présentées dans les tableaux en annexe 5. *E. coli* a été présent dans 8 échantillons de salades à savoir, SCA, SCH, SN, SCOM, SChV, SFC, SFR et SME avec une prévalence de 21,05 % (Figure 38). *Salmonella* spp. a été détecté dans 7 échantillons soit une prévalence de 18,42 %. Ce sont les salades JP, MR, SA, SCH, SChV, SFR et SN. (Figure 35). Concernant *S. aureus*, 9 salades (Rq, SCA, SA, SCOM, SN, SChV, SME, SFR et SFPA) ont été testées positives soit une prévalence de 23,68 % (Figure 38). En sommes, l'étude a révélé la présence de 24 souches les 38 échantillons.

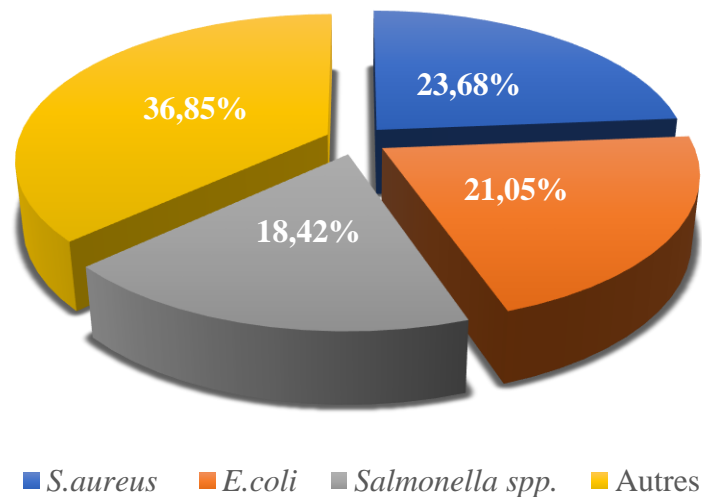


Figure 35 : Prévalences des pathogènes bactériens de portage

3.1.5.1.2. Qualité microbiologique des salades par rapport aux germes de portage durant la conservation.

Le dénombrement par intervalle de temps des germes de portage dans les salades étudiées a donné les charges moyennes consignées dans le tableau XII. Les résultats montrent que certains échantillons de salades avaient des charges élevées de bactéries pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) et la forte présence de *Salmonella* spp. à l'ouverture des emballages (J0). En effet, les charges de *E. coli* pour ces salades ont varié entre $1,87.10^2$ et 22100.10^2 UFC/g dont la plus forte charge a été observée dans les salades des feuilles de chênes vertes (SChV). Les charges

Résultats et Discussion

de *S. aureus* ont varié entre $18,9.10^2$ et 4630.10^2 UFC/g. La plus forte charge de *S. aureus* ont été enregistrées également dans les salades des feuilles de chênes vertes (SChV). Enfin souches de *Salmonella* spp., ont été présentes dans 7 types de salades parmi lesquelles figurent les salades de feuilles de chênes vertes (SChV).

Au regard de ces résultats, 31,57 % des salades étaient de qualité microbiologique satisfaisante, 5 % acceptable et 63,43 % insatisfaisante à l'ouverture des emballages (J0). La figure 39 montre clairement un regroupement de ces aliments en 8 groupes. En effet, les salades Ep, Cf, Ma, SFAM, SFA et SFPC sont les salades de qualité satisfaisante représentant le groupe à l'extrême droite de l'arbre hiérarchique (Figure 36). Aussi, les salades SFC peu isolées sur l'ACM, sont celles qui ont une qualité microbiologique acceptable. Elles appartiennent au groupe représenté en noir (Figure 36). Excepté ces deux (2) groupes, les six (6) autres sont caractérisés par de fortes charges des pathogènes de portage.

Au troisième jour (J3) d'analyse, les charges moyennes des souches de *E. coli* dans les échantillons variaient entre $2,24.10^4$ et $6,63.10^6$ UFC/g avec la plus forte charge observée chez les SChV. Quant aux souches de *S. aureus*, les charges moyennes ont varié de $1,91.10^4$ à $5,95.10^6$ UFC/g avec une plus forte charge observée dans les salades SME. Conformément aux critères microbiologiques, les salades de qualité microbiologique satisfaisante ont conservé leurs statuts microbiologiques (31,57 %). Cependant, les salades de fruits composés (SFC) qui étaient de qualité acceptable à la réception (J0) sont devenues impropres à la consommation au troisième jour d'expérience (J3). Par conséquent, les salades impropres à la consommation passent d'un taux de 63,43 % à 68,43 %. La figure 37 montre également une classification des salades en huit 8 groupes avec les mêmes salades dans le premier groupe constitué des salades de qualité satisfaisante (Ep, Cf, Ma, SFAM, SFA et SFPC). Les salades SFC sont très proches des salades SME, Rq et SFPA qui sont impropres à la consommation.

Au septième jour (J7) d'analyse, les charges moyennes de *E. coli* étaient toujours plus élevées dans les SChV ($1,23.10^7$ UFC/g). Les plus fortes charges enregistrées chez les souches de *S. aureus* étaient dans les salades Meli melo (SME) et les SChV avec respectivement $9,79.10^7$ UFC/g et $4,76.10^7$ UFC/g. Même s'il y a eu une augmentation des charges bactériennes dans l'ensemble, le statut microbiologique de façon générale du troisième (J3) au septième jour (J7) n'a pas changé (Figure 38). Ainsi, ces salades sont toujours impropres à la consommation.

Résultats et Discussion

Tableau XII : Charges moyennes des germes de portage durant la période de conservation domestique

Germes Salades	<i>E. coli</i> (UFC/g)			<i>S. aureus</i> (UFC/g)			<i>Salmonella spp</i>		
	J0	J3	J7	J0	J3	J7	J0	J3	J7
Cf	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
Ep	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
JP	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Pré	Pré	Pré
Ma	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
MR	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Pré	Pré	Pré
Rq	<1	<1	<1	1,89.10 ³ ± 8,57.10 ² a ^B	1,91.10 ⁴ ± 4,87.10 ³ b ^A	2,90.10 ⁴ ± 2.10 ³ c ^A	Ab	Ab	Ab
SA	<1	<1	<1	9,01.10 ⁴ ± 9,45.10 ³ a ^C	1,16.10 ⁵ ± 4,50.10 ³ a ^A	2,38.10 ⁵ ± 2,25.10 ⁴ b ^A	Pré	Pré	Pré
SCA	4,75.10 ² ± 45 ^{aA}	7,27.10 ⁵ ± 3,84.10 ⁵ a ^A	2,56.10 ⁶ ± 3,89.10 ⁵ a ^A	5,42.10 ⁴ ± 4,53.10 ⁴ a ^D	1,36.10 ⁵ ± 1,25.10 ⁵ a ^A	3,96.10 ⁵ ± 2,84.10 ⁵ a ^A	Ab	Ab	Ab
SCH	8,87.10 ⁴ ± 2.10 ⁴ a ^A	1,12.10 ⁵ ± 2,08.10 ⁴ a ^A	1,16.10 ⁵ ± 1,45.10 ⁴ a ^A	<1	<1	<1	Pré	Pré	Pré
SChV	2,21. 10 ⁶ ± 2.10 ⁵ a ^B	6,63.10 ⁶ ± 1,94.10 ⁶ b ^B	1,23.10 ⁷ ± 1,51.10 ⁶ c ^B	4,63.10 ⁵ ± 3,75.10 ⁴ a ^E	4,98.10 ⁶ ± 1,37.10 ⁶ b ^B	4,76.10 ⁷ ± 1,60.10 ⁶ c ^F	Pré	Pré	Pré
SCOM	1,87.10 ² ± 2 a ^A	1,65.10 ⁵ ± 1,50.10 ⁴ a ^A	1,60.10 ⁶ ± 3,50.10 ⁵ b ^A	4,45.10 ³ ± 1,05.10 ³ a ^B	8,45.10 ⁵ ± 1,25.10 ⁵ b ^B	4,89.10 ⁶ ± 4.10 ⁴ c ^C	Ab	Ab	Ab
SFA	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Abs
SFC	2,80.10 ² ± 10 a ^A	2,57.10 ⁵ ± 3,25.10 ⁴ a ^A	2,36.10 ⁶ ± 2,19.10 ⁶ b ^A	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
SFAM	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
SFPA	<1	<1	<1	2,20.10 ⁵ ± 10 ⁵ a ^F	7,95.10 ⁵ ± 5,50.10 ² b ^B	1,02.10 ⁷ ± 2.10 ⁴ c ^E	Ab	Ab	Ab
SFPC	<1	<1	<1	<1	<1	<1	Ab	Ab	Ab
SFR	2,90.10 ² ± 10 ^{aA}	2,95.10 ⁶ ± 3.10 ² b ^A	4,55.10 ⁶ ± 210 ³ b ^A	2,07.10 ³ ± 85 ^{aB}	1,59.10 ⁶ ± 5.10 ³ b ^B	3,65.10 ⁶ ± 5,50.10 ⁴ c ^B	Pré	Prés	Prés
SME	6,25.10 ² ± 0 ^{aA}	1,14.10 ³ ± 0 ^{aA}	1,02.10 ⁴ ± 40 ^{aA}	6,25.10 ⁴ ± 6,5.10 ³ a ^G	5,95.10 ⁶ ± 5.10 ⁴ b ^B	9,79.10 ⁷ ± 1,50.10 ⁴ c ^G	Abs	Ab	Ab
SN	8,23.10 ³ ± 5,25.10 ² a ^A	2,24.10 ⁴ ± 1,1.10 ³ a ^A	3,22.10 ⁵ ± 1,30.10 ⁴ b ^A	4,3.10 ⁵ ± 6,05.10 ⁴ a ^E	1,21.10 ⁷ ± 1,57.10 ⁶ a ^A	6,69.10 ⁶ ± 4,50.10 ⁵ a ^D	Pré	Pré	Pré

Cf : 100% Cœur de frisés, Ep : Epinards, JP : Jeunes Pousses, Ma : Mâches, MR : Mâches + Roquettes, Rq : Roquettes, SA : Salades Aperitives, SCA : Salades Carottes, SCH : Salades Choux, SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes, SCOM : Salades Composées, SFA : Salades de Fruits d'Ananas, SFC : Salades de Fruits Composées, SFAM : Salades de Fruits d'Ananas +Mangues, SFPA : Salades de Fruits de Papaye +Ananas, SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron, SFR : Salades de Fruits de Raisin, SME : Salades Meli Melo, SN : Salades Nicoises

Les lettres en minuscules différentes sur la même ligne traduisent une différence significative. Sur la même colonne les lettres en majuscules différentes traduisent une différence significative.

Résultats et Discussion

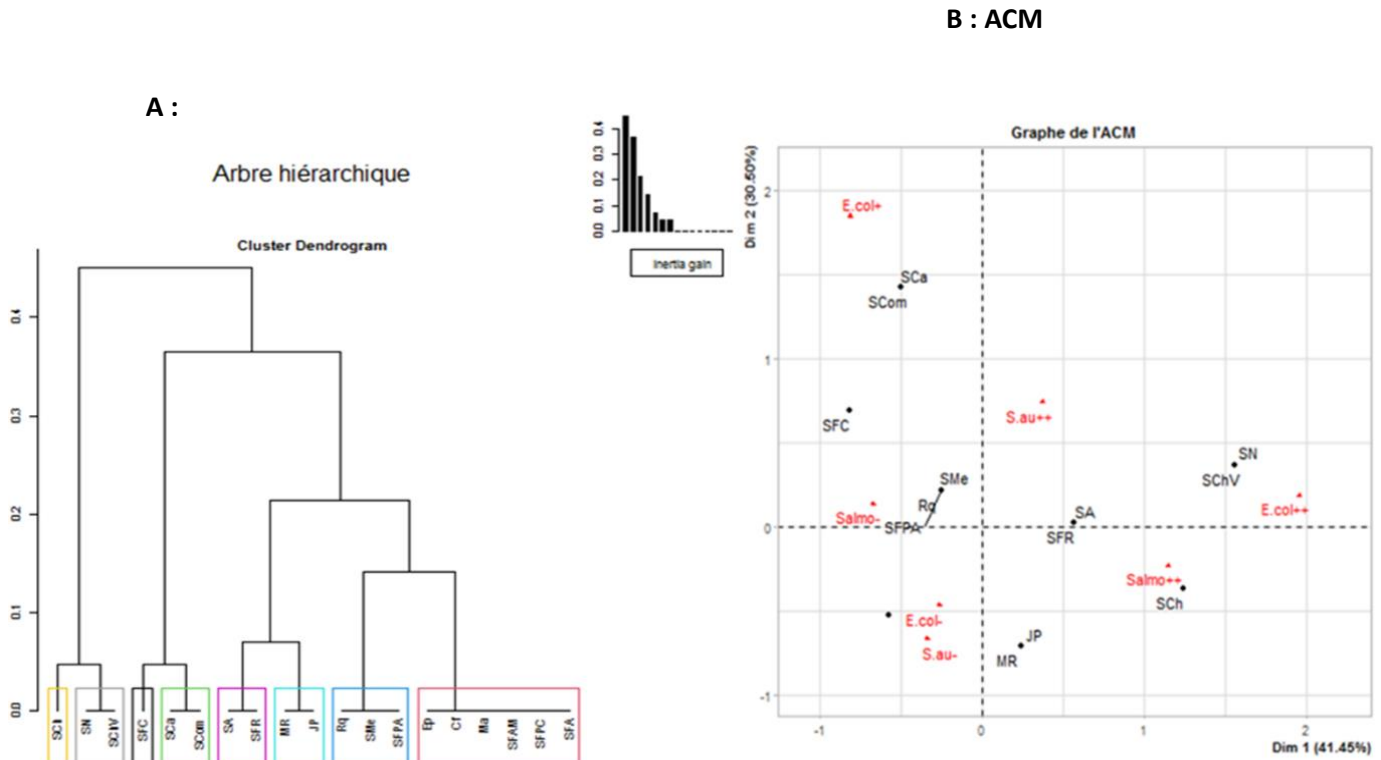


Figure 36 : Regroupement des salades de 4^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbologique à l'ouverture des emballages (J0)

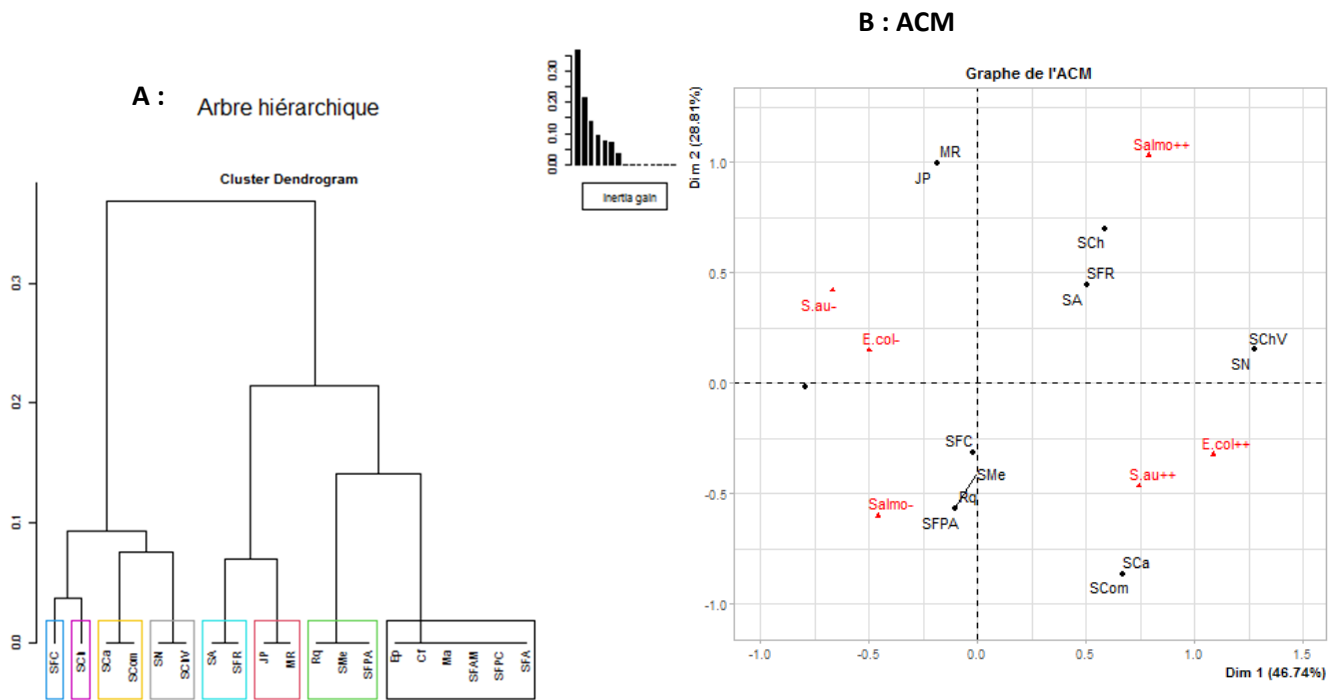


Figure 37 : Regroupement des salades de 4^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbologique au troisième jour de conservation (J3)

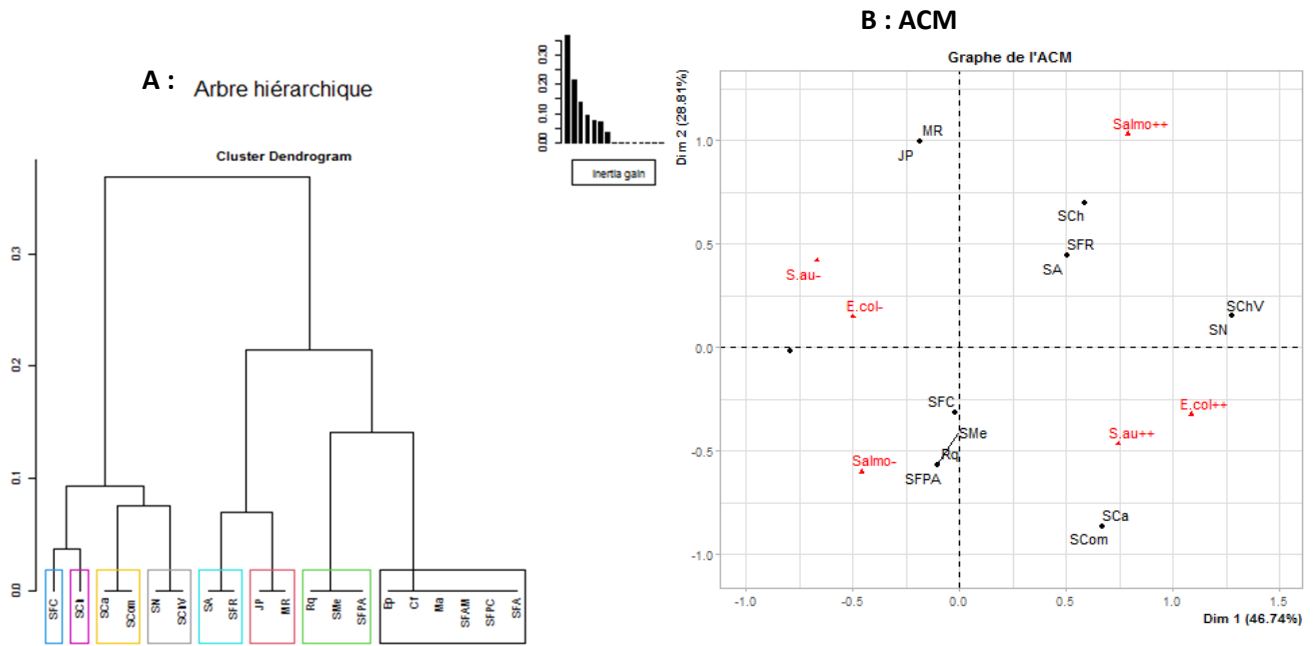


Figure 38 : Regroupement des salades de 4^{ème} gamme par classification hiérarchique (A) et par analyse des correspondances multiples (B) en fonction de la qualité microbiologique au septième jour de conservation (J7)

3.1.5.2. Pathogènes bactériens psychrotrophes dans les salades de 4^{ème} gamme

3.1.5.2.1. Caractéristiques culturelles et morphologiques des bactéries isolées sur gélose

Oxford

Le but de cette partie des travaux était de rechercher l'espèce *Listeria monocytogenes* dans les salades de 4^{ème} gamme. Ainsi, 60 échantillons de salades ont été analysés. Les colonies obtenues sur ce milieu (gélose Oxford) après la mise en culture bien qu'elles soient toutes entourées d'halo noir, présentaient des formes et des couleurs variées. L'isolement de ces souches bactériennes sur la gélose Oxford base montre donc la présence probable de divers microorganismes non identiques (Figure 39). Ainsi, sur la base d'une identification morphologique (la coloration de Gram), la présence des bacilles à Gram positif et des Cocci à gram positif a été déterminée (Figure 40). Au total, six (06) salades ont été testés positif. Il s'agit des salades d'Épinard (Ep), de Mâches + Roquettes (MR), de Jeune Pousses (JP) Choux (SCH), de Carottes (SCA) et de salades Composées (SCOM). La prévalence des pathogènes psychrotrophes étaient de 10 %.

Résultats et Discussion

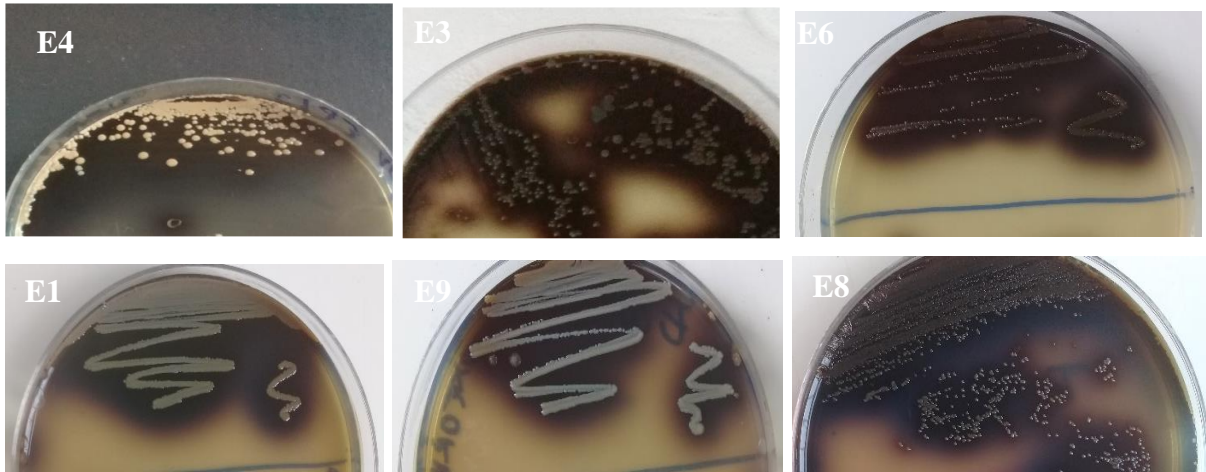


Figure 39 : Aspects des germes suspectés de pathogènes psychrotrophes sur la gélose Oxford

E1 : Epinard (EP) ; E3 : Mâches+Roquettes (MR) ; E4 : Jeunes Pousses (JP) ; E6 : Carottes (SCA) ; E8 : Salade composées (SCOM) ; E9 : Choux (SCH)

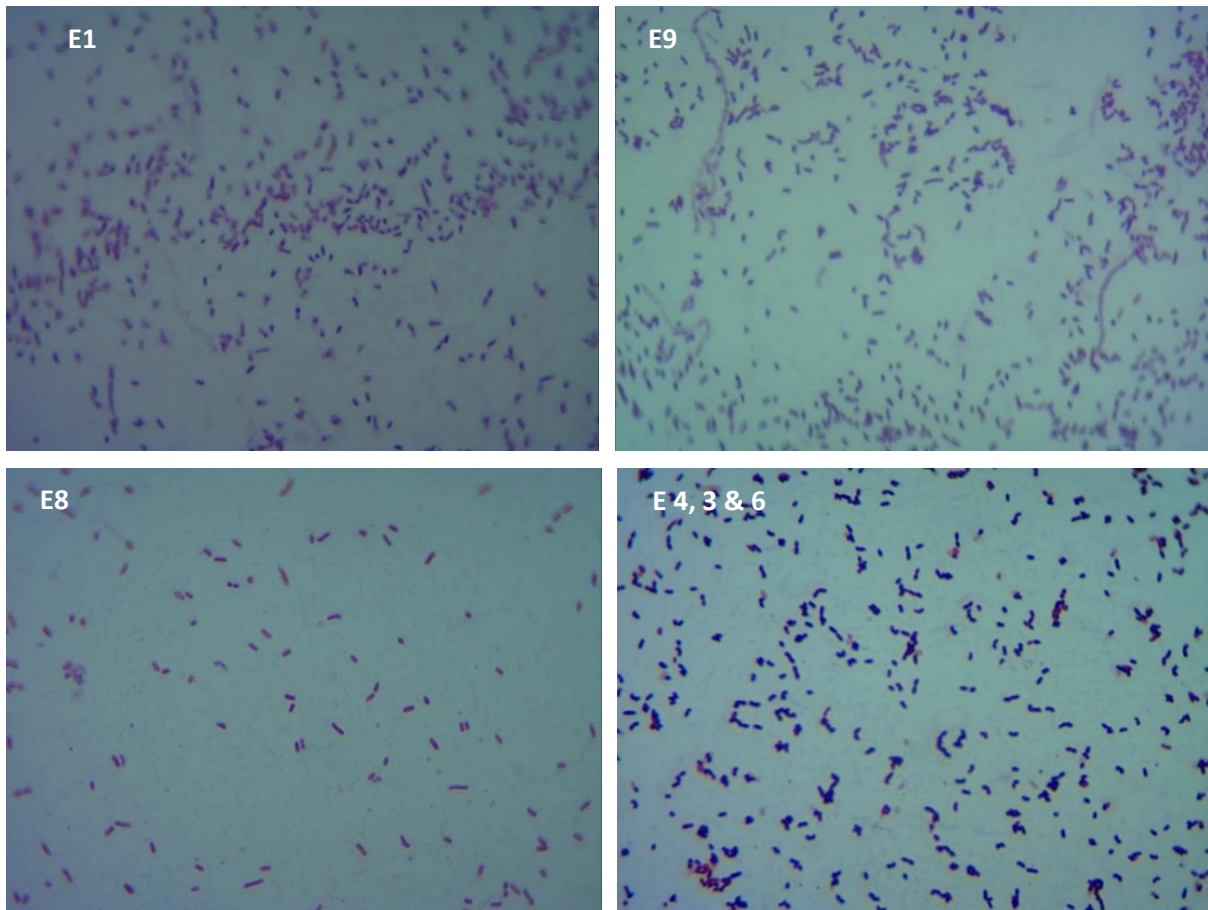


Figure 40 : Caractéristiques morphologiques après coloration de Gram des bactéries suspectées de pathogènes psychrotrophes isolés sur la gélose oxford base

E1 : Epinard (EP) ; E3 : Mâches+Roquettes (MR) ; E4 : Jeunes Pousses (JP) ; E6 : Carottes (SCA) ; E8 : Salade composées (SCOM) ; E9 : Choux (SCH)

3.1.5.2.2. Charges moyennes des pathogènes psychrotrophes dans les salades de 4^{ème} gamme de la réception à 7 jours de conservation.

Les pathogènes psychrophiles dénombrés dans les six échantillons de salades (Ep, MR, JP, SCH, SCA, SCOM) ont permis d'avoir les charges moyennes consignées dans le tableau XIII. Les microorganismes dénombrés présentaient sensiblement les mêmes caractéristiques culturales. En effet, les colonies de ces germes microbiens étaient toutes entourées d'un halo noir, caractéristique de *Listeria monocytogenes* sur ce milieu de culture. Alors, un suivi de l'évolution des charges a été effectué durant une période de conservation à 7 °C après ouverture des emballages. Les résultats obtenus du dénombrement durant la période de conservation montrent qu'à la réception des salades les charges moyennes des pathogènes psychrotrophes varient entre $2,80.10^2 \pm 0$ et $8,20.10^4 \pm 0$ UFC/g. Au troisième jour (J3) d'analyse, les charges sont comprises entre $9,00.10^2 \pm 0$ et $2,89.10^5$ UFC/g. Au septième jour (J7), les charges sont de l'ordre de $1,32.10^3 \pm 2,80.10^2$ à $1,82.10^6 \pm 2,75.10^5$ UFC/g (Tableau XIV). Conformément aux analyses de variances (ANOVA à un facteur), il y a eu une évolution significative des charges microorganismes dans des salades durant la période de conservation malgré la chaîne du froid comme mode de conservation. Mais, cette croissance s'est avérée plus élevée significative au niveau des salades Ep et SCH. Par ailleurs, une baisse considérable de charge moyenne a été observée au niveau des salades JP.

Résultats et Discussion

Tableau XIII : Charges moyennes (UFC/g) des souches suspectées de *L. monocytogenes* durant le temps de conservation

Temps Salades	J0	J3	J7
Ep	$1,54.10^4 \pm 1,60.10^{3aB}$	$2,89.10^5 \pm 9,00.10^3 aD$	$1,82.10^6 \pm 2,75.10^5 bC$
Ma	<1	<1	<1
Rq	<1	<1	<1
Cf	<1	<1	<1
MR	$2,80.10^2 \pm 0 aA$	$9,60.10^3 \pm 0 bA$	$3,55.10^3 \pm 2,45.10^3 cA$
JP	$8,20.10^4 \pm 0 aC$	$4,00.10^4 \pm 0 bB$	$2,90.10^4 \pm 0 cA$
SCB	<1	<1	<1
SCA	$2,80.10^2 \pm 0 aA$	$9,00.10^2 \pm 0 bA$	$1,32.10^3 \pm 2,80.10^2 cA$
SA	<1	<1	<1
SCH	$8,00.10^2 \pm 0 aA$	$5,86.10^4 \pm 0 bC$	$3,75.10^5 \pm 0 cB$
SN	<1	<1	<1
SCOM	$5,60.10^2 \pm 0 aA$	$1,09.10^4 \pm 0 abA$	$3,73.10^4 \pm 2,27.10^4 bA$
SME	<1	<1	<1
SFC	<1	<1	<1
SChV	<1	<1	<1
SFPC	<1	<1	<1
SFR	<1	<1	<1
SFPA	<1	<1	<1
SFP	<1	<1	<1
SFPM	<1	<1	<1

Ep : Epinards ; Ma : Mâches ; Rq : Roquettes ; Cf : 100% Coeur de frisés ; MR : Mâches + Roquettes ; JP : Jeunes Pousses ; SCB : Céleri Branche ; SCA : Salades Carottes ; SA : Salades Aperitives ; SCH : Salades Choux ; SN : Salades Nicoises ; SCOM : Salades Composées ; SME : Salades Meli Melo ; SFC : Salades de Fruits Composées ; SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron ; SFR : Salades de Fruits de Raisin ; SFPA : Salades de Fruits de Papaye +Ananas ; SFP : Salades de Fruits Papaye ; SFPM : Salades de Fruits d'Ananas +Mangues.

Les lettres en minuscules, différentes sur la même ligne traduisent une différence significative. Dans la même colonne les lettres en majuscules différentes traduisent une différence significative.

3.1.5.2.3. Espèces de bactéries psychrotrophes isolées dans les salades

Les amorces ciblant la région hypervariable du gène de l'ARNr16S a permis d'amplifier ce gène chez les isolats E1, E3, E4, E6, E8 et E9. La Figure 41 présente le profil électrophorétique obtenu après la migration et la révélation sous rayons UV des produits PCR obtenus. Après le séquençage des amplicons, les BLAST effectués avec les données du catalogue de NCBI ont montré la présence d'espèces bactériennes différentes dans les salades analysées (Tableau XIV). En effet, la bactérie isolée des salades Ep est homologue de *Lysinibacillus fusiformis* pendant que celle des salades MR est une souche de *Staphylococcus*

Résultats et Discussion

saprophyticus. La souche isolée des JP est l'espèce *Staphylococcus fleurettii*. Quant aux salades SCA, elles ont été contaminées par *Staphylococcus népalensis*, celles de SCH ont été contaminées par *Bacillus cereus* et SCOM par *Listeria monocytogenes*. Pour mieux apprécier les zones de similarité entre les différentes espèces, un alignement multiple a été effectué entre les séquences obtenues après séquençage à travers l'algorithme Clustal Omega avec les paramètres par défaut (Figure 42). La figure montre clairement qu'il existe des zones identiques entre les différentes séquences. L'arbre phylogénétique réalisé à travers l'alignement des séquences des différentes espèces révèle que sur des régions hypervariables de ce gène les différents pathogènes identifiés peuvent être regroupés en six (06) classes, dont une similarité a été observée entre *Lysinibacillus fusiformis* et *Listeria monocytogenes* (70 %) (Figure 43). Le rapprochement entre *L. fusiformis* et *L. monocytogenes* nécessiterait des analyses approfondies (analyses qualitatives) pour apprécier le lien entre ces deux (02) espèces.

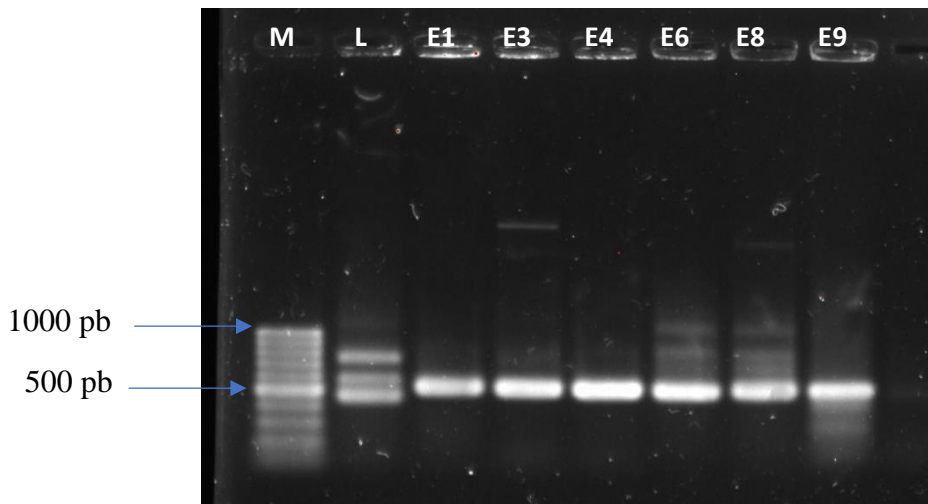


Figure 41 : Profil électrophorétique du produit d'amplification des régions (V-V3) du gène ARNr 16S (500 pb) des souches présumptives de pathogènes psychrotrophes isolés des salades de 4^{ème} gamme

M : Marqueur moléculaire (1000 pb) ; L : *Lactobacillus*, E1 : Epinard (EP) ; E3 : Mâches+Roquettes (MR) ; E4 : Jeunes Pousses (JP) ; E6 : Carottes (SCA) ; E8 : Salade composées (SCOM) ; E9 : Choux (SCH)

Résultats et Discussion

Tableau XIV: Similarités entre les différentes séquences des pathogènes psychrotrophes isolés des salades de 4^{ème} gamme et les espèces du catalogue

Echantillons	Espèces identifiées	Score maximum	Score Total	Couverture de la requête	Valeur prévue	Pourcentage d'identité	Longueur d'accession	N° d'accession
Ep (E1)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	817	817	98 %	0,0	100,0 %	874	JN624748.1
MR (E3)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	800	4793	98%	0,0	99,77%	2601138	CP054575.1
JP (E4)	<i>Staphylococcus fleurettii</i>	822	822	94%	0,0	97,72%	1422	MN758802.1
SCA (E6)	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	830	830	96%	0,0	97,54%	1456	AB697721.1
SCOM (E8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	257	257	99 %	3e-64	96,75 %	667	OK644491.1
SCH (E9)	<i>Bacillus cereus</i>	822	822	98%	0,0	99,56%	1438	KF025653.

Résultats et Discussion

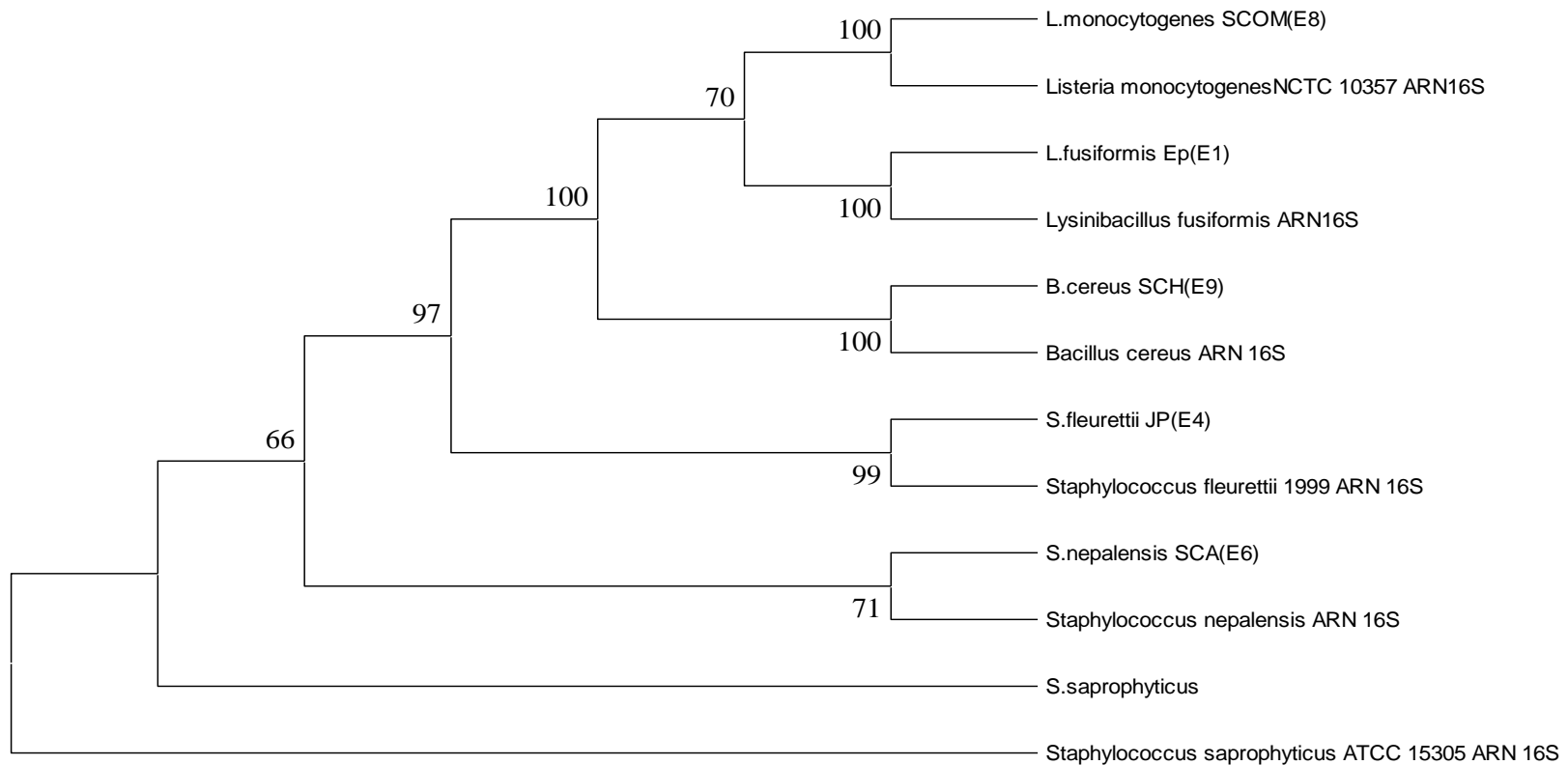


Figure 43 : Arbre p ARN16Shylogénétique des espèces identifiées sur la base des régions hypervariables de l'ARN16S

Listeria monocytogenes NCTC 10357 ARN16S ; *Lysinibacillus fusiformis* ARN16S ; *Bacillus cereus* ARN 16S ; *Staphylococcus fleurettii* 1999 ARN 16S ; *Staphylococcus nepalensis* ARN 16S ; *Staphylococcus ATCC 15305* ARN 16S : séquences de références des différentes espèces

3.1.5.2.4. Analyses comparées des séquences de *L. fusiformis* et *L. monocytogenes*

La réalisation du Dotmatrix a permis d'effectuer une analyse qualitative des séquences de *L. fusiformis* et de *L. monocytogenes* (Figure 44). A l'analyse, des alignements peuvent se réaliser entre les séquences de ces deux espèces. Il s'agit des alignements globaux traduits par la grande diagonale et des alignements locaux représentés par les segments obliques sur la figure. Par conséquent, l'alignement effectué suivant le programme needle (Figure 45) a montré une similarité entre ces deux espèces dont le coefficient d'identité est de 73,1 % avec une erreur de 5,5 % et un score de 1995,5. Les Dotmatrix (Figures 46 et 47) effectuées sur les séquences de chaque espèce montrent qu'il y a des zones répétées d'où conservation des régions dans les différentes séquences.

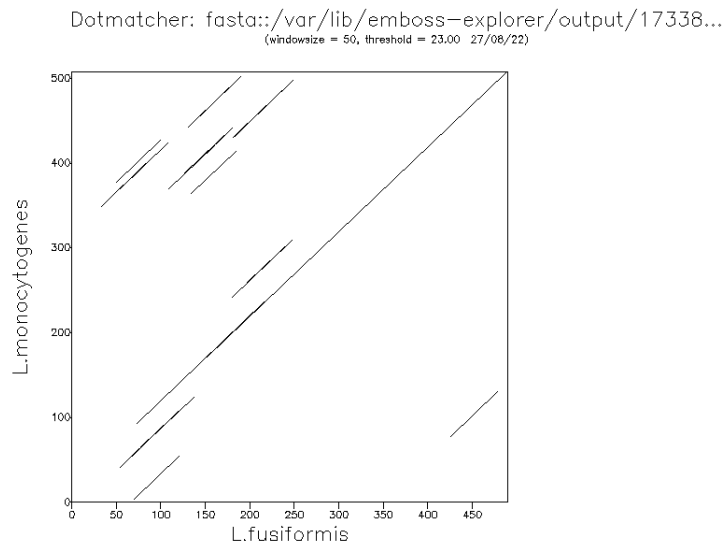


Figure 44 : Dotmatrix des séquences de *L. monocytogenes* et *L. fusiformis*

Résultats et Discussion

L.monocytogen	1	-CCATGCGCTCTATCTG--CAGT--CGA--CGA--CGGAGGAGAAGTATG	41
		
L.fusiformis	1	TCTGGGGGCTAATACTGGCAAGTTACGAAGCGAACAGAAGAAGGAGCTTT	50
L.monocytogen	42	TATATGAGTTGT-----GCGGA-GGGTGAGTAA-ACGTGGGTATC--GCT	82
		
L.fusiformis	51	GCTCTTCGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	100
L.monocytogen	83	TGTAAGATGGGGAGAAC-ATGGGAAA-TGGGGCTAATACCGAATGATATA	130
		
L.fusiformis	101	TTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGAATAATCTG	150
L.monocytogen	131	TTGTGGCGCA---TGCCACTCTCTTGAAAGAGGGTTTCGGCTATCGTTAT	177
		
L.fusiformis	151	TTTCACCTCATGGTGAAACAC---TGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTAT	197
L.monocytogen	178	ACAGATGGGCCCGCGCTGCATTACCTAGTTGGTAGGTTAATGGCCTACCA	227
		
L.fusiformis	198	A-GGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA	246
L.monocytogen	228	AGGCAACAATCCATACCCAACCTGAAAGGTTGATCGGCCACACTGGGACT	277
		
L.fusiformis	247	AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACT	296
L.monocytogen	278	GAAACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCACCATTAGGGAATCTTCCGCA	327
		
L.fusiformis	297	GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA	346
L.monocytogen	328	TTGGACAAAAGTCTGACGGACCAACGCCCCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCG	377
		
L.fusiformis	347	ATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTTCG	396
L.monocytogen	378	GATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAAAGTAACTGCTT	427
		
L.fusiformis	397	GTTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCT	446
L.monocytogen	428	GTCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACTTGCCGCCG	477
		
L.fusiformis	447	GTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCAGAGA	496
L.monocytogen	478	CCCGCATACTCCC	490
		
L.fusiformis	497	CCCGCCGAGTAA-	508

Figure 45 : Alignement des séquences de *L. monocytogenes* et *L. fusiformis*

Aligned_sequences: 2 ; # 1: *L.monocytogenes* ; # 2: *L.fusiformis* ; # Matrix: EBLOSUM62 ; # Gap_penalty: 10.0 ; # Extend_penalty: 0.5 ; # Length: 513

Résultats et Discussion

Dotmatcher: fasta::/var/lib/emboss-explorer/output/77580...
(windowsize = 50, threshold = 23.00 26/08/22)

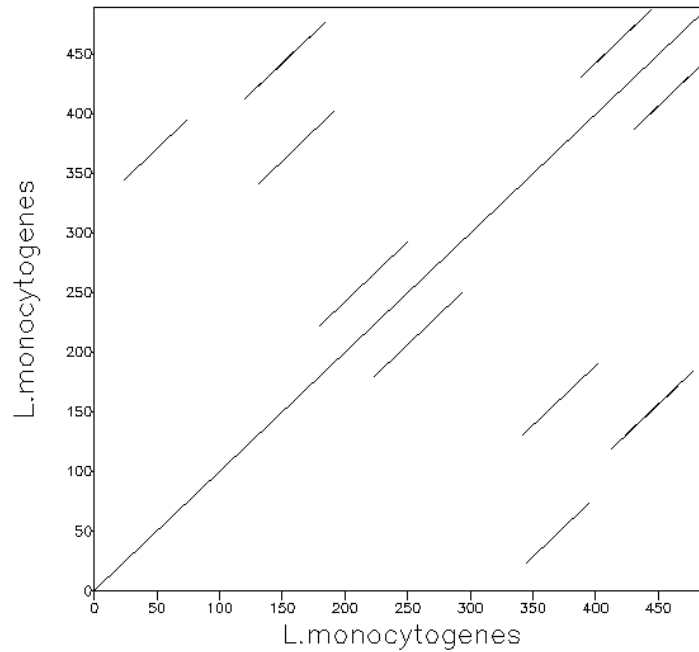


Figure 46 : Dotmatrix de la séquence de *L. monocytogenes*

Dotmatcher: fasta::/var/lib/emboss-explorer/output/35030...
(windowsize = 50, threshold = 23.00 27/08/22)

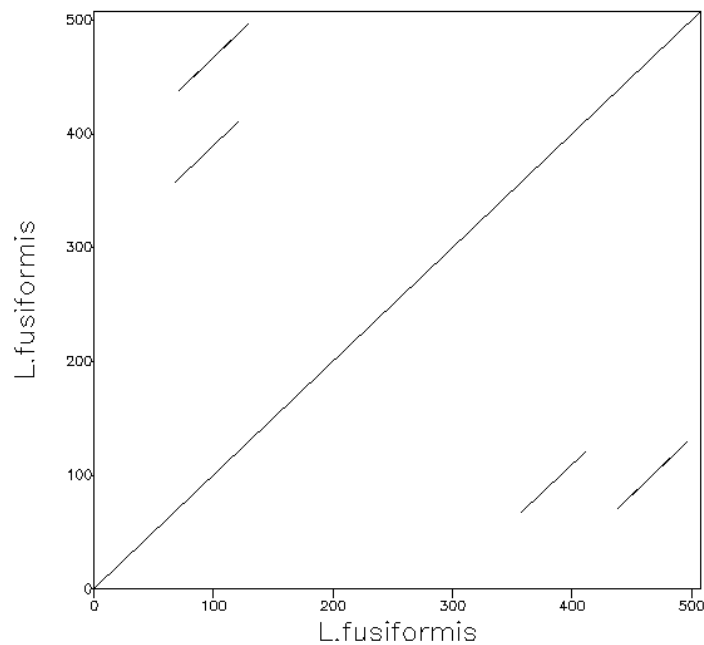


Figure 47 : Dotmatrix de la séquence de *L. fusiformis*

Résultats et Discussion

3.1.6. Facteurs de virulence et sensibilité des souches isolées aux antibiotiques

3.1.6.1. Facteurs de virulence des souches bactériennes isolées des salades de 4^{ème} gamme

3.1.6.1.2. Prévalence de gènes responsables de la production d'entérotoxines (*sea* et *seb*) chez *S. aureus* isolé dans les salades de 4^{ème} gamme

Le gène de virulence *sea* de *S. aureus*, a été mis en évidence dans cinq (5) échantillons de salades (SA, SCOM, SN, SChV, SME). La prévalence donc de ce gène est estimée à 13,15 % sur l'ensemble des échantillons. Par contre, aucun échantillon testé était positif au gène *seb* (0%). Le profil électrophorétique du produit d'amplification est présenté sur la figure 48.

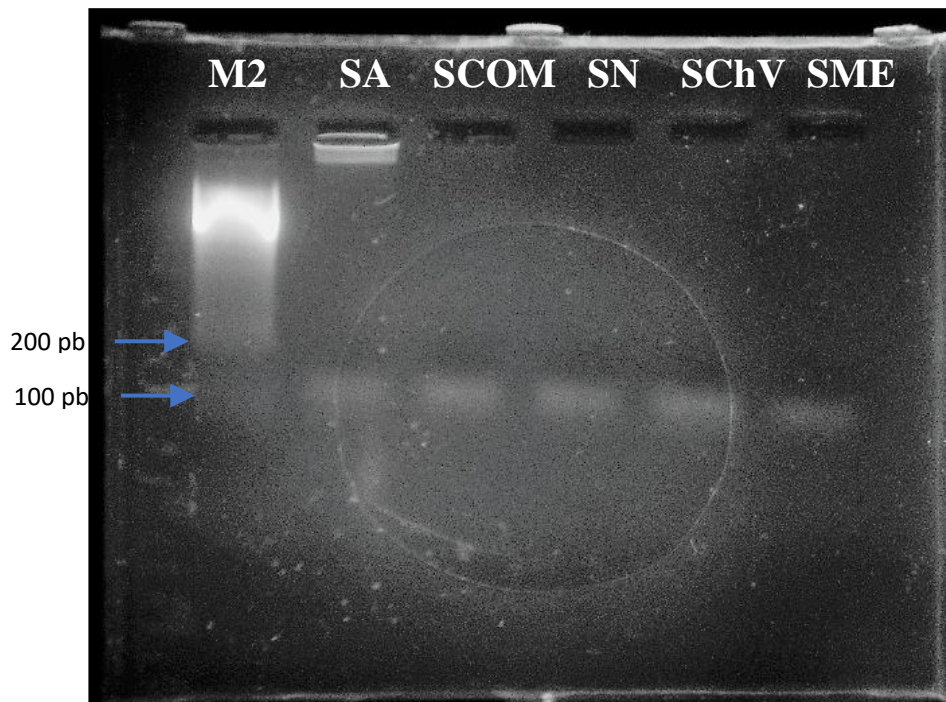


Figure 48 : Profil électrophorétique du produit d'amplification gène de virulence (*sea*) de *S. aureus*.

M2 : marqueur moléculaire (1000 pb) ; les souches provenant de, SA : Salades Aperitives, SChV: Salades Chênes Verte , SN : Salades Nicoises, SCOM : Salades Composées, SME : Salades Meli Melo

3.14.1.3. Prévalence de gènes responsables de la production de Shiga-toxine (*stx2* et *stx1*) chez *E. coli* isolé dans les salades de 4^{ème} gamme

La pathogénicité des souches de *E. coli* a été étudiée à travers la recherche de certains gènes impliqués dans la biosynthèse de la Shiga-toxine (*stx2* et *stx1*). Le gène *stx2* a été détecté dans quatre échantillons (SN, SCOM, SChV, SME) soit 10,50 %. Par contre le test avec le gène *stx1* n'a été positif dans aucun des échantillons testés. Le profil électrophorétique du produit d'amplification du gène *stx2* est présentée par la figure 49.

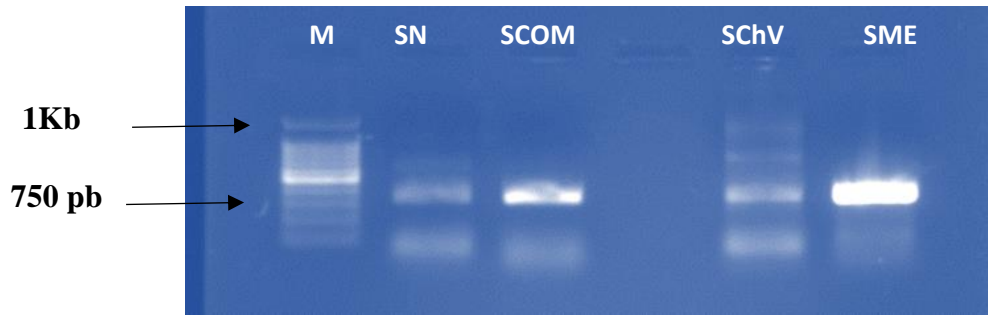


Figure 49 : Profil électrophorétique du produit d'amplification du gène de virulence (*stx2*) de *E. coli*

M : marqueur moléculaire (1kb) ; les souches provenant de, SN : Salades Nicoises, SCOM : Salades Composées, SME : Salades Meli Melo, SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes

3.1.6.2. Profil de résistance des souches isolées aux antibiotiques

Cette étude, 6 souches de *E. coli*, 7 souches de *Salmonella* spp. et 8 souches de *S. aureus* ont été soumises à un test d'antibiogramme par la méthode de diffusion des antibiotiques en milieu gélosé (MH).

3.1.6.2.1. Profil de résistance de *E. coli* aux antibiotiques

Les différents diamètres d'inhibitions obtenus après l'antibiogramme ont permis de tracer du profil de résistance de ce pathogène (Figure 50). Les analyses ont révélé une grande résistance de cette bactérie vis-à-vis des antibiotiques dans l'ensemble variant entre 0 et 100 %. Les résistances les plus importantes ont été observées au niveau des Bêtalactamines comme celles face à la Céfuroxime (CXM) 30 µg (100 %), à l'Ampicilline (AMP) 10 µg (83 %) et à la Céfoxitine (FOX) 30 µg (83 %). Aussi une résistance aux carbapénèmes a été observée (17 % à imipénème 10 µg). De plus, une résistance importante a été décrite face à la famille des Fluoroquinolones dont la plus importante a été observée au niveau de la Ciprofloxacine (CIP). Face aux autres familles d'antibiotiques, la résistance a été plus marquée vis-à-vis de la Triméthoprime (TMP) avec une résistance de 33 %. Cependant, toutes les souches ont été sensibles à Nétilmicine (NTM) 10 µg, à Ceftriaxone (CRO) 30 µg à la Céfépime (FEP) 30 µg à la Tigécycline (TGC) 15 µg et à la Nitroxoline (NIR) 30 µg.

L'analyse des correspondances multiples (ACM), effectuée sur la résistance des souches de *E. coli* isolées a permis d'identifier la réaction des différentes souches face aux antibiotiques. Dès lors, les souches provenant des salades SCOM et SCH sont caractérisées par leurs grandes résistances à la Céfuroxime (CXM) et à la Céfoxitine (FOX) mais aussi à l'Ampicilline (AMP) (Figure 51). Quant à la souche provenant des salades SN, elle s'est avérée résistante à la Ticarcilline (TIC), Ciprofloxacine (CIP) et à la Triméthoprime (TMP). Les souches des salades SME ont peu résisté à l'Ampicilline (AMP) et Ticarcilline (TIC). Il ressort des différents

Résultats et Discussion

niveaux de résistances des souches de *E. coli* que 66,68 % des souches sont de phénotypes sauvages, 16,66 % de résistances aux Fluoroquinolones et 16,66 % également de phénotype Carbapénèmes (Figure 52).

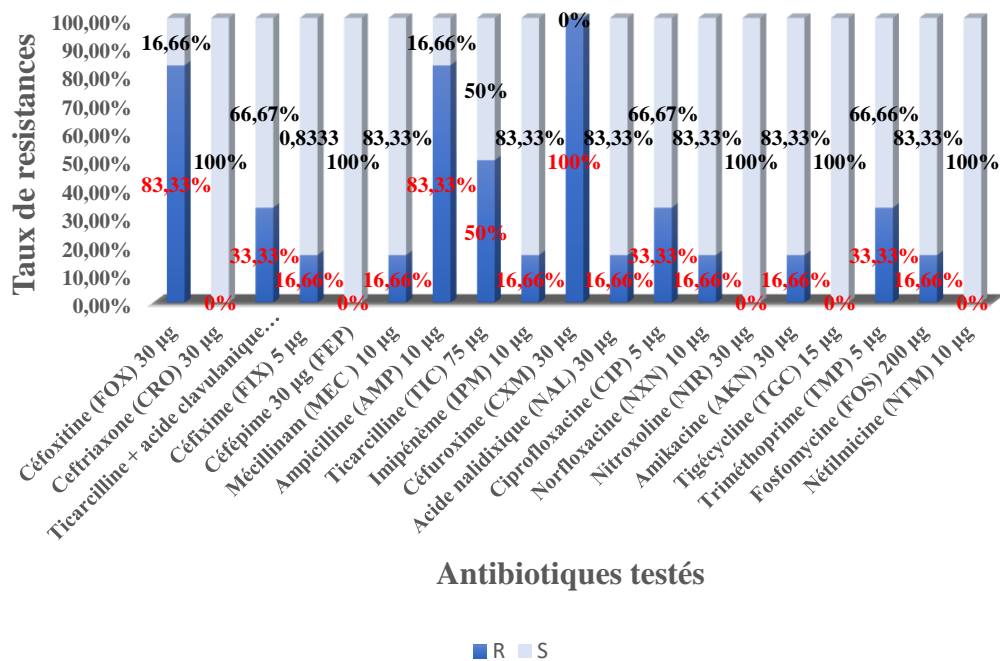


Figure 50 : Profil de résistance des souches de *E. coli* vis à vis des d'antibiotiques

R : Résistant ; *S* : Sensibilité

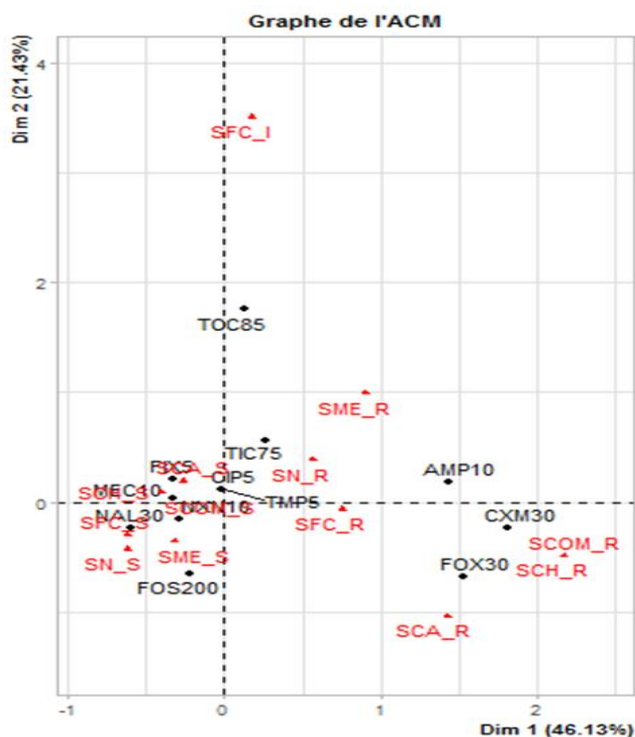


Figure 51 : Représentation de la résistance des souches de *E. coli* aux antibiotiques par analyse factorielle des correspondances multiples

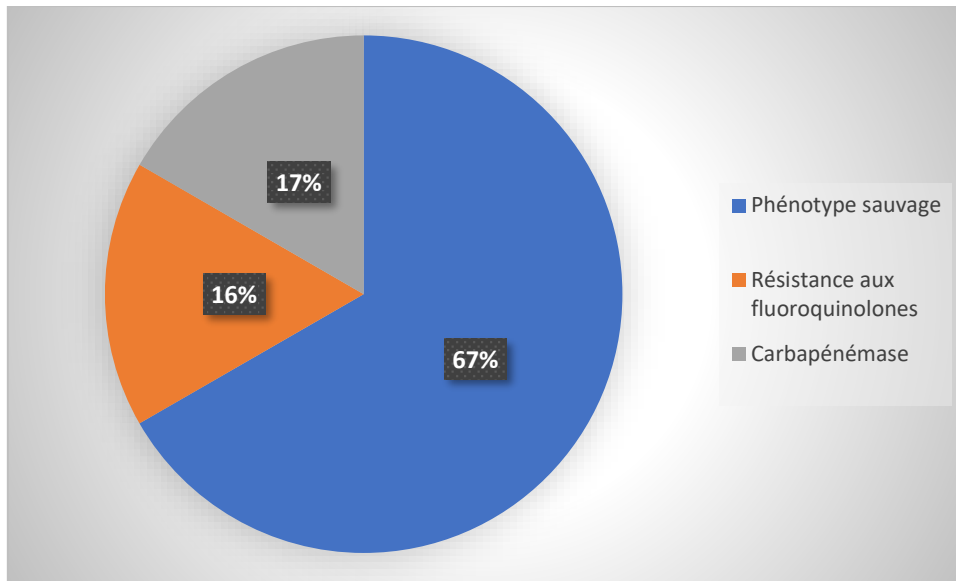


Figure 52 : Distribution des phénotypes de résistance des souches de *E. coli* aux antibiotiques.

3.1.6.2.2. Observation de la résistance des souches de *Salmonella* spp. face aux antibiotiques

Les sept (7) souches de *Salmonella* spp. isolées des échantillons ont fait l'objet d'une étude d'antibiorésistance. En outre, un graphe (Figure 53) a été réalisé dans le but d'apprécier les niveaux de résistance de cette bactérie aux antibiotiques. A l'analyse, la plupart des souches étudiées sont sensibles à tous les antibiotiques utilisés exceptées Céfoxitine (FOX ; 30 µg) et Ampicilline (AMP ; 10 µg) qui ont présenté des taux de résistance de 42,85 % et 57,15 % respectivement. Ces antibiotiques sont également issus de la famille des Bêtalactamines. Par ailleurs, il ressort de l'analyse des résultats que toutes les souches de *Salmonella* spp. isolées sont de phénotypes sauvages (100 %).

Résultats et Discussion

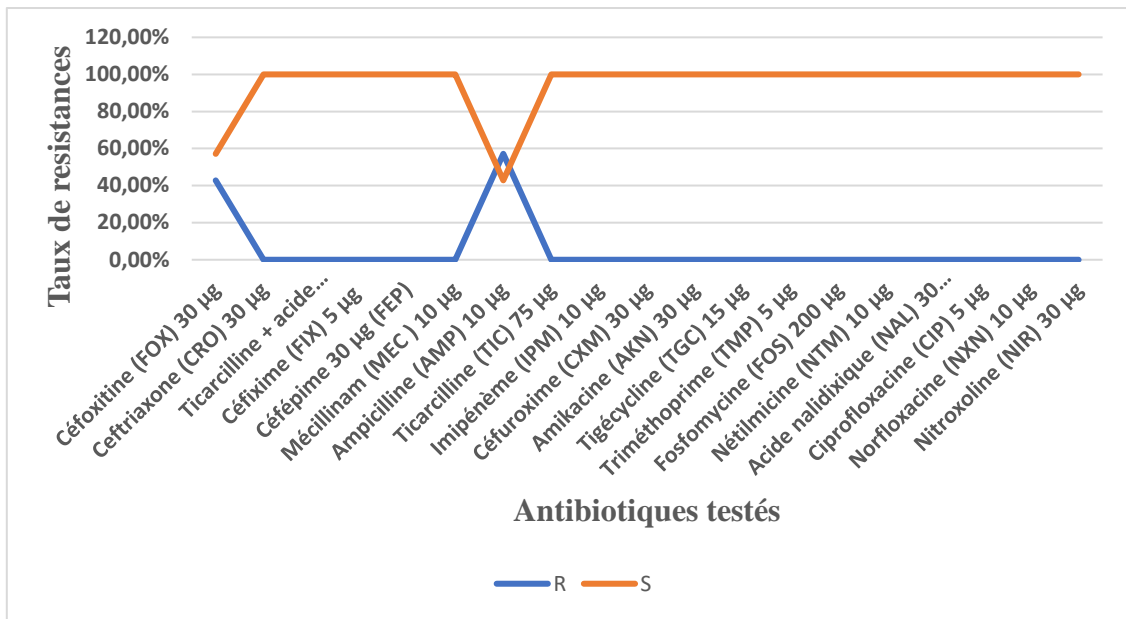


Figure 53 : Profil de résistance des souches de *Salmonella* spp. vis-à-vis des antibiotiques

R : Résistant ; S : Sensible

3.1.6.2.3. Profil de résistance des souches de *S. aureus* aux antibiotiques

La résistance de cette bactérie face aux antibiotiques s'est avérée très importante avec des taux allant de 37 à 100 % (Figure 54). Les plus grandes proportions ont été observées au niveau de la Benzylpénicilline (PNG ; 1 IU) (100 %) suivie de la fosfomycine (FOS ; 200 µg), Acide fusidique (FAD ; 10 µg) et l'Erythromycine (ERY ; 15 µg) (63 %). Cependant, les plus faibles résistances sont celles obtenues face aux Chloramphénicol (CHL ; 30 µg), Nitrofuranes (FTN ; 300 µg) et Nitroxoline (NIR ; 30 µg) avec un taux de résistance de 37 %. Les analyses révèlent que les souches isolées de cet pathogène ont résisté à la plupart des antibiotiques des différentes familles testées. En effet, face aux antibiotiques utilisés de la famille des Béta-lactamines, les souches ont développé de grandes résistances à savoir, 100 % à la Benzylpénicilline (PNG ; 1 IU), 50 % Céfoxitine (FOX ; 30 µg) et à l'Ampicilline (AMP ; 10 µg). Concernant, la famille des Aminosides, 50 % des souches ont résisté à la Kanamycine (KMN ; 30 µg) et à la Gentamicine (GMN ; 10 µg). Quant aux macrolides, les antibiotiques testés n'ont pas eu d'effet sur la plus grande partie des souches se traduisant par la grande résistance observée vis-à-vis de l'Erythromycine (ERY ; 15 µg) (63 %) et de la Clindamycine (CMN ; 2 µg) (50 %). Par rapport aux Fluoroquinolones, 50 % des souches ont résisté à la Norfloxacine (NXN) 10 µg, la Ciprofloxacine (CIP ; 5 µg) et à la Moxifloxacine (MXF) et 37 % à la Nitroxoline (NIR ; 30 µg). L'antibiogramme a aussi révélé une grande résistance des souches de cet agent pathogène face aux autres familles d'antibiotiques comme la Fosfomycine (FOS ; 200 µg) (63 %), la Rifampicine (RIF ; 5 µg) (50 %) et le Chloramphénicol (CHL ; 30 µg) (37 %).

Résultats et Discussion

L'étude de la résistance des différentes souches isolées à partir des salades de 4^{ème} gamme a permis d'observer cinq (05) phénotypes à savoir : le Méti R, le KTG, le MLSB, la résistance aux Fluoroquinolones et le phénotype sauvage. Ainsi, quatre (04) souches sur huit (08) ont présenté une multirésistance soit une prévalence de 50 % contre 50 % de souches sauvages (Figure 55).

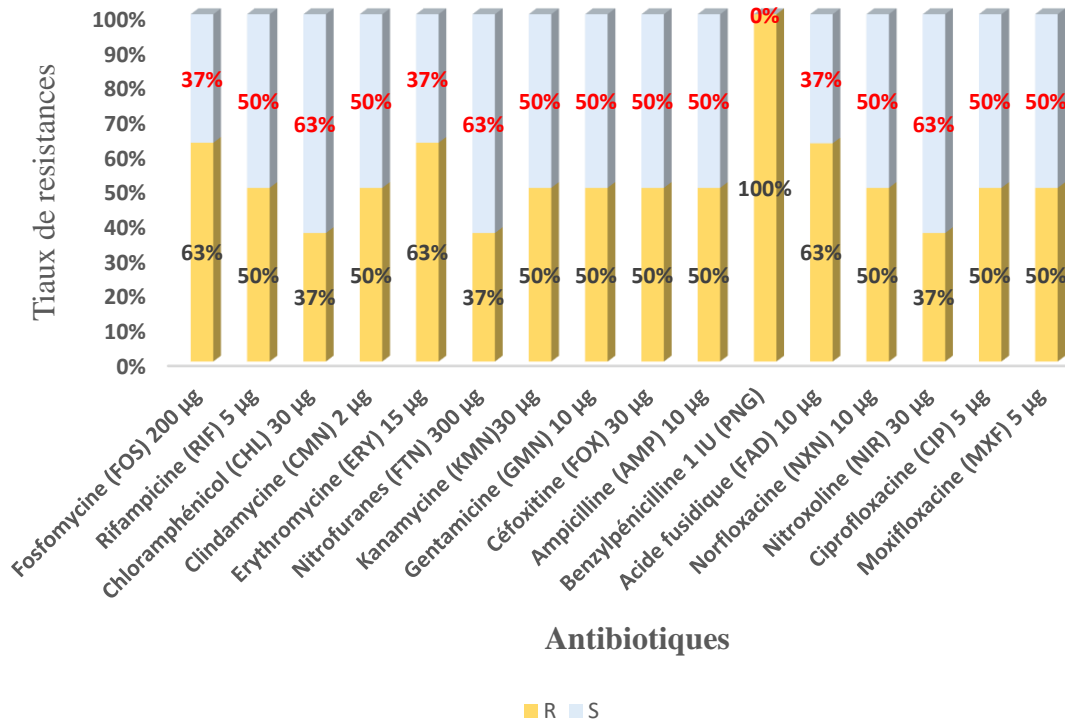


Figure 54 : Profil de résistances des souches de *S. aureus* isolés dans les salades de 4^{ème} gamme

R : Résistant ; S : Sensible

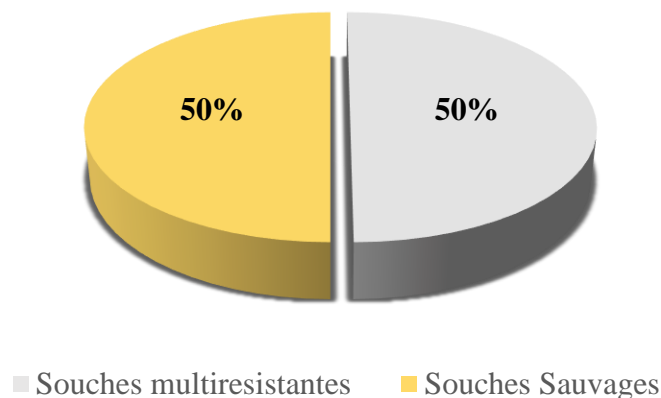


Figure 55 : Prévalence de la multirésistances des souches de *S. aureus* isolés

Résultats et Discussion

3.1.6.2.4. Sensibilité des bactéries pathogènes psychrotrophes provenant des salades à consommer

L'antibiogramme réalisé sur les espèces psychrotrophes isolées dans les salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces de la Ville d'Abidjan a donné des diamètres d'inhibitions consignés dans les tableaux XV, XVI, XVII et XVIII. L'analyse des tableaux montre que les espèces *L. monocytogenes* et *L. fusiformis* sont sensibles à tous les antibiotiques testés. Concernant, l'espèce *B. cereus*, elle a développé une grande résistance face à plusieurs familles d'antibiotiques lui conférant une multirésistance en occurrence vis-à-vis des antibiotiques de la famille des Fluoroquinolones (Norfloxacin 10 µg, Levofloxacin 5 µg, Ciprofloxacin), de la famille des Macrolides (Erythromycine 15 µg) et aux carbapèmes (Impénème 10 µg). Les analyses ont aussi révélé l'existence d'une multirésistance de *S. fleurettii* face aux antibiotiques utilisés appartenant à la famille des Fluoroquinolones (Levofloxacin 5 µg et Ciprofloxacin 5 µg), à la famille des Macrolides (Erythromycine et Clindamycine 2 µg) et à d'autres familles (Rifampicine 5 µg, Minocycline 30 µg, Acide fusidique 10 µg et Tétracycline 30 µg). Les phénotypes MLSBc et Résistance aux fluoroquinolones ont été décelés. Pour l'espèce *S. saprophyticus*, une résistance a été observée face aux Macrolides (Erythromycine et Clindamycine 2 µg). La résistance aux microlites de cette espèce met aussi en évidence le phénotype MLSBc. *S. saprophyticus* a aussi développé une résistance face à la Rifampicine (RIF ; 5 µg), au Minocycline (MNO ; 30 µg), à l'Acide fusidique (FAD ; 10 µg) et à la Tétracycline (TET ; 30 µg). Quant à l'espèce *S. nepalensis*, elle a été sensible à la plupart des antibiotiques testés, sauf au Chloramphénicol (CHL ; 30 µg), l'Acide fusidique (FAD ; 10 µg) et à la Tétracycline (TET ; 30 µg).

Tableau XV : Diamètres d'inhibition (en mm) des souches de *L. monocytogenes*

Antibiotiques	<i>L. monocytogenes</i>	
	D	INT
Ampicilline (API) 2 µg	24	S
Erythromycine (ERY) 15 µg	14	S
Benzylpénicilline (PNG) 1 IU	27	S
Triméthoprime (TMP) 5 µg	24	S
Méropénème (MEM) 10 µg	26	S

S : Sensible ; D : Diamètre d'inhibition (mm) ; INT ; Interprétation

Résultats et Discussion

Tableau XVI : Résistance de *B. cereus* vis-à-vis des antibiotiques

Antibiotiques	<i>B. cereus</i>	
	D	INT
Norfloxacine (NXN) 10 µg	11	R
Clindamycine (CMN) 2 µg	17	S
Levofloxacine (LVX) 5 g	24	I
Impénème (IMP) 10 µg	25	R
Erythromycine (ERY) 15 µg	14	R
Ciprofloxacine (CIP) 5 µg	23	R
Vancomicine (VNC) 5 g	14	S

R : Résistant ; *S* : Sensible ; *I* : Intermédiaire ; *D* : Diamètre d'inhibition (mm) ; *INT* ; Interprétation

Tableau XVII : Sensibilité de *L. fusiformis* vis-à-vis des antibiotiques

Antibiotiques	<i>L. fusiformis</i>	
	D	INT
Vancomicine (VNC) 5 g	15	S
Ciprofloxacine (CIP) 5 µg	26	S
Ampicilline (AMP) 10 µg	6	S
Gentamicine (GMN) 10 µg	24	S
Benzylpénicilline (PNG) 1 IU	18	S
Clindamycine (CMN) 2 µg	17	S

S : Sensible ; D : Diamètre d'inhibition (mm) ; INT ; Interprétation

Résultats et Discussion

Tableau XVIII : Résistance des souches de SCN face aux antibiotiques

Antibiotiques	<i>S. saprophyticus</i>		<i>S. nepalensis</i>		<i>S. fleurettii</i>	
	D	INT	D	INT	D	INT
Rifampicine (RIF) 5 µg	10	R	34	S	13	R
Minocycline (MNO) 30 µg	9	R	22	S	13	R
Chloramphénicol (CHL) 30 µg	26	S	12	R	26	S
Clindamycine (CMN) 2 µg	22	R	23	S	6	R
Erythromycine (ERY) 15 µg	6	R	21	S	6	R
Céfoxitine (FOX) 30 µg	23	S	22	S	23	S
Acide fusidique (FAD) 10 µg	9	R	18	R	6	R
Levofloxacin (LVX) 5 µg	27	S	26	I	23	R
Ciprofloxacine (CIP) 5 µg	28	S	26	I	25	R
Tétracycline (TET) 30 µg	15	R	13	R	15	R
Triméthoprime (TMP) 5 g	24	S	15	S	15	S

R : Résistant ; S : Sensible ; I : Intermédiaire ; D : Diamètre d'inhibition (mm) ; INT ; Interprétation

SCN : *Staphylococcus* a coagulase positive

3.2. Discussion

3.2. 1. Niveau de consommation des salades prêtes à consommer dans la ville d'Abidjan

De nos jours, l'intérêt croissant pour un mode de vie sain, afin de compenser les habitudes alimentaires modernes a conduit à une demande accrue de produits sains avec des temps de préparation courts. C'est le cas de la ville d'Abidjan où aujourd'hui la population aspire à un déménagement vers un mode de vie sain. Les travaux réalisés dans le but d'évaluer les niveaux de consommation des salades de 4^{ème} gamme d'Abidjan ont révélé que sur 1169 personnes interrogées, 78 % des personnes interceptées connaissent les salades de 4^{ème} gamme et 59 % des enquêtées en consomment. Lorente-Mento *et al.* (2022), au cours d'une enquête réalisée en Espagne sur les salades fraîchement coupées prêtes à consommer ont trouvé que 4 personnes sur 297 répondants ne connaissaient pas l'existence de ces salades. Ces auteurs ont aussi indiqué que 224 parmi les enquêtés (75,42 %) ont été des consommateurs de ces salades peu transformées contre 69 (24,58 %) qui n'en consommaient pas. Selon ces auteurs, la principale raison évoquée pour ne pas consommer ces aliments est liée aux questions environnementales comme l'emballage et la durée de conservation. Dinnella *et al.* (2014) ont défini cinq attributs à savoir la coloration des feuilles, l'intégrité de la feuille, la turgescence de la feuille, l'assortiment de salades et l'humidité à l'intérieur de l'emballage, utilisés systématiquement par les consommateurs pour déterminer la durée de conservation. Quatre d'entre eux (couleur verte, intégrité de la feuille, turgescence de la feuille et humidité à l'intérieur de l'emballage) décrivent clairement les phénomènes de vieillissement physiologique de l'organe de la feuille comme le montre Ok & Gil (2007). Les travaux réalisés par ces auteurs pourraient justifier l'influence de la connaissance et la consommation des salades de 4^{ème} gamme par le niveau d'instruction des consommateurs. Selon Van Loo *et al.* (2010), les consommateurs ayant un diplôme d'études supérieures étaient plus susceptibles de classer ces produits dans la catégorie des aliments « aussi sûrs que » ceux des restaurants. Cependant, même si les proportions concernant la connaissance et la consommation des salades prêtes à consommer obtenues dans cette étude sont similaires à celles rapportées par ces différents auteurs, les raisons pour ne pas consommer les salades de 4^{ème} gamme dans le cas échant semblent être différentes. En effet, il ressort des résultats obtenus au cours de cette étude que la connaissance des salades de 4^{ème} gamme est liée à la commune ($\text{Khi}2 = 75, 796$; $\text{df} = 9$; $\text{p-value} = 1,1.10^{-12}$) et à la profession des individus enquêtés ($\text{Khi}2 = 41,566$; $\text{df} = 5$; $\text{p-value} = 7,211.10^{-8}$) et la consommation quant à elle est liée à la commune ($\text{Khi}2 = 54,389$, $\text{df} = 9$, $\text{p-value} = 1,592.10^{-8}$), à la profession ($\text{Khi}2 = 46,42$; $\text{df} = 5$; $\text{p-value} = 7,46.10^{-9}$) et au sexe ($\text{Khi}2 = 8,9187$; $\text{df} = 1$; $\text{p-value} = 0,002823$) mais pas aux niveaux d'études. Ces variables (connaissance, consommation) qui sont influencées pour

Résultats et Discussion

la plupart par la profession laisse à croire qu'il existerait une limite pour certaines personnes à la consommation due au coût du produits et aussi à sa non disponibilité dans toutes les communes de la ville d'Abidjan. Par ailleurs, le taux de consommation élevé dans la ville d'Abidjan malgré sa récente apparition dans les rayons des hypermarchés serait probablement lié à la commodité (fraicheur, conditionnement, composants) qui pourrait être la principale motivation pour l'achat des salades prêtes à consommer (Vidal *et al.*, 2013). Les résultats obtenus dans cette étude sont semblables à ceux de Massaglia *et al.* (2019) dans la région métropolitaine de Turin (Nord-Ouest de l'Italie). En effet, ces auteurs ont enregistré 35 % sur le nombre total des consommateurs interrogés qui ne consomment pas les salades de 4^{ème} gamme contre 65 % qui en consomment. Selon eux la consommation accrue de ces aliments serait liée à sa qualité, à sa fraicheur, à sa sécurité sanitaire mais aussi au service de fourniture. Ces résultats s'expliqueraient par la forte aspiration de la population abidjanaise à un mode de vie sain dû à l'urbanisation. Car, un mode de vie sain nécessite l'adoption d'un régime alimentaire qui pourrait réduire l'incidence des maladies non transmissibles telles que le diabète, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Cambeses-Franco *et al.*, 2021). Selon l'OMS, la FAO et le Fonds mondial de recherche sur le cancer, la consommation d'une portion de 400 à 600 g de fruits et légumes par jour est idéale pour un mode de vie sain (Pollard *et al.*, 2009 ; Adjrah *et al.*, 2011). De plus, dans la présente étude les salades de fruits ont été appréciées autant que les salades de légumes. Ces résultats sont en conformité avec ceux de Uddin *et al.* (2021) au Japon. En outre, ces auteurs ont démontré que les consommateurs des fruits et légumes peu transformés accordent autant d'importance au goût, à l'odeur et à l'apparence de la même manière lors de l'achat et de la consommation. Quant aux cas de malaises selon cette enquête, la consommation de ces aliments serait liée à certains cas de malaises avec la diarrhée comme symptôme majeur (54 %). Ces résultats traduiraient une piètre qualité hygiénique due à la présence probable des pathogènes comme *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* (Paudyal *et al.*, 2017). Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux de Vestrheim *et al.* (2016) qui ont rapporté des résultats similaires lorsqu'ils travaillaient sur l'aptitude à la consommation des salades prêtes à consommer en Norvège. Selon eux, les salades prélavées et ensachées comportent un risque d'infection malgré les procédures de nettoyage appliquées. Les résultats corroborent également avec ceux rapportés par Nyenje *et al.* (2012) qui ont montré que les échantillons d'aliments prêts à consommer examinés ne répondaient pas aux normes de qualité bactériologique dans une étude menée en Afrique du Sud. Ainsi, ils estiment que ces aliments présenteraient des risques potentiels pour les consommateurs. Plusieurs études réalisées sur les

salades prêtes à consommer à travers le monde ont rapporté la forte implication des salades de légumes dans les cas d'infections. Oliveira *et al.* (2019) ont mis en exergue la présence de pathogènes dans les légumes peu transformés prêts à consommer au Brésil. Selon Fong *et al.* (2018), les légumes verts à feuilles sont les plus préoccupants et sont associés à de multiples épidémies avec un nombre élevé de maladies. En effet, bon nombre de ces légumes sont cultivés et transformés selon des méthodes extrêmement diverses et complexes, allant du conditionnement en plein champ aux produits prédécoupés et ensachés. Mais, les résultats statistiques dans cette étude ont montré que le type de salade n'est pas liée aux cas de malaises ($p\text{-value} = 0,1097 > 0,05$) ni liée aux symptômes ($p\text{-value} = 0,2859 > 0,05$).

3.2.2. Appréciation de la teneur des paramètres physico-chimiques déterminés dans les salades prêtes à consommer

Les paramètres physico-chimiques sont des éléments nécessaires dans la conservation des aliments en l'occurrence les produits de la quatrième (4^{ème}) gamme. En effet, si certains paramètres physico-chimiques sont maîtrisés, la croissance de la plupart des microorganismes d'altération et potentiellement pathogènes peut être évitée. Parmi ces facteurs, figure la teneur en eau (TE), l'un des paramètres influençant la croissance des microorganismes. Federici *et al.* (2021) ont démontré que le taux d'humidité affecte négativement la durée de conservation des aliments prêts à consommer en sachets. Ainsi, de nombreuses méthodes de conservation tentent de diminuer la teneur en eau des aliments pour améliorer leur durée de conservation (Prabhakar, 2014). Au cours des présents travaux réalisés sur quelques paramètres physico-chimiques des salades de 4^{ème} gamme, il s'est avéré que les échantillons analysés sont riches en eau (valeurs comprises entre $80,00 \pm 0,02$ et $95,92 \pm 0,16$ %). Par conséquent, cette humidité élevée est un atout pour la prolifération microbienne qui pourrait rendre ces aliments très périssables et très fragiles sur le plan microbiologique. Keenan *et al.* (2012) ont obtenu des valeurs élevées en humidité (83,97-88,03 %) des prêts à consommer à base de fruits frais (pommes) lors d'une étude réalisée en Irlande. Schmidt & Fontana (2007) ont aussi entrepris des travaux dans ce sens aux Etats Unis, mettant ainsi en exergue de fortes teneurs en eau des fruits et légumes. Également, les salades de 4^{ème} gamme analysées par Dekhinet & Fedali (2017) en Algérie ont été très riches en eau ($88,69 \pm 8,9$ - $94,68 \pm 0,09$ %). Ces différents résultats sont similaires à ceux obtenus au cours de cette étude. Par ailleurs, les salades SME, Cf, SN, SCB, SChV composées uniquement de légumes ont enregistré les plus fortes teneurs en eau. Ces résultats rejoignent ceux de Vierling (2003) qui a rapporté en France (Bordeau) que les légumes frais sont des produits aqueux dont la teneur en eau est en moyenne de 90 à 95 %. Yao *et al.* (2020)

Résultats et Discussion

au cours des travaux réalisés en Côte d'Ivoire ont obtenu des valeurs voisines avec la plus forte teneur en eau pour des légumes feuilles ($93,75 \pm 0,12$ %).

Le pH aussi est l'un des facteurs qui influence énormément la croissance microbienne. Ce dernier doit être connu et contrôlé pour assurer une bonne conservation. En outre, le pH de la plupart des légumes et de certains fruits favorise également la croissance des bactéries d'origine alimentaire (Desbordes, 2003). Les résultats obtenus à travers ces travaux ont montré des valeurs du pH comprises entre $2,70 \pm 0,12$ et $7,91 \pm 0,78$. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Bernardo *et al.* (2021). En effet, ces auteurs durant une étude basée sur l'évaluation de la durée de conservation d'une salade prête à consommer produite industriellement, ont déterminé à J0, des valeurs de pH allant de $5,930 \pm 0,033$ à $6,647 \pm 0,491$, respectivement à 4 et 16 °C. Ziegler *et al.* (2019) ont obtenu sensiblement les mêmes résultats (6,43 et 6,84) dans les salades prêtes à consommer. García-Gimeno & Zurera-Cosano (1997), quant à eux ont observé une diminution du pH (proche de 4) des salades de légumes prêtes à consommer stockées dans une atmosphère modifiée. Cette baisse de pH a été également décrite par Daniels *et al.* (1985), Farber (1991) et AbdulRaouf *et al.* (1993). Le pH permissif (6,0-7,0) rapporté par Arienzo *et al.* (2020) a été l'une des causes de la contamination microbienne des salades de feuilles vertes prêtes à consommer. Les résultats obtenus dans cette étude ont également montré que la plus petite valeur de pH obtenu est celle des salades de fruits composés (SFC) et que la plus élevée concerne celle des Epinards (Ep). Il s'est avéré que les différents types de salades analysés ont eu généralement un pH inférieur à 7. Toutefois, les salades SCH, JP, MR, Ma, Rq et Ep sont caractérisées par leur pH plus élevé. Ces résultats montrent clairement que les salades composées uniquement que de feuilles sont moins acides que les salades de fruits ainsi que les légumes-fruits. Les analyses effectuées sur les légumes feuilles par Yao *et al.* (2020) ont indiqué des valeurs de pH comprises entre $6,22 \pm 0,02$ et $6,67 \pm 0,01$, similaires à ceux trouvés par Suthep *et al.* (2016) dans la laitue, un légume à feuilles vertes ($6,64 \pm 0,78$ - $6,89 \pm 0,98$). Ces différents résultats corroborent ceux obtenus dans cette étude. L'acidité titrable enregistré dans les échantillons de salades prêtes à consommer de la présente étude a varié significativement (92 ± 6 à 1144 méq.g/100 g). Ce résultat serait probablement dû à une multiplication des bactéries lactiques soit retardé grâce au conditionnement sous atmosphère modifiée et à la température de conservation (4 °C). Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Greau (1975). Selon cet auteur le métabolisme des bactéries vivantes continue de fonctionner au ralenti et transforme une partie du glucose résiduel en acide lactique dans un environnement dépourvu d'oxygène et qui rend l'échantillon plus aigre. Quant au sucre, il s'est avéré que la majorité des échantillons sont moins riches en sucre totaux avec des valeurs de l'indice de

Résultats et Discussion

réfraction qui varient entre $1,00 \pm 0,00$ et $15,05 \pm 0,09$ °Brix dont les plus grandes valeurs ont été observées au niveau des salades de fruits. De façon générale les fruits sont plus riches en sucre et ont degré Brix plus élevé que les légumes. C'est le cas des salades de raisin qui ont enregistré les taux élevés de IR avec $15,05 \pm 0,09$ °Brix contre 1 °Brix SCB. Les résultats de cette étude concordent avec ceux de Yao *et al.* (2020), qui ont aussi obtenus des valeurs faibles de degré Brix ($2,16 \pm 0,47$ à $7,00 \pm 0,00$ °Brix) au niveau des légumes feuilles. Ces valeurs sont inférieures à celles du Codex Alimentarius (2005) qui sont comprises entre 20 à 55 °Brix pour les légumes feuilles.

3.2.3. Qualité microbienne des salades de 4^{ème} gamme à l'ouverture ouverture des emballages.

Dans ce travail, la qualité microbiologique des salades prêtes à consommer vendues dans les hypermarchés d'Abidjan a été analysée et un suivi de l'évolution de la croissance microbienne a été effectué après ouverture des emballages. Les dénombrements ont révélé la présence des Germes Aérobie Mésophile (GAM), des Psychrophiles (GAP) et de Flore Fongique (FF) revivifiables. Les résultats ont ainsi indiqué que six (06) salades (Ep, Ma, Rq, Cf, , MR, SCA) sont de qualité microbiologique satisfaisante en raison des charges moyennes microbiennes qui varient entre $5,65.10^2 \pm 15$ et $7,20.10^6 \pm 0$ UFC/g pour la flore bactérienne et une charge maximale en champignons de $4,26.10^3 \pm 0$ UFC/g. En effet, selon les critères microbiologiques conformes au règlement 2073/2005/CE, les charges moyennes admissibles en flore aérobie totale et en flore fongique pour les végétaux frais peu transformés ne dépassent pas respectivement 10^7 UFC/g et 10^4 UFC/g (CMADA, 2018). En addition, deux (02) échantillons de salades (JP et SFR) ont été de qualités acceptables à cause des charges moyennes comprises entre les valeurs minimales acceptables et maximales critique selon CMADA (2018). Cependant, la plupart des salades ont été de qualité insatisfaisante avec des risques probables pour le consommateur car les charges moyennes dépassent les valeurs critiques (10^8 UFC/g pour les bactéries et 10^5 UFC/g pour la flore fongique). Cette forte contamination pourrait être liée aux conditions de culture mais aussi aux traitements post-récoltes après réception des légumes (Caponigro *et al.*, 2010). Ceci est en accord avec les travaux de Akoachere *et al.* (2018) qui ont montré que l'hygiène et les mauvaises pratiques de stockage des légumes peuvent aggraver la contamination bactérienne. Les résultats obtenus dans cette étude corroborent ceux obtenus par Calonico *et al.* (2019). Ces auteurs ont rapporté une charge microbienne élevée dans des échantillons de salades prêtes à consommer vendus au détail en Italie. Selon eux, cette forte contamination serait principalement due à la multiplication microbienne qui se produit

Résultats et Discussion

pendant le stockage et le transport de l'industrie aux détaillants, puis à la maison. Abakari *et al.* (2018) ont aussi déclaré que la contamination pourrait être attribuable à la source de production des légumes et à une mauvaise manipulation des aliments. D'ailleurs, Cerna-Cortes *et al.* (2015), au cours des travaux réalisés sur la qualité microbiologique des légumes prêts à consommer collectés à Mexico (Mexique) ont détecté la présence des bactéries aérobies mésophiles dans tous les échantillons quel que soit la source d'approvisionnement. Dans la présente étude, les résultats obtenus laissent à penser que l'état hygiénique de ces aliments est aussi lié au conditionnement. En effet, la plupart des salades qualifiées de qualité satisfaisante ou acceptable (Ep, Ma, Rq, Cf, JP) proviennent des pays européens et sont conditionnées dans des emballages avec une atmosphère modifiée ; ce qui n'est pas le cas pour les autres (salades locales). De plus, les germes aérobies psychrophiles (GAP) et aérobies mésophiles (GAM) se sont plus développés dans les SChV et SME qui sont des salades locales dont les emballages sont en matériel plastique perforé (barquettes) de tous les côtés sauf le bas. En effet, l'atmosphère commerciale est modifiée par 0,25-3 % O₂ et 3-12 % CO₂ avec un équilibre en N₂ (O'Beirne *et al.*, 2015). Aussi, le stockage à une température maximale de 4 °C maintient le produit dans son état initial sur une durée de conservation entre 7 à 10 jours (De Giusti *et al.*, 2010). Caleb *et al.* (2012) ont prouvé que l'emballage des produits frais et peu transformés (4^{ème} gamme) doit avoir une température spécifique. En effet, une température de stockage domestique élevée entraînerait une croissance bactérienne. Aussi, il faut noter que la plupart des hypermarchés, pour satisfaire à la demande des consommateurs produisent des salades sans toutefois tenir compte de la qualification des producteurs. Pourtant, les conditions de préparation et de vente des aliments et les types d'eau utilisés dans le lavage des fruits et légumes, constitueraient des risques potentiels de contamination des salades de 4^{ème} gamme (Soncy *et al.*, 2019). Pour Delibato *et al.* (2018), la décontamination complète n'était pas atteinte dans les produits végétaux frais prêts à consommer malgré les types de lavage recommandés. En général, la grande croissance des GAP dans la salade mixte composée de Meli Melo (SME) laisse à penser que ce résultat serait probablement dû à la composition de cette salade qui pourrait agir sur le pH ($5,37 \pm 0,05$). En effet, un aliment acide favorise une croissance importante des bactéries lactiques psychrophiles. García-Gimeno & Zurera-Cosano (1997) ont montré que l'altération des salades composées stockées à une température de 4 °C était liée aux bactéries lactiques. La teneur en eau pourrait aussi être l'une des causes de l'abondance de la flore microbienne dans les salades SME ($95,92 \pm 0,16$ % d'humidité). En effet, selon Qadri *et al.*, (2015), les tissus blessés des produits fraîchement coupés et les fluides libérés agissent comme un environnement nutritif complet pour la croissance des microorganismes. Aussi, l'eau

Résultats et Discussion

de lavage est également une préoccupation car elle pourrait s'infiltrer dans les espaces intercellulaires dans certaines conditions. Des études similaires, qui relient la quantité d'eau avec la qualité microbiologique dans les légumes ont également été rapportées (Beattie & Lindow, 1999). L'état hygiénique des échantillons analysés dans cette étude pourrait être lié également à la durée de conservation. En effet, Arienzo *et al.* (2020) ont révélé des charges bactériennes totales élevées dans tous les échantillons analysés à la date d'emballage et à la date de péremption. Les résultats dans cette étude ont également montré une présence de la flore fongique dans la plus grande partie des échantillons avec les charges moyennes les plus concentrées dans les salades de fruits. Ces données s'expliqueraient par une microflore prédominante des fruits frais qui est constituée de champignons en raison de la faible activité de l'eau A_w à la surface (Goepfert, 1980). Cependant, les opérations de productions et les conditions d'emballages peuvent transformer l'écologie microbienne des produits frais (Soliva-Fortuny *et al.*, 2004). La charge élevée de la flore fongique dans ces produits a été également signalée par Liao & Fett (2001). De plus, Manthou *et al.* (2021) ont montré que les levures étaient les microorganismes d'altération prédominantes trouvées dans les ananas prêts à consommer. D'après eux, la forte population de levures est probablement attribuée au niveau élevé de sucres et au faible pH de l'ananas, qui est un atout favorable à leur croissance (Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2020 ; Da Cruz Almeida *et al.*, 2018 ; Maciel *et al.*, 2013).

Concernant, le suivi de la croissance microbienne après ouverture des emballages, le dénombrement par intervalle de temps a permis d'observer le comportement des microorganismes dans ces aliments durant la période de conservation domestique. D'abord s'agissant des GAM, ils se sont développés significativement dans toutes les salades sauf celles de SCOM. La croissance importante observée au niveau de cette flore renseignerait sur une fluctuation de température de conservation. Selon Lorente-Mento *et al.* (2022), la charge bactérienne augmente pour tous ces microorganismes dans les salades prêtes à consommer lors du stockage dans les réfrigérateurs domestiques. Cette charge bactérienne pourrait accroître avec les changements de température dus à l'ouverture continue du réfrigérateur. La croissance des microorganismes pourrait aussi être la cause d'une augmentation de la température allant de 8 à 10 °C pendant des périodes plus prolongées. Tsironi *et al.* (2017) ont aussi prouvé cela dans une étude réalisée sur la cinétique systématique de la perte de qualité des salades composées (laitue lollo rosso - 40 %, laitue lollo verde - 45%, roquette - 15 %) conditionnées sous atmosphère modifiée (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂). Les charges moyennes des GAM dans les salades SCOM n'ont pas augmenté significativement. Ce résultat serait lié à la température de conservation (Garg *et al.*, 1990). Pour les GAP, la croissance a été très significative dans

Résultats et Discussion

tous les échantillons. Cette croissance, pourrait être due à l'emballage et à la température de conservation basse favorable à la prolifération pour ce groupe de microorganisme. En effet, selon García-Gimeno & Zurera-Cosano (1997), la croissance des GAP serait influencée par divers facteurs à savoir, la concentration en CO₂, le pH et la température de stockage. Une diminution du pH des aliments stockés dans une atmosphère modifiée a été décrite par Daniels *et al.* (1985), Farber (1991) et Abdul-Raouf *et al.* (1993) ; ce qui favoriserait la croissance des bactéries psychrophiles lactiques durant la période de conservation des salades. En ce qui concerne la flore fongique, la croissance a été significative dans l'ensemble des échantillons, ce qui se justifierait par la présence dominante de levures. Les résultats de cette étude rejoignent ceux de Tournas (2005) qui a montré une évolution significative des levures et moisissures dans les salades prêtes à consommer dans la région de Washington aux USA. Selon cet auteur, les levures étaient les organismes les plus répandus dans ces échantillons, à des niveaux allant de moins de 100 à 4,0.10⁸ UFC/g. Le nombre de moisissures variait généralement de moins de 100 à 4,0.10⁴ UFC/g. En somme, les résultats de la présente étude stipulent que les salades SChV, SME, SFP et SFPM sont plus propices à la croissance des microorganismes. En outre, les SChV sont les salades dans lesquelles la croissance des germes aérobies psychrophiles a été plus accentuée pendant que la flore aérobie mésophile s'est plus développée dans les salades SME. Quant à la flore fongique, la croissance a été plus significative dans les salades de fruits tels que SFP et SFPM.

Le suivi de la croissance des microorganismes dans les échantillons de salades analysées a mis en exergue une corrélation significativement positive entre les GAM et les GAP. Ce résultat traduirait une croissance simultanée de ces deux groupes de bactéries qui pourrait être liée aux conditions de conservation dont la température de conservation. En effet, plusieurs pathogènes mésophiles d'origine alimentaires sont capables de se développés à de basses températures en occurrence, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* et bien d'autres. C'est le cas des travaux réalisées par Abakari *et al.* (2018) qui ont mis en évidence les souches de *Escherichia coli* dans 96,7 %, des échantillons de salade avec des niveaux allant de 0 à 7,56. 10² UFC/g, des souches de *Bacillus cereus* (93,3 %) des échantillons avec des charges comprises entre 0 et 7,44.10² UFC/g. De plus, *Salmonella* spp. et *Shigella* spp. étaient présents dans 73,3 % et 76,7 % des salades, respectivement. Aussi, plusieurs études ont révélé la présence des *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* dans ces mêmes types d'aliment. Par ailleurs, *Listeria monocytogenes* qui est le redoutable pathogène psychrophile des salades prêtes à consommer, est capable de se développer sur une large gamme de température, ce qui pourrait être la cause

Résultats et Discussion

de cette corrélation positive de croissance entre les GAM et GAP de bactéries dans les échantillons analysés. L'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (ACIA) a trouvé des bactéries potentiellement pathogènes dans divers aliments prêts à consommer. En effet, elle a montré une forte contamination par *B. cereus* ($10^3 < x \leq 10^4$ UFC/g), *S. aureus* ($10^2 < x \leq 10^4$ UFC/g) et *L. monocytogenes* de ces aliments à ingrédients multiples peu transformés et réfrigérés. L'évolution simultanée de ces deux groupes dans cette étude renseignerait sur une absence de compétition entre ces flores dans tous les échantillons sauf ceux de SCOM et SChV. Par contre, il n'y a pas de corrélation entre la flore bactérienne et la flore fongique. Dans les salades de fruits, la flore fongique s'est développée significativement en conservant les plus grandes charges tandis que la flore bactérienne quant à elle, s'est montrée plus significative dans les salades de légumes. Les travaux de Manthou *et al.* (2021) ont montré une croissance inhibitrice des levures sur la flore bactérienne dans une étude réalisée sur l'ananas prêts à consommer. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont donc en conformité avec ceux obtenus par ces auteurs.

3.2.3. Niveau de contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes bactériens

3.2.3.1. Niveaux de contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes de portage

Au cours de cette étude, une forte contamination des salades de 4^{ème} gamme par des potentiels pathogènes bactériens de portage a été observée. Les pathogènes mis en évidence étaient *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp. La présence de ces germes dans les salades pourrait s'expliquer par un état sanitaire médiocre des matières premières, du matériel de production, une mauvaise hygiène du personnel ou la contamination croisée des agents pathogènes des aliments crus, qui pourrait s'aggraver par un environnement insalubre (Paudyal *et al.*, 2017).

Cette étude a permis de mettre en évidence des prévalences de 23,68 %, 18,42 % et 21,05 % respectivement *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Paudyal *et al.* (2017), au cours d'une étude réalisée sur la prévalence d'agents pathogènes d'origine alimentaire dans les aliments crus provenant des pays Africains. Ces auteurs ont trouvé une prévalence en *S. aureus* de 27,8 % et en *Salmonella* spp. de 19,9 % dans les aliments de 4^{ème} gamme. Dans une étude réalisée en Iran, sur un total de 60 échantillons de salades de légumes prêtes à consommer, 10 échantillons ont été positifs à *E. coli* soit une prévalence de 16,66 % (Kochakkhani *et al.*, 2016). Aussi, les travaux réalisés sur la prévalence des pathogènes dans les salades prêtes à consommer en Grèce, ont fait état d'une prévalence de

Résultats et Discussion

27 % de *S. aureus* (Sergelidis *et al.*, 2012a). Mekhloufi *et al.* (2021), quant à eux ont montré une prévalence de *S. aureus* de 23,2 % dans les aliments prêts à consommer collectés en Algérie. Habibi Najafi (2012) a révélé également de fortes contaminations des salades mixtes prêtes à consommer par *S. aureus* (23,6 %) et *E. coli* (11,4 %). Les salades de légumes prêtes à consommer vendues dans le quartier central des affaires de Tamale au Ghana étaient aussi fortement contaminées par *Salmonella* spp. avec une prévalence de 73,3 % (Abakari *et al.*, 2018b). Une forte contamination des salades de 4^{ème} gamme par les pathogènes bactériens de portage a été révélée au cours de cette étude. Mais, Sant'Ana *et al.* (2011) ont trouvé des résultats contraires au cours de leurs travaux réalisés sur les légumes peu transformés à São Paulo au Brésil où le niveau de contamination par *Salmonella* spp. était de 0,7 % (4/512). Cette différence s'expliquerait par l'application de bonne pratique d'hygiène qui a conduit un état un état hygiénique satisfaisant dans la production de leurs salades.

Il ressort des analyses de la présente étude que 6 salades à savoir Baby Epinards (Ep), 100 % Coeur de frisés (Cf), Mâches (Ma), Salades de Fruits d'Ananas (SFA), Salades de Fruits d'Ananas + Mangues (SFAM), Salades de Fruits de Papaye + Citron (SFPC), conformément aux critères microbiologiques du règlement 2073/2005/CE étaient de qualité microbiologique satisfaisante (31,57 %), une salade (SFC) était de qualité acceptable (5 %) et toutes les autres (MR, JP, SCB, SCA, SA, SCH, SME, SChV, SFPC, SFR, SFPA, SFP, SFR, SFPM) étaient insatisfaisantes (63,43 %) à l'ouverture des emballages (J0). La qualité microbiologique insatisfaisante enregistrée en grande partie dans les salades est liée à la présence des souches de *Salmonella* spp., de la forte charge moyenne de *S. aureus*, comprise entre $1,89.10^3$ et $4,63.10^5$ UFC/g et celle de *E. coli* qui a varié entre $1,87.10^2$ et $2,21.10^6$ UFC/g. La qualité microbiologique médiocre dominante sur l'ensemble des salades témoigne d'un risque direct et élevé pour la santé de la population avec des conséquences sérieuses surtout à cause de la présence de *Salmonella* spp. Cette qualité médiocre pourrait être liée à une insuffisance dans la pratique d'hygiène durant la production de ces aliments. La forte présence de ce pathogène pourrait aussi s'expliquer par une prolongation de la durée de stockage de ces aliments dans les rayons des supermarchés. Arienzo *et al.* (2020), au cours de leurs travaux réalisés sur la qualité et la sécurité microbiologiques des salades légumes-feuilles prêtes à consommer vendues dans les grandes chaînes de supermarchés de Latium, en Italie, ont rapporté une qualité microbiologique insatisfaisante dans tous les échantillons analysés à la date d'emballage et à la date de péremption, et une prévalence très élevée de *Salmonella* spp. (67 %) quelles que soient les variétés sélectionnées et les catégories de coûts. Xylia *et al.* (2021), au cours de leurs travaux ont indiqué que la date de péremption, et la durée de conservation des légumes peu transformés

Résultats et Discussion

sont des paramètres importants dans la gestion de la sécurité sanitaire de ces produits. Ces paramètres augmenteraient la croissance bactérienne ; ce qui est en conformité avec les résultats de la présente étude. Aussi, les charges élevées de *S. aureus* et de *E. coli* indiquent que les différentes salades contaminées pourraient avoir sur la santé des consommateurs des répercussions indésirables temporaires (CMADA, 2018). Par ailleurs, la préparation de salades à ingrédients mixtes nécessite plusieurs opérations unitaires à cause du nombre élevé des ingrédients; ce qui présente un risque supplémentaire de contamination bactérienne (Söderqvist, 2017). Yildirim *et al.* (2013), durant une étude réalisée sur la qualité microbiologique des salades prêtes à consommer vendues à Afyonkarahisar en Turquie ont noté de forte contamination par *S. aureus* avec des charges supérieures à 2 log UFC/g. Ils ont ainsi affirmé que les fortes contaminations de ces aliments peuvent constituer un danger potentiel pour la santé publique. Une étude portant sur la qualité microbiologique des légumes peu transformés prêtes à consommer au Brésil, a fait état de contamination par *Salmonella* spp et de *E. coli* (Oliveira *et al.*, 2011). De bonnes pratiques d'hygiène peuvent minimiser le nombre de bactéries diminuant ainsi les réservoirs de contaminations bactérienne (Giwa *et al.*, 2021). De plus, la contamination observée dans cette étude pourrait aussi s'expliquer par un abus de température de conservation commerciale (Calonico *et al.*, 2019). Au troisième jour (J3) d'analyses, le taux de contamination a augmenté (68,43 %) à cause de la variation croissante des charges bactériennes notamment dans les SFC. Cette augmentation de la charge microbienne dans cette variété de salade serait probablement liée à sa forte teneur en eau, à sa composition et aux procédés de fabrication. Selon Söderqvist (2017), les salades à ingrédients mixtes nécessitent plus de manipulation humaine ; ce qui présente un risque supplémentaire de contamination bactérienne. Au septième jour d'analyse le statut microbiologique par rapport au troisième jour d'analyse n'a pas changé. Car, la qualité des salades, Ep ; Cf ; Ma ; SFA ; SFAM ; SFPC a demeurée satisfaisante.

3.2.3.2. Contamination des salades prêtes à consommer par les pathogènes bactériens psychrotrophes

Les salades prêtes à consommer sont devenues des aliments très sollicités dans la ville d'Abidjan à cause de leurs avantages considérables tant sur le plan nutritionnel que thérapeutique. Pourtant, il a été démontré dans plusieurs études que ces aliments sont de véritable réservoir de microorganismes. Aussi le mode de conservation (réfrigération), est un atout favorisant la croissance des microorganismes psychrotrophes dont *Listeria monocytogenes* qui possède un taux de mortalité élevé (20-30 %) (Becker *et al.*, 2019). Au

Résultats et Discussion

cours de cette étude, la recherche de cet agent pathogène a été effectuée sur la gélose Oxford. Ce milieu de culture a permis d'isoler dans six (06) échantillons de salades, des microorganismes ayant des caractéristiques culturales de *Listeria monocytogenes*. En effet, les différentes espèces isolées sur la base des caractéristiques culturales ont toutes présenté un halo noir autour des colonies sur le milieu de culture Oxford base agar. La présence de ce précipité autour des colonies renseignerait sur la présence probable d'une esculinase au sein de ces microorganismes qui permet de catalyser l'hydrolyse de l'esculine présent dans le milieu culture en esculétine et en glucose. Dès lors, le produit, par sa fonction phénol, l'esculétine réagit avec le Fe^{3+} du citrate de fer contenu dans le milieu et forme un précipité brun ou noir (Sapkota, 2022). Ce précipité change la coloration de ce milieu qui entoure la croissance des colonies. Les tests biochimiques des entérocoques, traduisent une réaction positive à l'esculine (esculine+) (Baatouche, 2021). A travers une caractérisation par séquençage moléculaire une souche de *Listeria monocytogenes* et cinq (5) autres espèces différentes ont été mis en évidence. Les autres espèces concerne *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus fleurettii* et *Staphylococcus nepalensis*. Cependant, la présence de ces microorganismes sur Oxford base utilisé pourrait se traduire par l'absence d'inhibiteurs comme les trois antibiotiques (colistine, céfotétane et fosfomycine) incorporés dans la gélose Oxford modifiée pour la sélection de l'espèce *L. monocytogenes* (Martínez-González *et al.*, 2015).

Dans cette étude, *L. monocytogenes* a été identifiée dans les salades composées (SCOM) renfermant la laitue, les tomates, le haricot vert, le maïs, les carottes, les petits pois, le chou, le jambon et l'œuf. Cette contamination proviendrait probablement de la source primaire de production ou secondaire en l'occurrence l'association des produits carnés (jambon et œuf). En effet, cette espèce est un agent pathogène d'origine environnementale fréquemment retrouvée dans les eaux d'irrigation, le sol, la végétation et les excréments d'animaux de ferme. Selon Gartley *et al.* (2022), les eaux usées recyclées incluent le potentiel transport de cet agent pathogène d'origine alimentaire si l'eau n'est pas traitée correctement ou si le processus de traitement n'est pas validé. Ijabadeniyi *et al.* (2011) ont également montré en Afrique du Sud que les souches de *L. monocytogenes* identifiées dans l'eau de surface ont été retrouvées dans les légumes. Il a été également publié dans une revue de mise à jour de *L. monocytogenes* dans l'industrie de la viande de porc et ses produits en France, que la prévalence de cette bactérie augmente généralement de la ferme aux usines de fabrication en raison de la contamination croisée (Thévenot *et al.*, 2006). En effet, selon ces auteurs, *L. monocytogenes* peut survivre et/ou se développer malgré les obstacles rencontrés lors des processus de fabrication et de

Résultats et Discussion

conservation. Zhang *et al.* (2021) ont isolé des souches de *L. monocytogenes* de deux usines de transformation de viandes prêtes à consommer dans la municipalité de Shanghai, en Chine, de 2019 à 2020 à l'aide d'une électrophorèse sur gel en champ pulsé et d'un séquençage du génome entier. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans cette étude en ce sens qu'ils justifieraient la source de contamination de nos salades par ce pathogène bactérien. Par conséquent, la présence de *L. monocytogenes* dans les salades prêtes à consommer est un véritable problème pour la Côte d'Ivoire. En effet, ce germe est responsable de la listériose et malgré sa faible morbidité, cette maladie a un taux de mortalité élevé en raison de la sévérité de sa manifestation clinique. La source de la listériose humaine est souvent incertaine (Tanui *et al.*, 2022). Mais à travers un modèle d'apprentissage automatique pour l'attribution de la source alimentaire de *L. monocytogenes*, Tanui *et al.* (2022) ont attribué 17,5 % des cas cliniques humains aux produits laitiers, 32,5 % aux fruits, 14,3 % aux légumes-feuilles, 9,7 % à la viande, 4,6 % à la volaille et 18,8 % aux légumes. Ces résultats justifieraient que la présence de cet agent pathogène dans les échantillons de salades composées dans la présente étude serait probablement évidente.

Outre *L. monocytogenes*, *B. cereus* est aussi connue pour son pouvoir pathogène inquiétant pour les humains et régulièrement retrouvée dans les produits alimentaires. A titre d'exemple, *B. cereus* a été reconnu comme l'agent pathogène d'origine alimentaire le plus fréquemment détecté dans les salades fraîchement coupées en Corée et la source de contamination est la chaîne de transformation d'entreprises de fabrication de salades de légumes fraîchement coupées emballées (Kim *et al.*, 2016). Les résultats sont semblables à ceux obtenus par Mgbakogu & Eledo, (2015). En effet, ces auteurs ont réalisé une étude sur la contamination des légumes locaux par *B. cereus* à Obosi au Nigéria. Ils ont ainsi détecté la présence de cet agent pathogène dans les échantillons de choux. La présence donc de cette espèce dans les échantillons de salades prêtes à consommer dans cette étude n'est pas une garantie pour la sécurité des consommateurs. En effet, *B. cereus* est un nouvel agent pathogène émergent largement isolé dans les aliments pour animaux et les chaînes alimentaires. La conséquence directe pourrait être une énorme perte économique pour l'industrie alimentaire et un risque élevé pour la santé humaine (Haque *et al.*, 2020).

Aussi, les *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN) sont présents dans divers habitats écologiques, notamment l'environnement de l'hôte, l'environnement des exploitations laitières, sur la peau et les muqueuses des bovins. Ce sont également les bactéries les plus répandues dont les réservoirs et les voies de transmission ne sont pas encore totalement élucidés (De Visscher *et al.*, 2014 ; Piccart *et al.*, 2016). Au cours de cette étude une souche de *S.*

Résultats et Discussion

saprophyticus, de *Staphylococcus fleurettii* et une autre de *Staphylococcus nepalensis* ont été identifiées dans les salades. Bien que *S. aureus* soit l'espèce responsable des intoxications alimentaires régulièrement isolées dans les aliments, *S. saprophyticus* est un agent pathogène important responsable des infections des voies urinaires communautaires. En plus de composer le microbiote intestinal humain, cette espèce est largement distribuée dans l'environnement et les origines de cet organisme pour l'infection humaine ne sont pas entièrement caractérisées (De Paiva-Santos *et al.*, 2018). Certains chercheurs les ont déjà détectés dans les aliments prêts à consommer. Ainsi, Wang *et al.* (2019) en Taïwan ont isolé plus de 10 espèces de *Staphylococcus* spp. dans les aliments prêts à consommer dans lesquels *S. saprophyticus* est apparue dans toutes les catégories. Cette espèce a été également identifiée lors du dépistage des microbes associés à la salade d'endive pendant la transformation post-récolte sur une échelle industrielle par Fröhling *et al.* (2018) en Allemagne. En plus de cette espèce, *Staphylococcus fleurettii* (*S. fleurettii*) appartenant au genre *Staphylococcus* a aussi été isolé. Cette espèce se différencie des autres Staphylocoques résistants à la novobiocine par sa résistance à la novobiocine sur la base du ribotype et de l'espaceur transcriptionnel intergénique et des réactions de réassociation ADN-ADN (Vernozy-Rozand *et al.*, 2000). Aussi, elle se différencie par la composition de sa paroi cellulaire et des caractéristiques phénotypiques (Vernozy-Rozand *et al.*, 2000). Cependant, l'isolement de *S. nepalensis* est sporadique et le premier rapport de la présence de cette espèce dans le matériel clinique humain ainsi que dans d'autres sources a été effectuée par Nováková *et al.* (2006). Par ailleurs, un cas instructif de bactériémie à *S. nepalensis* chez un homme de 71 ans ayant présenté un syndrome de Boerhaave après un repas a été rapporté en 2020 par Hosoya *et al.* (2020). La présence de cette espèce dans les salades prêtes à consommer n'est seulement pas une garantie pour la sécurité alimentaire mais suggère la nécessité la mise en place de système de surveillance efficace pour le contrôle de ces germes dans les aliments.

Dans les salades d'épinard (Ep), la présence de *Lysinibacillus fusiformis* renseignerait sur de mauvaises pratiques culturales dans la production de ce légume depuis le champ. Cette contamination pourrait également provenir des sols sur lesquels ces légumes ont été cultivés. En effet, cette espèce est considérée comme une bactérie naturellement, isolée dans les échantillons environnementaux, eaux usées des usines et les sols agricoles. Elle produit des endospores dormantes, non reproductrices et sphériques qui peuvent résister à la dessiccation, aux températures élevées et aux radiations ultraviolets et peut survivre pendant de longues périodes causant de graves septicémies dues à une bactériémie persistante, des ulcères tropicaux, et des maladies respiratoires chez l'homme (Sulaiman *et al.*, 2018). Même si, elle a

Résultats et Discussion

été identifiée dans les salades d'endive pendant la transformation post-récolte à l'échelle industrielle par Fröhling *et al.* (2018), en Allemagne, sa présence dans la chaîne alimentaire demeure rare. Mais, cette espèce doit être prise en compte dans les programmes de la sécurité sanitaire des aliments car des cas graves de bactériémie persistante ont été rapportés en 2022 au Japon (Morioka *et al.*, 2022).

Pailleurs, l'arbre phylogénétique réalisé à travers l'alignement des séquences des différentes espèces a révélé une similarité de (70 %) entre *Lysinibacillus fusiformis* et *Listeria monocytogenes*. Le rapprochement entre *Lysinibacillus fusiformis* et *Listeria monocytogenes* a nécessité des analyses plus approfondies de leurs séquences. Ainsi, l'analyse qualitative des séquences de ces deux (2) espèces par la réalisation d'un Dotmatrix a montré que des alignements globaux et locaux étaient possibles. Par conséquent, un alignement a été effectué suivant le programme needle. Une forte similarité avec un coefficient d'identité de 73,1 % avec une erreur de 5,5 % et un score 1995,5 a été déterminée. Cette forte similarité laisse à croire que ces deux (2) espèces proviendraient d'un ancêtre commun.

En somme, certaines espèces (*Listeria monocytogenes*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus fleurettii* et *Staphylococcus nepalensis*) identifiées dans cette étude sont pour la plupart rares dans l'écosystème bactériens de la Côte d'Ivoire (Karou *et al.*, 2003). Ainsi, l'existence de certaines espèces mal décrites dans les produits alimentaires est très inquiétante pour le consommateur. Cependant, la communauté scientifique ne doit pas rester en marge. C'est aussi une interpellation des autorités sanitaires car l'émergence de ces pathogènes dans le pays pourrait affaiblir tous les systèmes surtout au niveau économique.

3.2.4. Niveau de virulence et de résistance aux antibiotiques des germes isolés dans les salades prêtes à consommer

3.2.4. 1. Prévalences des gènes d'entérotoxine (*sea* et *seb*) et de Shiga-toxine (*stx1* et *stx2*) dans les échantillons de salades étudiées

Au cours de cette étude, le gène *stx2* a été mis en évidence dans 4 échantillons soit une prévalence 10,50 % sur l'ensemble des échantillons. Par contre, le gène *stx1* n'a pas été détecté. Ces résultats rejoignent ceux de Abubakari *et al.* (2015) qui ont mis en évidence *E. coli* O157:H7 donnant une prévalence de 1,1 %. Cependant, ils ont suggéré que malgré la faible prévalence, cette espèce reste toujours un problème de santé publique, en particulier dans les salades prêtes à consommer, car une dose infectieuse relativement faible pourrait être mortelle. Selon Gould *et al.* (2013), la présence de ce pathogène proviendrait principalement des

Résultats et Discussion

mauvaises pratiques sanitaires comme l'utilisation de l'eau usée pour l'irrigation à Kumasi. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Castro-Rosas *et al.* (2012) au Mexique (7 %) ainsi qu'à ceux de Dela *et al.* (2016) (5 %). Ces auteurs ont estimé que la présence des souches pathogènes de cette espèce bactérienne pourrait être due à une contamination des ingrédients par des matières fécales durant la culture depuis le champ. Par ailleurs, sur les deux (02) gènes de virulences (*stx1* et *stx2*) recherchés, celui mis en évidence est le *stx2* impliquées dans la production de Shigatoxines (STEC). Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux décrits par Karmali *et al.* (2003) aux Etats-Unis. En effet, ces auteurs n'ont pas trouvé le gène *stx 1* dans les souches testées, tandis que 93,1 % des isolats se sont révélés porteurs du gène *stx 2*. L'étude réalisée en Iran par Tahamtan *et al.* (2010) a révélé des niveaux élevés de bactéries porteuses de gènes *stx2* dans les matières fécales des échantillons provenant de différents bovins. Ceci justifierait une contamination probable des légumes par la matière fécale à travers l'eau d'arrosage des cultures maraichères. Ainsi, les consommateurs des salades de 4^{ème} gamme vendues dans les hypermarchés de la Ville d'Abidjan seraient exposés à des risques potentiels de toxi-infection. En effet, *E. coli* productrices de shiga-like toxines (STEC) ont été reconnues comme pathogènes humains aux Etats-Unis en 1982, à la suite de 2 épidémies de diarrhées sanglantes liées à la consommation de hamburgers contaminés par *Escherichia coli O157 :H7* (Gironde, 2002).

Aussi, au cours de cette étude la recherche des gènes *sea* et *seb* n'a révélé que la présence du gène *sea*. En effet, cinq (05) isolats de *S. aureus* soit une prévalence de 13,15 % dans l'ensemble des échantillons ont confirmé la présence de ce gène (*sea*) responsable d'entérotoxine. Cependant, les analyses n'ont pas révélé la présence du gène *seb*. Les résultats de cette étude ne concordent pas avec les travaux réalisés par Chau *et al.* (2017). Les isolats obtenus dans leurs études ne possédaient pas tous les gènes d'entérotoxine et les charges bactériennes étaient beaucoup plus faibles. Cette différence s'expliquerait par des situations hygiéniques plus contrôlées pendant le processus de production des salades de 4^{ème} gamme comme le tranchage, le découpage en dés et le mélange des ingrédients. Selon les données de la littérature, certains conservateurs peuvent inhiber la formation de SE dans les aliments comme l'acide lactique produit par les bactéries qui pourraient entraîner une diminution du niveau d'entérotoxine sous certaines conditions, éventuellement par le biais de la protéase extracellulaire (Donnelly *et al.*, 1968 ; Daoud & Debevere, 1985 ; Ulusoy *et al.*, 2017). Dans le présent travail, la présence de *S. aureus* entérotoxine A dans les échantillons analysés pourrait suggérer qu'il existerait des manquements dans l'hygiène du personnel avec présence probable

Résultats et Discussion

des porteurs sains de ces gènes de virulences. En effet, *S. aureus* fait partie de la flore cutanée humaine (WHO, 2017).

3.2.4. 2. Niveaux de résistance bactérienne aux antibiotiques

3.2.4. 2. 1. Résistance des germes de portages isolés dans les salades face aux antibiotiques

La caractérisation phénotypique a été effectuée sur les agents pathogènes des aliments isolés dans les salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces (hypermarchés) à Abidjan. En outre, la présence de bactéries multirésistantes dans l'alimentation surtout dans les aliments de 4^{ème} gamme qui ne subissent pas de traitements thermiques avant consommation pourrait engendrer des conséquences graves aboutissant à la mort pour le consommateur. Sur le plan de la santé publique, la résistance aux antibiotiques rend difficile la prévention et les traitements visant à éradiquer les infections causées par les bactéries. Sur le plan économique, la résistance bactérienne prolonge la durée des séjours dans les hôpitaux en imposant des soins plus intensifs et des médicaments plus onéreux (Toe *et al.*, 2018) ; ce qui augmente le coût des soins de santé.

L'antibiogramme réalisé sur les entérobactéries au cours de cette étude a révélé une résistance plus importante de *E. coli* et de *Salmonella* spp. face aux antibiotiques de la famille des Bêtalactamines. En effet, le profil de résistance phénotypique de *E. coli* face à cette famille d'antibiotique était de 100 % à la Céfuroxime (CXM ; 30 µg) , 83 % à l'Ampicilline (AMP ; 10 µg) et à la Céfoxitine (FOX ; 30 µg). Les souches de *Salmonella* spp. quant à elles, ont développé une résistance face à la Céfoxitine (FOX ;30 µg) et à l'Ampicilline (AMP ; 10 µg) qui ont présentés des taux respectifs de 42,85 et 57,15 %. La résistance marquée de ces germes intestinaux vis-à-vis des Bêtalactamines se traduirait par une utilisation abusive dans le traitement des infections dans le secteur de l'élevage. Les bêtalactamines sont le groupe d'agents antimicrobiens le plus largement utilisé dans le traitement des infections bactériennes en médecine humaine et vétérinaires (Wilke *et al.*, 2005 ; Olanrewaju *et al.*, 2020). Ainsi, ils sont utilisés à cause de leur large spectre d'activité, leur faible toxicité, leur efficacité fiable et leur prix relativement abordable (Wilke *et al.*, 2005 ; Olanrewaju *et al.*, 2020). Selon Bush & Bradford, (2016), sur une période de dix ans (2004-2014), les nouveaux antibiotiques bêtalactamines représentaient 65 % de toutes les prescriptions d'antimicrobiens aux Etats-Unis. Parmi celles-ci, 47 % étaient des céphalosporines. Les résultats de cette étude sont similaires à ceux obtenus dans les études antérieures comme celles de Liao *et al.*(2020), qui ont montré une résistance de 76 % des isolats de *E. coli* à l'ampicilline, 23 % à la céfoxitine et 20 % au céfuroxime. Oje *et al.* (2016) quant à eux ont décrit une résistance de 65,7 % de *E. coli* face à

Résultats et Discussion

céfuroxime dans les mêmes types d'aliment. Cependant, ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Toé *et al.* (2018), dont aucune résistance de *E. coli* n'a été observée face à céfuroxime au cours de leur étude réalisée sur les salades de légumes crus prêtes à consommer des restaurations collectives à Abidjan, Côte d'Ivoire. Cette différence laisse à croire que les ingrédients utilisés dans la préparation des salades prêtes à consommer vendues dans les hypermarchés ne proviennent pas de la même source d'approvisionnement que celles utilisées en restauration collective. Par ailleurs, la résistance aux Fluoroquinolones obtenue au cours de ces travaux est sensiblement identique à celle déterminée par Abass *et al.* (2020) dans les aliments prêts à consommer (61,29 % à la ciprofloxacine). Toé *et al.* (2018), ont aussi montré une résistance à la ciprofloxacine (8,3 %) tout comme campos *et al.* (2013) qui ont obtenu une résistance de 5 % vis à vis des carbapénèmes. Les résultats de la présente sont similaires à ceux de Ghaffoori & Suleiman (2022), qui ont trouvé une résistance de *E. coli* de 2,9 % face à l'imipénème. Quant aux autres familles d'antibiotiques, le profil de résistance décrit vis-à-vis de la Tigécycline (TGC) et de la Triméthoprimé (TMP) avec une résistance de 33 % au cours de la présente étude est faible par rapport celle rapportée par Brolund *et al.* (2010). En effet, ces auteurs ont obtenu une résistance de 96 % face à la Triméthoprimé (TMP). Lee *et al.* (2001) quant à eux ont mis évidence une inefficacité de cet antibiotique face aux souches de *E. coli* (63,1 %). Concernant la Tigécycline (TGC), Coulibaly *et al.* (2018) ont prouvé le contraire suite à leur étude réalisée sur les isolats de *E. coli* dans les préparations lactées provenant du centre hospitalier universitaire de Treichville (Abidjan, Côte d'Ivoire) . Cette différence pourrait être la cause d'une présence de résistance acquise des espèces qui se sont adaptées aux pratiques thérapeutiques dans la chaîne alimentaire due à une contamination par le personnel de production.

Concernant la résistance de *Salmonella* spp. (42,85 % à la Céfoxitine (FOX ; 30 µg) et 57,15 % à l'ampicilline (AMP ; 10 µg), elle s'est avérée semblable à celle décrite par Ago *et al.* (2021). Aussi, Al-Zenki *et al.* (2007) ont décrit une résistance importante (88 %) de *S. enteritidis* à l'ampicilline. Les résultats de cette étude sont également en accords avec ceux de Kemajou *et al.* (2014) au Nigeria avec un résistance de 89,9% à l'ampicilline. Chen *et al.* (2004), au cours des travaux réalisés sur la caractérisation de sérotypes de Salmonelles multirésistants aux antimicrobiens isolés de viandes vendues au détail ont mis en évidence une grande résistance à l'ampicilline (29 %) tout comme les résultats obtenus par Anukampa *et al.* (2017) , Ces auteurs ont travaillé sur les isolats de *Salmonella* spp. qui étaient résistants à la céfoxitine (30,43 %) et à l'ampicilline (26,10 %). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans la présente étude. Mais, face aux autres antibiotiques appartenant aux autres familles testées, ce

Résultats et Discussion

germe a été sensible. Ceci pourrait s'expliquer par une prescription raisonnable voire une utilisation rationnelle dans le secteur de l'élevage limitant ainsi la résistance.

Relativement aux isolats de *S. aureus*, les tests de sensibilité aux antibiotiques ont révélé de forts taux de résistance aux molécules appartenant à la famille des bêtalactamines en l'occurrence les céphalosporines (Cefoxitine) avec un taux de 50 % et aux pénicillines (100 %) à la Benzylpénicilline (1 IU) et 50 % à l'Ampicilline 10 µg) traduisant le phénotype MétiR. La résistance aux Aminosides (50 % à la Kanamycine (KMN) 30 µg et à la Gentamicine (GMN) 10 µg) a mis en exergue le phénotype KTG. Quant aux macrolides, la grande résistance observée vis-à-vis de l'Erythromycine (ERY) 15 µg (63 %) et de la Clindamycine (CMN) 2 µg (50 %) traduit le phénotype MLSB chez 50 % des isolats. Face aux Fluoroquinolones, 50 % des souches testées ont également développé une résistance. La résistance aux Bêtalactamines se traduirait par la production d'une Bêta-lactamase qui est une enzyme qui hydrolyse le cycle Bêtalactame des pénicillines, les rendant inactives ou encore par une résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP (Quincampoix & Mainardi, 2001). Selon, Ryffel *et al.* (1992) et De Jonge (1993), c'est cette résistance à la méticilline, qui entraîne une résistance à toutes les Bêtalactamines. Aussi, elle est déterminée par la présence d'un gène chromosomique (*mecA*) qui code pour la PLP2a. Cette PLP additionnelle qui a moins d'affinité pour les Bêtalactamines et en particulier pour la méticilline pourrait expliquer la résistance à l'ampicilline, la benzylpénicilline et à la cefoxitine observée dans cette étude. Ces résultats corroborent ceux rapportés par Coulibaly *et al.* (2018) en Côte d'Ivoire, Seydi *et al.* (2004) au Sénégal et Awad *et al.* (2007) aux Etats Unis. Bunnueang *et al.* (2015) ont aussi signalé la présence des souches MétiR dans divers aliments prêts à consommer avec une salade de papaye non mûre ayant l'incidence la plus élevée de contamination au MCSA. Selon, eux le taux de détection élevé de MCSA dans leur étude est associé au grand nombre d'isolats obtenus par échantillon. La résistance de niveau élevée aux aminosides pourrait être due à la production d'une enzyme inactivant les aminosides qui sont codées par des gènes plasmidiques ayant un fort potentiel de dissémination (Bunnueang *et al.*, 2015). C'est une enzyme bifonctionnelle ayant à la fois une action de phosphorylation et d'acétylation responsable de la production du phénotype KTG (Bismuth & Leclercq, 2000). Pour la résistance aux macrolides, elle repose sur l'action d'une enzyme (méthylase) réalisant la méthylation d'une adénine de la sous unité 23S de l'ARN ribosomique. Ces méthylases sont codées par les gènes *erm* dont il existe au moins 20 variants (Roberts *et al.*, 1999) ou aussi par trois gènes codant pour des systèmes d'efflux (*msrA*, *msrB* et *mef*). Leur produit est un transporteur protéique qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule. Les

Résultats et Discussion

résultats obtenus dans la présente étude sont sensiblement identiques à ceux rapportés par Coulibaly *et al.* (2018) en Côte d'Ivoire avec une résistance de 50 % à l'érythromycine. Assefa (2022), a mis en évidence une résistance inductible (MLS_{Bi}) plus élevée de *S. aureus*, y compris des souches de SARM à la clindamycine sur le continent Africain. Concernant la résistance aux Fluoroquinolones trois mécanismes sont impliqués essentiellement (Mainardi *et al.*, 1996). Il s'agit de la modification de la cible qui implique une mutation au niveau des gènes chromosomique *grlA* ou *grlB* de la topo-isomérase IV. Ensuite, l'altération des sous-unités A ou B de la gyrase par introduction d'une mutation au sein des gènes *gyrA* ou *gyrB*. Enfin, l'efflux de la drogue grâce à une protéine transmembranaire codée par le gène *norA*, chromosomique. La résistance aux fluoroquinolones est une résistance croisée entre les différentes molécules. Selon Mainardi *et al.* (1996), chez les SARM, le taux de résistance est supérieur à 90 % ; ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans la présente étude. En effet, toutes les souches multirésistantes identifiées ont décliné à la fois quatre phénotypes de résistances dont le MétiR, KTG, MLS_{Bi}, résistances aux Fluoroquinolones. En dehors de ces mécanismes précités, une résistance importante a été observée à la Fosfomycine (FOS ; 200 µg) (63 %), la Rifampicine (RIF ; 5 µg) (50 %) et le Chloramphénicol (CHL ; 30 µg) (37 %). En Grèce, Sergelidis *et al.* (2012) ont étudié la prévalence, la distribution et la sensibilité aux antibiotiques de *S. aureus* dans les salades prêtes à consommer. Il s'est avéré dans leur étude que 27 % des salades étaient contaminées par cette espèce bactérienne. Parmi celles-ci, c'est seulement trois isolats qui étaient sensibles à tous les antibiotiques. Une résistance à 2-5 antibiotiques parmi lesquels une résistance élevée à la Fosfomycine a été déterminée. Les résultats de la présente étude présentent une conformité avec ceux obtenus par ces auteurs concernant la Fosfomycine (82,6 %). Mais par rapport à la Rifampicine (RIF ; 5 µg) (50 %) et le Chloramphénicol (CHL ; 30 µg) (37 %), les taux de résistance de *S. aureus* dans cette étude demeurent supérieurs. En outre, la multirésistance de *S. aureus* est probablement liée à une contamination croisée dans la chaîne de production dont le personnel n'est pas épargné. Ces résistances très importantes observées pourraient être la cause d'une dissémination de la résistance dans l'environnement.

3.2.4. 2. Niveau de résistance aux antibiotiques des bactéries psychrotrophes isolées dans les salades

Les résultats de cette étude ont montré des effets significatifs de l'Ampicilline (API, 2 µg) et de Benzylpénicilline (PNG, 1 IU) sur la souche de *L. monocytogenes*. Pourtant, Şanlıbaba *et al.* (2018) et Khen *et al.* (2015) ont prouvé le contraire. En effet, Şanlıbaba *et al.* (2018) ont

Résultats et Discussion

montré une forte résistance de *L. monocytogenes* provenant d'aliments prêts à consommer aux antibiotiques de la famille des Bêtalactamines. Quant à Khen *et al.* (2015), ils ont prouvé une résistance de cette espèce bactérienne vis-à-vis de l'ampicilline. L'érythromycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines en se liant préférentiellement à la sous-unité 50S du ribosome bactérien. Cette étude n'a pas révélé de résistance de *L. monocytogenes* face à cet antibiotique. Aussi, cette souche a été sensible au Méropénème. Concernant, le Triméthoprime qui est utilisé pour les patients sensibles à la pénicilline (Şanlıbaba *et al.*, 2018), les résultats obtenus ont également montré un effet significatif sur la souche de *L. monocytogenes* isolée. Ces résultats rejoignent ceux de Vela *et al.* (2001), qui ont prouvé une sensibilité de cette espèce bactérienne à l'Erythromycine et au Triméthoprime. Les résultats de la présente étude sont aussi semblables à ceux trouvés par Şanlıbaba *et al.* (2018) concernant la résistance face au Méropénème. Ainsi, la sensibilité de *L. monocytogenes* face aux différents antibiotiques d'intérêt découle d'un phénotype sauvage qui montre que cette espèce bactérienne ne possède pas de résistance acquise. Par conséquent, les molécules testées ne seraient pas couramment utilisées comme option de traitement de la listériose. Ces résultats confirment aussi une nouvelle intégration de cette espèce en Côte d'Ivoire. En effet, la recherche de *Listeria* dans l'écosystème de la Côte d'Ivoire n'avait pas auparavant révélé la présence de souche de *Listeria monocytogenes* (Karou *et al.*, 2003).

B. cereus est reconnu depuis longtemps comme un agent pathogène important dans les intoxications alimentaires dans le monde entier. Par ailleurs, les aliments prêts à consommer sont considérées comme, véhicule de transmission de *B. cereus* entérotoxigène. Par conséquent le profil de résistance de cette espèce durant la présente étude est d'une importance capitale dans la surveillance des bactéries multirésistantes en Côte d'Ivoire. Dans cette étude, une forte résistance à l'Erythromycine, la Norfloxacin, la Levofloxacin, la Ciprofloxacin (CIP) et à l'Imipénème a été observée. Ceci n'a pas été le cas dans les travaux réalisés par Park *et al.* (2018). Cependant, la sensibilité de *B. cereus* à la vancomycine obtenue dans la présente étude est semblable à celle décrite par ces auteurs. En Égypte, Shawish & Tarabees (2017) ont aussi rapporté une sensibilité de cette bactérie semblable aux auteurs précédents. Les résultats de la présente étude corroborent ceux de Merzougui-Souad *et al.* (2014), qui ont décrit une résistance importante des souches de *B. cereus* isolées des aliments à l'Erythromycine au Maroc. Le niveau important de résistance de cette espèce face aux antibiotiques traduirait une utilisation excessive de ces molécules dans le traitement des intoxications liées à *B. cereus*. Aussi, pourrait-elle s'expliquer par une absence de programme de contrôle et de prévention des maladies liées à cet agent pathogène en Côte d'Ivoire.

Résultats et Discussion

Le profil de résistance de *L. fusiformis* déterminé dans la présente étude indique, que cette bactérie est sensible aux antibiotiques utilisés en l'occurrence, la Vancomicine, le Ciprofloxacine, l'Ampicilline, la Gentamicine, le Benzylpénicilline et la Clindamycine. Cette sensibilité élevée montre que ces antibiotiques seraient des molécules efficaces dans le traitement en cas d'infections à *L. fusiformis*. Selon Wenzler *et al.*(2015), les infections cliniquement pertinentes avec l'espèce *Lysinibacillus fusiformis* sont peu fréquentes mais une prise en charge appropriée avec un contrôle agressif de la source et en temps opportun, une antibiothérapie guidée par la susceptibilité sont essentielles pour des résultats cliniques optimaux. Morioka *et al.* (2022) ont aussi observé un niveau de sensibilité élevé de ce germe face à ces mêmes antibiotiques.

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN), du fait de leur importante dissémination dans des environnements humain et animalier, sont couramment exposés aux pressions de sélection induites par l'usage des antibiotiques (Morot-Bizot, 2006). Au sein de certaines espèces de SCN des gènes de résistance aux antibiotiques étaient portés par des plasmides (Hauschild *et al.*, 2003). Au cours ces travaux, une importante résistance aux antibiotiques a été observée au niveau des SCN comme *S. fleurettii* et *S. saprophyticus* contrairement de *S. nepalensis* qui a été sensible à la majorité des antibiotiques testés. En effet, l'espèce *S. saprophyticus* a développé une résistance face aux Macrolides (Erythromycine, Clindamycine) qui lui confère le phénotype MLSBc et à d'autres antibiotiques comme la Rifampicine, la Minocycline, l'Acide fusidique et la Tétracycline. Gardini *et al.* (2003) ont isolé des souches de *S. saprophyticus* de trois saucissons italiens différents qui ont résisté aussi à plusieurs d'antibiotiques telles que les Sulfonamides, les Quinolones et les Tétracyclines. Aussi, une multirésistance a été observée au niveau de l'espèce *S. fleurettii* face aux antibiotiques appartenant à la famille des Fluoroquinolones (Levofloxacine et Ciprofloxacine), aux Macrolides (Erythromycine et Clindamycine) et à d'autres familles (Rifampicine, Minocycline, Acide fusidique et Tétracycline). Ce niveau de résistance lui confère les phénotypes MLSBc et Résistances aux fluoroquinolones. La multirésistance des SCN face aux antibiotiques seraient probablement due à une utilisation abusive et sans prescription dans le secteur de l'élevage ainsi que dans le traitement des infections humaines. Le risque lié à la dissémination de cette multirésistance dans des environnements alimentaires tels que l'industrie des produits prêts à consommer doit être pris en compte afin de freiner la dissémination des gènes de résistances.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Conclusion

L'urbanisation galopante dans les pays en développement a orienté le régime alimentaire de certains états vers celui des occidentaux. La consommation des produits de la 4^{ème} gamme a donc pris de l'ampleur en l'occurrence les salades prêtes à consommer. Ces produits alimentaires qui ne subissent pas de traitement thermique nécessitent un contrôle de la qualité sanitaire afin de contribuer au maintien de la sécurité alimentaire des consommateurs. Aussi, le maintien de la qualité sanitaire des salades prêtes à consommer exige un contrôle bactériologique. Ainsi, dans une dynamique de contribuer à assurer la qualité sanitaire afin de prévenir des risques d'intoxications des consommateurs tout en freinant la dissémination de la multirésistance des bactéries aux antibiotiques par le canal de ses aliments, plusieurs objectifs ont été abordés. Dans un premier temps, l'enquête réalisée auprès d'une frange de la population d'Abidjan a permis de connaître les niveaux de consommation des salades de 4^{ème} gamme dans la capitale économique. En effet, sur 1169 personnes enquêtées, 78 % d'entre eux connaissent les salades de 4^{ème} gamme et 59 % en consomment. Il ressort des résultats de la présente étude que la connaissance des salades de 4^{ème} gamme est liée à la commune et à la profession des individus enquêtés. La consommation quant à elle, est liée à la commune, à la profession et au sexe. De plus, les salades de fruits sont appréciées autant que les salades de légumes. Toutefois, 25 % de cas d'infections liés à la consommation de ces aliments ont été signalés par les personnes interrogées avec la diarrhée comme symptôme prédominant (54 %). Dans un second temps, les analyses physico-chimiques réalisées sur salades de 4^{ème} gamme ont révélé de fortes teneurs en eau (entre $86,52 \pm 4,02$ (SCA) et $95,92 \pm 0,16$ % (SME)) et les salades SME, CF, SN, Rq, SCH, SChV composées que de légumes détenaient les plus fortes valeurs. Les valeurs de pH obtenues (valeurs comprises entre $2,70 \pm 0,12$ et $7,91 \pm 0,78$) ont montré que les salades de fruits composés étaient plus acides (pH estimé à $2,70 \pm 0,12$). Le taux de sucre ou d'extrait sec dans l'ensemble des salades est relativement faible (entre $1,00 \pm 0,00$ et $15,05 \pm 0,09$ °Brix). Concernant, la cinétique de la croissance des microorganismes, elle a permis de déterminer la qualité microbiologique à l'ouverture des emballages et de suivre leurs évolutions durant la période de conservation domestique. Ainsi, la plupart des salades ont été de qualité insatisfaisante avec des risques probables pour le consommateur au regard des charges moyennes qui ont dépassé les valeurs critiques (10^8 UFC/g pour les bactéries et 10^5 UFC/g pour la flore fongique). Cinq (05) salades (Ep, Ma, Rq, Cf, SCA) ont été de qualité microbiologique satisfaisante en raison des charges moyennes qui sont inférieures aux critères (m) recommandés pour les germes ciblés. Le suivi de la croissance microbienne après ouverture des emballages a montré un développement significatif des GAM, dans toutes les salades sauf celles de SCOM.

Conclusion et perspectives

La croissance des GAP a été très significative dans tous les échantillons. Quant à la flore fongique, elle a été marquée également par une évolution significative dans la plupart des échantillons. En somme, les résultats stipulent que les salades SChV, SME, SFP et SFPM sont plus propices à la croissance des microorganismes. En outre, les SChV sont les salades dans lesquelles la croissance des germes aérobies psychrophiles a été plus accentuée pendant que la flore aérobie psychrophile s'est développée plus dans les salades SME. Quant à la flore fongique, la croissance a été plus significative dans les salades de fruits tels que SFP et SFPM. Dans un troisième temps, les tests de détection microbiologique ciblant les pathogènes bactériens de portage ont permis de mettre en évidence la présence de *S. aureus* ; *E. coli* et *Salmonella* spp. avec des prévalences respectives de 23,68 %, 21,05 % et 18,42 %. Concernant les pathogènes psychrotrophes, six (06) espèces bactériennes ont été identifiées par séquençage moléculaire d'une région hypervariable de l'ARN 16S. Il s'agit notamment de *L. monocytogenes*, *L. fusiformis*, *B. cereus*, *S. nepalensis*, *S. fleurettii* et *S. saprohyticus*. Pour finir, les travaux portant sur la virulence des souches et leur résistance aux antibiotiques ont mis en exergue les caractères de pathogénicité chez *E. coli* par la présence du gène *stx2* avec une prévalence de 10,50 % dans l'ensemble des échantillons. De même la présence du gène *sea* avec une prévalence de 13,15 % a été révélée chez *S. aureus* isolés. Aussi, les profils de résistance des pathogènes bactériens isolés dans les salades prêtes à consommer montrent que les souches de *S. aureus* et de *B. cereus* développent une multirésistance face aux antibiotiques. Ces résistances peuvent être disséminées dans l'environnement et peuvent être transmises à d'autres pathogènes bactériens. Cette situation peut être à l'origine des échecs thérapeutiques dans le traitement de pathologies chez l'homme (le consommateur).

A la lumière de tout ce qui précède, une attention particulière doit être accordée aux salades prêtes à consommer (4^{ème} gamme) qui entrent de plus en plus dans les habitudes alimentaires des populations. Il convient de noter que la qualité et la sécurité de ces aliments sont indispensables non seulement pour contribuer au maintien de la sécurité alimentaire en Côte d'Ivoire mais aussi pour prévenir les intoxications alimentaires.

Perspectives

En guise de perspectives, il conviendrait :

- Identifier les facteurs de risques de la contamination microbiologique des salades de 4^{ème} gamme vendues dans les grandes surfaces d'Abidjan;
- Approfondir les recherches sur la détermination des facteurs de virulences des espèces bactériennes isolées
- Identifier les supports génétiques de résistance des souches résistantes aux antibiotiques surtout chez les isolats multirésistants
- Élargir les recherches aux contaminants chimiques dans les salades dans un contexte de sécurité alimentaire ;

Recommandations

Les produits alimentaires de 4^{ème} gamme jouent un rôle essentiel dans l'industrie agroalimentaire en ce sens qu'ils répondent aux attentes des consommateurs. Ainsi, nous recommandons :

- aux populations, d'éviter une conservation prolongée des salades prêtes à consommer (4^{ème} gamme) après ouverture des emballages à une température de conservation domestique.
- à la communauté scientifique, de pousser davantage les recherches sur les risques sanitaires afin de pallier les problèmes d'intoxications voire les épidémies d'origine alimentaire;
- aux autorités sanitaires, de mettre en place des programmes de surveillances de la contamination par des souches hautement pathogènes (*L. monocytogenes*, *B. cereus*) des aliments distribués en Côte d'Ivoire ;
- aux autorités compétentes, de veiller au respect du protocole de prescription ainsi qu'à l'utilisation adéquate des antibiotiques pour une meilleure surveillance épidémiologique de l'antibiorésistance selon le concept actuel, une seule santé (One Health).

REFERENCES

- AACC. (1990). Approved methods of the American association of cereal chemists, 8th edition, St. Paul, San Francisco, CA (USA), 137 p.
- Abakari G., Cobbina S.J. & Yeleliere E. (2018). Microbial quality of ready-to-eat vegetable salads vended in the central business district of Tamale, Ghana. *International Journal of Food Contamination*, 5(1) : 3-12.
- Abass A., Adzitey F. & Huda N. (2020). *Escherichia coli* of Ready-to-Eat (RTE) Meats origin showed resistance to antibiotics used by farmers. *Antibiotics*, 9(12) : 861-869.
- Abdelali S. (2016). Résistance des entérocoques aux antibiotiques. Microbiologie Appliquée, département de biologie. Mémoire de Master en faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen (Tlemcen, Algérie), 45 p.
- Abdul-Raoul U.M., Beuchat L.R. & Ammar. M.S. (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* 0157 : H7 on salad vsgetables. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 59(7) : 1999-2006.
- Abubakari A., Amoah I., Essiaw-Quayson G., Larbi J., Seidu R. & Abaidoo R. (2015). Presence of pathogenic *E. coli* in ready-to-be-eaten salad food from vendors in the Kumasi Metropolis, Ghana. *African Journal of Microbiology Research*, 9(21) : 1440–1445.
- Accarlas S. (2014). Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Mémoire de Master en Immunologie et Maladies infectieuses, Université Paul Sabatier (Toulouse, France), 212 p.
- Acha P.N. & Szyfres B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. In : Bacterioses and mycoses. Pan American Health Organization (PAHO) Scientific and Technical Publication, 3rd edition, Washington DC, USA : 168-179.
- Adjrah Y., Karou D.S., Djéri B., Anani K., Soncy K., Ameyapoh Y., de Souza C. & Gbeassor M. (2011). Hygienic quality of commonly consumed vegetables, and perception about disinfecting agents in Lomé. *International Food Research Journal* 18(4) : 1499- 1503.
- Adjrah Y., Soncy K., Anani K., Blewussi K., Karou, D.S., Ameyapoh Y., de Souza C. & Gbeassor M. (2013). Socio-economic profile of street food vendors and microbiological quality of ready-to-eat salads in Lomé. *International Food Research Journal*, 20(1) : 65-70.
- Adriouch S., Julia C., Kesse-Guyot E., Ducrot P., Péneau S., Méjean C., Assmann K.E., Deschasaux M., Hercberg S., Touvier M. & Fezeu L.K. (2017). Association between a dietary quality index based on the food standard agency nutrient profiling system and

- cardiovascular disease risk among French adults. *International Journal of Cardiology*, 234(1) : 22–27.
- AFNOR. (1974). Emballages, Matières en feuille, Détermination du Coefficient de Transfert de Vapeur d'Eau., NF H 00-030. Association Française de Normalisation, Paris (France), 12 p.
- AFNOR (1996). Microbiologie des aliments - Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique. Normes nationales et documents normatifs nationaux, Paris (France), 9 p.
- Afssa (2005). Avis sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance. SA-0094, Val-de-Marne, Paris (France), 21 p.
- Ago P.D., Boko C.K., Adoligbe C.M., Farougou S. & Dougnon V. (2021). Profil de résistance et gènes de virulence des souches de *Salmonella* spp. isolées dans les élevages de poules pondeuses au Sud du Bénin. Mémoire de Master, Département de Production et Santé Animales, Université d'Abomey-Calavi (Cotonou, Benin), 63 p.
- Akoachere J.F.T.K., Tatsinkou B.F. & Nkengfack J.M. (2018). Bacterial and parasitic contaminants of salad vegetables sold in markets in Fako Division, Cameroon and evaluation of hygiene and handling practices of vendors. *BMC Research Notes*, 11(1) : 89-100.
- Alegbeleye O. & Sant'Ana A.S. (2022). Survival and growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vegetable salads. *Food Control*, 138 : 109-123.
- Allende A., Aguayo E. & Artés F. (2004). Microbial and sensory quality of commercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2) : 109–117.
- Allende A. & Monaghan J. (2015). Irrigation Water Quality for Leafy Crops: A Perspective of Risks and Potential Solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7) : 7457–7477.
- Al-Zenki S., Al-Nasser A., Al-Safar A., Alomirah H., Al-Haddad A., Hendriksen R.S. & Aarestrup F.M. (2007). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from a poultry farm and processing plant environment in the State of Kuwait. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3) : 367–373.
- Amiot-Carlin M.J. & Georgé S. (2017). Qualités nutritionnelles des produits végétaux : le cas des fruits et légumes. *Agronomie, Environnement & Sociétés*, 7(1) : 43–49.

- Amorós I., Alonso J.L. & Cuesta G. (2010). Cryptosporidium oocysts and giardia cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection*, 73(6) : 1138–1140.
- Andino A. & Hanning I. (2015). *Salmonella enterica* : survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 1 : 1-16.
- Anin L.A., Yapi P.D.Y.A., Monnet Y.T., Yapi M-A.Y., Soro C.L. & Kouadio K.A.K. (2016). Evaluation Microbiologique Et Origines De La Contamination Des Produits De 4ème Gamme Vendus Sur Les Marchés D’abidjan, Cote D’ivoire. *European Scientific Journal*, 12(36) : 273-285.
- Anses (2011). Caractéristiques et sources de *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques. Laboratoire de sécurité des aliments - Anses, Maisons-Alfort, Paris (France), 4 p.
- Anses (2022). Avis relatif à la mise à jour de la fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments relatifs à *Staphylococcus aureus* et aux entérotoxines staphylococciques (saisine 2016-SA-0076). Maisons-Alfort, Paris (France), 7 p.
- Anukampa, Shagufta B., Sivakumar M., Kumar S., Agrawal R.K., Bhilegaonkar K.N., Kumar A. & Dubal Z.B. (2017). Antimicrobial resistance and typing of Salmonella isolated from street vended foods and associated environment. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8): 2532–2539.
- AOAC. (1984). Official methods of Analysis of AOAC International. 14 th edition SW Williams, Washington DC (USA), 121 p.
- Arcusa R., Carrillo J.Á., Xandri-Martínez R., Cerdá B., Villaño D., Marhuenda J. & Zafrilla M.P. (2021). Effects of a Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Status in the Plasma of a Healthy Population: A Placebo-Controlled, Double-Blind, and Randomized Clinical Trial. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12) : 3590-3604.
- Arienzo A., Murgia L., Fraudentali I., Gallo V., Angelini R. & Antonini G. (2020). Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods*, 9(10) : 14-21.
- Assefa M. (2022). Inducible Clindamycin-Resistant Staphylococcus aureus Strains in Africa: A Systematic Review. *International Journal of Microbiology*, 2022: 1-9.
- Augustin J.C., Rosso L. & Carlier V. (1999). Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of Listeria monocytogenes by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1–2) : 137–146.

- Avril J.L., Denis F., Dabernat H. & Monteil H. (2000). Bactériologie clinique. 2^{ème} édition Marketing, Paris, France : 148-280.
- Awad R., Levac D., Cybulska P., Merali Z., Trudeau V.L. & Arnason J.T. (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(9) : 933–942.
- Ayadi K. & Ezan P. (2011). Pour bien grandir, mange au moins 5 fruits et légumes par jour. Impact des bandeaux sanitaires sur les pratiques alimentaires des enfants, *Management et Avenir*, 8(48) : 57-75.
- Ayadi N. (2013). Etude des propriétés microbiologiques, physicochimiques et biochimiques d'une salade IV^{ème} gamme irradiée destinée aux personnes immunodéprimées. Mémoire en sécurité sanitaire des aliments, Département des Sciences de la Vie, Université de Carthage (Carthage, Tunisie), 91 p.
- Baatouche A.M. (2021). Synthèse bibliographique sur caractères et méthodes bactériologiques horizontales pour dénombrement des espèces *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, département des Sciences Biologiques, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arréridj, Algérie, 42 p.
- Baumgartner A., Niederhauser I. & Johler S. (2014). Virulence and resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*, 77(7): 1232–1236.
- Beattie G.A. & Lindow S.E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89(5) : 353–359.
- Becilla A. (2009). Prévention des altérations et des contaminations microbiennes des aliments. Mémoire de stage en sciences alimentaire et nutrition (Option alimentation nutrition et santé) Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 90 p.
- Becker B., Stoll D., Schulz P., Kulling S. & Huch M. (2019). Microbial Contamination of Organically and Conventionally Produced Fresh Vegetable Salads and Herbs from Retail Markets in Southwest Germany. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(4) : 269–275.
- Benabdallah-Khodja A. & Yahia H. (2016). Etude phénotypique de quelques souches d'*Escherichia coli* productrices des carbapénèmases. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, Filière : Sciences Biologiques, Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 41 p.
- Bergdoll M.S. (1979). Staphylococcal intoxications. In : Riemann H, Bryan FL. Food-borne infections and Intoxications. Academic press, New York (USA) : 443-494.

- Bernard de Raymond A., Bonnaud L. & Plessz M. (2013). Introduction : Les fruits et légumes dans tous leurs états. La variabilité, la périssabilité et la saisonnalité au coeur des pratiques sociales. *Revue d'Etudes en Agriculture et Environnement*, 1 : 3-12
- Bernardo R., Duarte A., Tavares L., Barreto A.S. & Henriques A.R. (2021). *Listeria monocytogenes* Assessment in a Ready-to-Eat Salad Shelf-Life Study Using Conventional Culture-Based Methods, Genetic Profiling, and Propidium Monoazide Quantitative PCR. *Foods*, 10(2) : 221-235.
- Besharat R. & Ahmad V. (2018). Prevalence Study of Multi-drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Respiratory Tract Infections. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(1) : 1-9.
- Bezzar N. (2014). Caractérisation génétique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des souches de *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalière. Mémoire de Master en Microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen (Tlemcen, Algérie), 53 p.
- Bismuth R. & Leclercq R. (2000). *Staphylococcus aureus* et antibiotiques. In : Précis de Bactériologie Clinique. Edition ESKA, Paris (France) : 611- 616.
- Boko A.C.E. & Angaman D.M. (2021). Evaluation de l'entomophagie dans quatre grandes villes de Côte d'Ivoire. *European Scientific Journal*, 17(37) : 119-136.
- Boone R.D., Castenholz W.R & Garrity M.G. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, 2ème Edition, volume 1, New York (USA), 721 p.
- Bourgeois C.M., Mesle J.F. & Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire. Tome I. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Collection Sciences et techniques agro-alimentaires*, Edition Technique et Documentation Lavoisier, Paris (France), 672 p.
- Boumba A.E.L., Lebonguy A.A., Chancelvy P.L.P., Moukala M.B. & Goma-Tchimbakala J. (2022). Hygienic quality of fermented pepper sold in the markets of Brazzaville. *Journal of Food Security*, 10(1) : 17-24.
- Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151 : 1003-1010.
- Brat P., Reynes M. & Brillouet J.-M. (2003). Valeur-santé des aliments : les caroténoïdes : nature, sources et propriétés. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 : 3442-3447.

- Bréand S., Fardel G., Flandrois J.P., Rosso L. & Tomassone R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *International Journal of Food Microbiology*, 40(3) : 185-195.
- Breche P., Gaillard J. & Simonet M. (1988). Collection de la biologie à la clinique. Bactériologie“ Bactéries des infections humaines” Flammarion Médecine-Sciences, Paris (France) : 267-277.
- Brolund A., Sundqvist M., Kahlmeter G. & Grape M. (2010). Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE*, 5(2) : 9228-9233.
- Bronze M. S. & Greenfield R. A. (2005). Biodefence Principles and Pathogens. Book Reviews, *Horizon Bioscience*, Norfolk England (Angleterre), 838 p.
- Buffet F. (2003). Etude de la conservation de l’Ananas en produits prêt à consommer de 4ème gamme. Rapport de stage, CIRAD- FHLOR de Montpellier, France, 48 p.
- Bunnueang N., Kongpheng S., Singkhamanan K., Saengsuwan P., Rattanachuay P., Dangriwan S. & Sukhumungoon P. (2015). Methicillin-resistant staphylococcus aureus from ready-to-eat foods in a hospital canteen, southern Thailand: Virulence characterization and genetic relationship. *The Southeast Asian Journal of Tropical m Médecine and Public Health*, 46(1) : 86–96.
- Bureau G. & Multon J.L. (1989). L’emballage des denrées alimentaires de grande consommation. 2^{ème} édition, volume 1, collection sciences et techniques agroalimentaire, Lavoisier, Paris (France) : 38-1082.
- Busani L., Boccia D., Caprioli A., Ruggeri F.M., Morabito S., Minelli F., Lana S., Rizzoni G., Giofrè F., Mazzeo M. & Tozzi A.E. (2006). Public health implications of a case of haemolytic-uraemic syndrome associated with a concomitant outbreak of mild gastroenteritis in a small rural community. *Epidemiology and Infection*, 134(2) : 407-413.
- Bush K. & Bradford P.A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8) : 25225-25247.
- Caleb O., Opara U. & Witthuhn C. (2012). Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 5(1) : 15-30.
- Calonico C., Delfino V., Pesavento G., Mundo M. & Nostro A.L. (2019). Microbiological Quality of Ready-to-eat Salads from Processing Plant to the Consumers. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(6) : 427-434.

- Cambeses-Franco C., González-García S., Feijoo G. & Moreira M.T. (2021). Encompassing health and nutrition with the adherence to the environmentally sustainable New Nordic Diet in Southern Europe. *Journal of Cleaner Production*, 327 : 129458-129470.
- Campos J., Mourão J., Pestana N., Peixe L., Novais C. & Antunes P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3) : 464-470.
- Caponigro V., Ventura M., Chiancone I., Amato L., Parente E. & Piro F. (2010). Variation of microbial load and isual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology*, 27 : 1071-1077.
- Case R.J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W.F. & Kjelleberg S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1) : 278-288.
- CASFM/EUCAST (2021). Recommandations, version1.0. Rapport technique n°610, 128 p.
- Castro-Ibáñez I., Gil M.I., Tudela J.A. & Allende A. (2015). Microbial safety considerations of flooding in primary production of leafy greens: A case study. *Food Research International*, 68 : 62–69.
- Castro-Rosas J., Cerna-Cortés J.F., Méndez-Reyes E., Lopez-Hernandez D., Gómez-Aldapa C.A. & Estrada-Garcia T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, 156(2) : 176-180.
- Cerna-Cortes J.F., Leon-Montes N., Cortes-Cueto A.L., Salas-Rangel L.P., Helguera-Repetto A.C., Lopez-Hernandez D., Rivera-Gutierrez S., Fernandez-Rendon E. & Gonzalez-y-Merchand J.A. (2015). Microbiological Quality of Ready-to-Eat Vegetables Collected in Mexico City: Occurrence of Aerobic-Mesophilic Bacteria, Fecal Coliforms, and Potentially Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria. *BioMed Research International*, 1 : 1-9.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N. & Alland D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2) : 330-339.
- Chau M., Aung K., Hapuarachchi C., Lee P., Lim P., Kang J., Ng Y., Yap H., Yuk H.-G., Gutiérrez R. & Ng L.C. (2017). Microbial survey of ready-to-eat salad ingredients sold

- at retail reveals the occurrence and the persistence of *Listeria monocytogenes* Sequence Types 2 and 87 in pre-packed smoked salmon. *BMC Microbiology*, 17(1) : 33-46.
- Chaucheyras-Durand F., Faqir F., Ameilbonne A., Rozand C. & Martin C. (2010). Fates of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in Ruminant Digestive Contents in the Absence and Presence of Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3) : 640-647.
- Chen M., Chen Y., Wu Q., Zhang J., Cheng J., Li F., Zeng H., Lei T., Pang R., Ye Q., Bai J., Wang J., Wei X., Zhang Y. & Ding Y. (2019). Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China. *BMC Microbiology*, 19(1) : 110-119.
- Chen S., Zhao S., White D. G., Schroeder C. M., Lu R., Yang H., McDermott P. F., Ayers S. & Meng J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1) : 1-7.
- Chimalizeni Y., Kawaza K. & Molyneux E. (2010). The Epidemiology and Management of Non Typhoidal *Salmonella* Infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 659 : 33-46.
- Chitravathi K., Chauhan O.P. & Raju P.S. (2015). Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of green chillies (*Capsicum annum L.*). *Food Packaging and Shelf Life*, 4 : 1-9.
- Churchill, K. J., Sargeant, J. M., Farber, J. M., & O'connor, A. M. (2019). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in select ready-to-eat foods-deli meat, soft cheese, and packaged salad: à systematic review and meta-analysis. *Journal of Food Protection*, 82(2) : 344-357.
- Codex Alimentarius (2005). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Examen en vue de l'élaboration de normes, directives ou autres textes pour les aliments dérivés des biotechnologies. Rapport de la 5^{ème} session du groupe intergouvernemental spécial du codex sur les aliments dérivés des biotechnologies, 40 p.
- Cofelice M., Lopez F. & Cuomo F. (2019). Quality Control of Fresh-Cut Apples after Coating Application. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(6) : 108-189.
- Coulibaly I., Koume K., Conde F., Foba F.I., M'bengue G.V.C., Guessenn N., Tiekoura K.B. Konate I. & Kone D. (2018). Evaluation du risque de contamination des préparations lactées au service de néonatalogie du chu de Treichville et résistance aux antibiotiques de la flore bactérienne. *Agronomie Africaine*, 30 (2) : 205-214.

- CMADA (2018). Critères Microbiologiques Applicables aux Denrées Alimentaires. *Lignes directrices pour l'interprétation*, Luxembourg, Luxembourg, 157 p.
- Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M. & Finlay B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4) : 822-880.
- CTIFL (2016), Guides de bonnes pratiques hygiéniques des végétaux crus prêts à l'emploi. Les éditions du Journal officiel, Toulouse (France), 71 p.
- CUCL (2003). Recommandations pour l'utilisation des antibiotiques. (1ère Edition), Cliniques Universitaires Saint Luc. Bruxelles (Belgique), 110p.
- da Cruz Almeida E.T., de Medeiros Barbosa I., Tavares J. F., Barbosa-Filho J.M., Magnani M. & de Souza E.L. (2018). Inactivation of spoilage yeasts by *Mentha spicata* L. And *M. × villosa* huds. Essential oils in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *Frontiers in Microbiology*, 9 : 1-12.
- Dadzie B.K. & Orchard J.E. (1997). Routine post-harvest screening of banana/plantain hybrids: criteria and methods. INIBAP Technical Guidelines 2, Montpellier (France), 75 p
- Daniels J., Krishnamurthi R. & Rizvi S. (1985) A Review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48 : 532-537.
- Daoud S.M. & Debevere J.M. (1985). The effect of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* on staphylococcal enterotoxin A activity. *International Journal of Food Microbiology*, 2(4) : 211-218.
- Darcan C., Ozkanca R., Idil O. & Flint K.P. (2009). Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Polish Journal of Microbiology*, 58(4) : 307-317.
- De Giusti M., Aurigemma C., Marinelli L., Tufi D., De Medici D., Di Pasquale S., De Vito C. & Boccia A. (2010). The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3) : 996-1006.
- De Jonge B.L.M., Tomasz A. (1993). Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin : functional role for penicillinbinding protein 2a in a cell wall synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2) : 342-358.
- Dekhinet R. & Fedali N. (2017). Evaluation de la qualité physico chimique et microbiologique de la salade prête à l'emploi Navet, Carotte, Concombre. (2017). Mémoire de Master, Technologie Alimentaire, Université Hadj Lakhdar - Batna 1 (Batna, Algérie), 76 p.

- Dela O., José P., Cortés C., Ana L., Montes N. L., Salas R., Laura P., García Reyes R. L., Helguera Repetto A. C., Rivera Gutiérrez S., Fernández Rendón E., González Merchand J. A. & Cerna Cortés, J.F. (2016). Frecuencia of *Escherichia coli* y patotipos de *E. coli* diarreogénicos en vegetales listos para su consumo, *The Food Technology*, 23 : 58-59.
- Delibato, E., I. Luzzi, E. Pucci, Y. T. R. Proroga, F. Capuano and De Medici. D. 2018. Fresh Produce and Microbial Contamination : Persistence during the Shelf Life and Efficacy of Domestic Washing Methods. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 54(4) : 358-363.
- Djioua T. (2010). Amélioration de la conservation des mangues 4^{ème} gamme par application de traitements thermiques et utilisation d'une conservation sous atmosphère modifiée. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (Avignon, France), 150 p.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle Sanitaire. Lavoisier, Paris (France), 476p.
- De Oliveira Elias S., Noronha T.B. & Tondo E.C. (2019). *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence and levels on lettuce: A systematic review and meta-analysis. *Food Microbiology*, 84 : 1-11.
- De Visscher A., Supré K., Haesebrouck F., Zadoks R.N., Piessens V., Van Coillie E., Piepers S. & De Vliegher S. (2014). Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4) : 466-474.
- Desbordes D. (2003). Qualité microbiologique des fruits et légumes : flores, altérations, risques sanitaires, prévention. Rapport de Recherche Bibliographique, Lyon, France, 45 p.
- Dess Q. (1999). Sociologie de l'alimentation, Edition 2000, Paris (France), 121 p.
- Dinnella C., Torri L., Caporale G. & Monteleone E. (2014). An exploratory study of sensory attributes and consumer traits underlying liking for and perceptions of freshness for ready to eat mixed salad leaves in Italy. *Food Research International, Complete*, 59 : 108-116.
- Donnelly C.B., Leslie J.E. & Black L.A. (1968). Production of Enterotoxin A in Milk. *Applied Microbiology*, 16(6) : 917-924.
- Dony A. (2009). Essais de mise au point de produits de 4^{ème} gamme à base de banane et de noix de coco, Mémoire d'ingénieur. Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux, Université Bordeaux 1, Bordeaux, France, 86 p.
- Dreher M.L. (2018). Whole Fruits and Fruit Fiber Emerging Health Effects. *Nutrients*, 10(12) : 1779-1833.

- Dubois-Brissonnet F. & Guillier L. (2020). Les maladies microbiennes d'origine alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(1) : 30-38.
- Duchêne-Massias A. (2015). Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes Golden Delicious. Thèse, Université de Bordeaux (Bordeaux, France), 265 p.
- Dumas E. (2007). *Listeria monocytogenes* : Caractérisation fonctionnelle d'un mutant ferritine. Etude de la biodiversité par une approche protéomique. Thèse de l'école Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand, France), 241 p.
- Ebabhi A. & Adebayo R. (2022). Nutritional Values of Vegetables. *Ertan Yildirim and Melek Ekinici*, Erzurum, Turquie, 292 p.
- Eichholzer M., Lüthy J., Gutzwiller F. & Stähelin H. B. (2001). The role of folate, antioxidant vitamins and other constituents in fruit and vegetables in the prevention of cardiovascular disease: the epidemiological evidence. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.*, 71(1) : 5-17.
- Eisenstein B.I. (2008). Treatment challenges in the management of complicated skin and soft-tissue infections. *Clinical Microbiology and infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(2) : 17-25.
- Ekici G. & Dümen E. (2019). *Escherichia coli* and food safety. BoD Books on Demand, Amazone, France, 136 p.
- Espenhain L., Riess M., Müller L., Colombe S., Ethelberg S., Litrup E., Jernberg C., Kühlmann-Berenzon S., Lindblad M., Hove N.K., Torpdahl M. & Mörk M.J. (2019). Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark. *Eurosurveillance*, 24(24) : 1-5.
- Eveillard M. (2007). Politique de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline à l'admission : adaptation à la diversification des facteurs de risque de portage, conséquences de cette politique pour les indicateurs de surveillance et la transmission. Thèse de Doctorat, Université d'Angers (Angers, France), 160 p.
- FAO/WHO (2008a). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs, meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series , Rome, Italy, pp 14-151.
- FAO/WHO (2008b). Viruses in food: scientific advice to support risk management activities, meeting report. Microbiological Risk Assessment Series, Rome, Italy, pp 13-73.
- FAO/WHO (2014). Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting, 3–7 September 2012, FAO Headquarters, Rome, Italy. Microbiological Risk Assessment Series, Rome, Italy, pp 23-302.

- FAO (2015). Promotion of Fruit and Vegetables for Health. human nutrition meetings Oceania nutrition education fruit vegetables public health. Rome, Italy, 94 p.
- FAO (2020). Fruits et légumes pour la santé. Rapport de l'atelier conjoint FAO/OMS, Japon, 52 p
- FAO (2021). Fruits et légumes : éléments essentiels de ton alimentation. Année internationale des fruits et des légumes, Rome, Italy, 86 p.
- Farber J. (1991). Microbiology aspects of modified atmosphere packing technology. *Journal of Food Protection*. 54(1) : 58-70.
- Fauchere J.L. & Avril J. L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. pp213-217.
- Federici E., Gentilucci V., Bernini V., Vittadini E. & Pellegrini N. (2021). Ready to eat shelf-stable brown rice in pouches: effect of moisture content on product's quality and stability. *European Food Research and Technology = Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. A*, 247(11) : 2677-2685.
- Feng P. (2014). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Produce. A Food Safety Dilemma. *Microbiology Spectrum*, 2(4) : 1-11.
- Fong A.T., Katelaris C.H. & Wainstein B.K. (2018). Bullying in Australian children and adolescents with food allergies. *Pediatric Allergy and Immunology*, 29(7) : 740–746.
- Fridkin S.K., Hageman J.C., Morrison M., Sanza L.T., Como-Sabetti K., Jernigan J.A., Harriman K., Harrison L.H., Lynfield R., Farley M.M., & Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *The New England Journal of Medicine*, 352(14) : 1436-1444.
- Fröhling A., Rademacher A., Rumpold B., Klocke M. & Schlüter O. (2018). Screening of microbial communities associated with endive lettuce during postharvest processing on industrial scale. *Heliyon*, 4(7) : 647-671.
- García-Gimeno R.M. & Zurera-Cosano G. (1997). Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1) : 31-38.
- Gardini F., Tofalo R. & Suzzi G. (2003). A Survey of Antibiotic Resistance in Micrococcaceae Isolated from Italian Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Protection*, 66(6) : 937-945.
- Garg N., Churey J.J. & Splittstoesser D.F. (1990). Effect of Processing Conditions on the Microflora of Fresh-Cut Vegetables. *Journal of Food Protection*, 53(8) : 701-703.

- Garrity G.M., Brenner D. J., Krieg N.R., & Staley, J.T. (2005.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2nd ed.). *Springer*, New York (USA) : 26-304.
- Gartley S., Anderson-Coughlin B., Sharma M. & Kniel K.E. (2022). *Listeria monocytogenes* in Irrigation Water: An Assessment of Outbreaks, Sources, Prevalence, and Persistence. *Microorganisms*, 10(7) : 13-19.
- Geeson J. D., Browne K. M., Maddison K., Shepherd J. & Guaraldi F. (1985). Modified atmosphere packaging to extend the shelf life of tomatoes. *International Journal of Food Science & Technology*, 20(3) : 339-349.
- Gérard A. (2016). Conception et évaluation de méthodes de détection d'insectes dans les matrices alimentaires. Master en Bioingénieur, Chimie et Bio-industries, Université de Liège (Gembloux, Belgique), 83p.
- Ghaffoori H.A. & Suleiman A.A. (2022). Isolation, Identification and antibiotic resistance profile distribution of clinical *E. coli* in Iraqi patients. *Eurasian Medical Research Periodical*, 8 : 116-121.
- Gil M.I., Selma M.V., Suslow T., Jacxsens L., Uyttendaele M. & Allende A. (2015). Pre- and Postharvest Preventive Measures and Intervention Strategies to Control Microbial Food Safety Hazards of Fresh Leafy Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4) : 453-468.
- Giwa A.S., Memon A.G., Ahmed Shaikh A., Korai R., Maitlo G.U., Maitlo I., Ali S. & Ahmad J. (2021). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in cafeterias of public sector universities. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 33(1) : 11-18.
- Goepfert, J.M. (1980). Vegetables, fruits, nuts and their products. *In* : Microbial ecology of foods. Volume II, *Academic Press*, New York (USA) : 606–642.
- Gollucke A.P.B., Peres R.C., Odair A.N. & Ribeiro D.A. (2013). Polyphenols: a nutraceutical approach against diseases. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 5(3) : 214-219.
- Gomes A. & Korf B. (2018). Chapter 5 - Genetic Testing Techniques. *In* : Pediatric Cancer Genetics, *Elsevier*, Amsterdam (Pays-Bas) : 47-64.
- Goossens J. (2009). Emballage actif et intelligent : nouvelles techniques dans la lutte contre la dégradation des aliments, *Innovations Agronomiques*, 58 : 1-9.
- Gordon D.M. & Cowling A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates : host and geographic effects. *Microbiology (Reading, England)*, 149(12) : 3575-3586.

- Gorris L.G.M. & Peppelenbos H.W. (1992). Modified atmosphere and vacuum packaging to extend the shelf life of respiring food products. *HortTechnology USA*, 2(3) : 303-309.
- Gould L.H., Walsh K.A., Vieira A.R., Herman K., Williams I.T., Hall A.J., Cole D. & Centers for Disease Control and Prevention (2013). Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries*, 62(2) : 1-34.
- Goulet V., Jacquet C., Martin P., Vaillant V., Laurent E. & de Valk H. (2006). Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(6) : 79-81.
- Greume A.P.M.P. (1975). Le lait cru : ce qu'il doit être, comment l'obtenir ? Thèse de médecine vétérinaire., Université de Toulouse (Toulouse, France), 90 p.
- Grigoraş C.G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse de Doctorat en Chimie, Faculté des Sciences et Technologie, Université d'Orléans (Orléans, France), 235 p.
- Grimont P., Grimont F. & Bouvet P. (2000). Taxonomy of the genus *Salmonella*. In : Wray C., Wray A. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, Oxon (Londres, Angleterre) : 1-17.
- Guindo A.Y. (2008). Etude prospective de la prescription et de la consommation des antibiotiques dans le centre de sante de référence de la commune III du district de Bamako. Thèse en Pharmacie, Université de Bamako (Bamako, Mali), 59 p.
- Gupta N. (2019). DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Cytology*, 36(2) : 116-117.
- Habibi Najafi M.B. & Bahreini M. (2012). Microbiological Quality of Mixed Fresh-Cut Vegetable Salads and Mixed Ready- to-Eat Fresh Herbs in Mashhad, Iran. *International Conference on Nutrition and Food Sciences*, 39 : 62-66.
- Haeghebaert S., Duché L., Gilles C., Masini B., Dubreuil M., Minet J.C., Bouvet P., Grimont F., Delarocque Astagneau E. & Vaillant V. (2001). Minced beef and human salmonellosis: review of the investigation of three outbreaks in France. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 6(2) : 21-26.
- Hao R., Qiu S., Wang Y., Yang G., Su W., Song L., Zhang J., Chen J., Jia L., Wang L. & Song H. (2012). Quinolone-resistant *Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-

- spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7) : 2450-2451.
- Haque M., Quan H., Zuo Z., Khan A., Siddique N. & He C. (2020). Pathogenicity of Feed-Borne Bacillus Cereus and Its Implication on Food Safety. *Agrobiological Records*, 3 : 1-16.
- Harada T., Itoh K., Yamaguchi Y., Hirai Y., Kanki M., Kawatsu K., Seto K., Taguchi M. & Kumeda Y. (2013). A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic Escherichia coli serotype O169:H41 in Osaka, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66(6) : 530–533.
- Hauschild T., Kehrenberg C. & Schwarz S. (2003). Tetracycline Resistance in Staphylococci from Free-living Rodents and Insectivores. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(9): 443–446.
- Heaton J.C. & Jones K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere : a review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3) : 613-626.
- Hennekinne J.A. (2009). Nouvelles approches pour la caractérisation des toxi-infections alimentaires à staphylocoques à coagulase positive, Thèse de Doctorat, Agro Paris Tech (Paris, France), 268 p.
- Hennekinne J.A. & Gautier M.V.F. (2013). Detection and quantification of staphylococcal enterotoxin A in foods with specific and sensitive polyclonal antibodies. *Food Control*, 32 : 255-261.
- Herman K.M., Hall A.J. & Gould L.H. (2015). Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973-2012. *Epidemiology and Infection*, 143(14) : 3011-3021.
- Hernandez D.H., Garcia O.P., Rosado J.L. & Goni I. (2011). The contribution, of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, 44 : 1182-1189.
- Hong J.H. & Gross K.C. (2001). Maintaining quality of fresh-cut tomato slices through modified atmosphere packaging and low temperature storage. *Journal of Food Science*, 66(7) : 960-965.
- Hosoya S., Kutsuna S., Shiojiri D., Tamura S., Isaka E., Wakimoto Y., Nomoto H. & Ohmagari N. (2020). Leuconostoc lactis and Staphylococcus nepalensis Bacteremia, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9) : 2283-2285.

- Huerta M.G., Roemmich J.N., Kington M.L., Bovbjerg V.E., Weltman A.L., Holmes V.F., Patrie J.T., Rogol A.D. & Nadler J.L. (2005). Magnesium Deficiency Is Associated With Insulin Resistance in Obese Children. *Diabetes Care*, 28(5) : 1175–1181.
- Ife F.J. & Bas K. (2003). La conservation des fruits et des légumes. Fondation Agromisa (2^{ème} édition), Wageningen, Pays Bas, 95p.
- Ijabadeniyi O.A., Debusho L.K., Vanderlinde M. & Buys E.M. (2011). Irrigation Water as a Potential Preharvest Source of Bacterial Contamination of Vegetables. *Journal of Food Safety*, 31(4) : 452–461.
- ISO 4833-1 (2013). Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes, comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur. Normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 21 p.
- ISO 17410 (2001). Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes psychrotrophes. Volume 1, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 12 p.
- ISO 21527-1 (2008). Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures. Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95. Volume 1, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 9 p.
- ISO 16649-3 (2016). Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*. Volume 3, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 10p.
- ISO 6579-1 (2017). Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella*. Volume 1, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 50 p.
- ISO 11290-2 (2017). Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria spp.* Volume 2, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 29 p.
- ISO 6888-1 (2021). Microbiologie de la chaîne alimentaire. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces), volume 1, normes nationales et documents normatifs nationaux, France, 22 p.

- Jeannequin B., Plénet D., Carlin F., Chauvin J.-E. & Dosba F. (2015). Pertes alimentaires dans les filières fruits, légumes et pomme de terre. *Innovations Agronomiques*, 48 : 59-77.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. & Brule G. (2007). Sciences des Aliments 2- Technologie des Produits Alimentaires. *Technique et documentation*, Lavoisier, France, 456 p.
- Jay J. M. (1986). Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. In : Modern Food Microbiology, 6th Edition, *Aspen Publishers*, New York, USA : 38-66.
- Jobling M.G. & Holmes R.K. (2012). Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse *Escherichia coli* isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. *PloS One*, 7(1) : 1-7.
- Johnson T.J. & Nolan L.K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4) : 750-774.
- Kaczmarek M., Avery S.V. & Singleton I. (2019). Microbes associated with fresh produce: Sources, types and methods to reduce spoilage and contamination. *Advances in Applied Microbiology*, 107 : 29-82.
- Kaper J.B., Nataro J.P. & Mobley H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2) : 123-140.
- Karmali M.A. (2009). Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney International*, 75 : 4-7.
- Karmali M.A., Mascarenhas M., Shen S., Ziebell K., Johnson S., Reid-Smith R., Isaac-Renton J., Clark C., Rahn K. & Kaper J.B. (2003). Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11) : 4930-4940.
- Karou T.G., Rocourt J., Dosso M. & Diopoh K.J. (2003). Influence De La Température Du Milieu De Culture Sur La Croissance De Quelques Souches De *Listeria sp.* Isolées En Côte d'Ivoire. *Agronomie Africaine*, 15(1) : 1-12.
- Kateete D.P., Kimani C.N., Katabazi F.A., Okeng A., Okee M.S., Nanteza A., Joloba M.L. & Najjuka F.C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus* : DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9(23) : 1-7.
- Keenan D.F., Valverde J., Gormley R., Butler F. & Brunton N.P. (2012). Selecting apple cultivars for use in ready-to-eat desserts based on multivariate analyses of physico-chemical properties. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2) : 308-315.

- Kemajou T.S., Awemu G.A., Digban K.A., Oshoman C.E., Ekundayo O.I., Ajugwo A.O. (2017). Microbiological studies of vegetable leaves sold in elele market, rivers-state, Niger. *Journal of Transmitted Diseases and Immunity*, 1(1) :1–5.
- Khadir B.H.E.B. & Mokhtari M. (2019). Enquête sur l'antibiorésistance des entérobactéries isolées des matières fécales chez les ovins. Mémoire de Master en qualité des produits et sécurité alimentaire, faculté des Sciences de la Vie et de la Terre, Université Ziane Achour (Djelfa, Algérie), 45 p.
- Khen B.K., Lynch O.A., Carroll J., McDowell D.A. & Duffy G. (2015). Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses and Public Health*, 62(1) : 11-17.
- Kim H.J., Koo M., Hwang D., Choi J.H., Kim S.M. & Oh S.-W. (2016). Contamination patterns and molecular typing of *Bacillus cereus* in fresh-cut vegetable salad processing. *Applied Biological Chemistry*, 59(4) : 573-577.
- Kirk M.D., Lalor K., Raupach J., Combs B., Stafford R., Hall G.V. & Becker N. (2011). Food- and Waterborne Disease Outbreaks in Australian Long-Term Care Facilities, 2001–2008. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1) : 133-139.
- Kochakkhani H., Dehghan P., Mousavi M. & Sarmadi B. (2016). Occurrence, Molecular Detection and Antibiotic Resistance Profile of *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Ready-to-Eat Vegetable Salads in Iran. *Pharmaceutical Sciences*, 22 : 195-202.
- Konaté N.A. (2005). Etude de la prescription et de la dispensation des antibiotiques à l'hôpital Gabriel Touré. Thèse en Pharmacie, Université de Bamako (Bamako, Mali), 103 p.
- Korsak N., Degeye J-N., Etienne G., China B. & Daube G. (2004). Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *Journal of Food Protection*, 67(10) : 2158-2164.
- Kouassi J.B., Massara C.C., Sess D.E., Tiahou G.G. & Djohan F.Y. (2013). Détermination des teneurs en Magnésium, Potassium, Manganèse et Sodium de deux variétés de gombo. *Journal of Applied Biosciences*, 67 : 5219-5227.
- Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H. D., Schiefer H.G., Slenczka W., von Graevenitz A., & Zahner H. (2003). Zoonoses Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans (3rd ed.). *ASM press*, Washington, USA, 456 p.
- Kuhnert P., Boerlin P. & Frey J. (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1) : 107-117.

- Labani F. Z. K. (2015). Activité « Killer » chez des levures isolées des sols du Nord-Est Algérien : Purification, caractérisation et effet sur les souches de levures indésirables. Thèse de Doctorat. Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 132 p.
- Lai M. (2013). Réévaluation des connaissances et représentation des parents d'enfants atteints de viroses saisonnières vis-à-vis de la prescription d'antibiotiques. Thèse de Médecine, Université Paris Diderot (Paris, France), 119 p.
- Lanham-New S.A. (2008). Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2) : 163-176.
- Larpen J.P. (2000). *Listeria*. In : Technical Documentation, 2ème édition, Paris (France) : 230-238.
- Lamoril J., Ameziane N., Deybach J-C., Bouizegarène P. & Bogard M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5) : 260–279.
- Lee J.C., Oh J.Y., Cho J.W., Park J.C., Kim J.M., Seol S.Y. & Cho D.T. (2001). The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5) : 599–604.
- Lefsrud M., Kopsell D., Sams C., Wills J. & Both A.J. (2008). Dry Matter Content and Stability of Carotenoids in Kale and Spinach During Drying. *HortScience*, 43(6) : 1731-1736.
- Lelong H. (2017). Relations entre Mesures Non Médicamenteuses et Pression Artérielle. Analyse des données de l'étude NutriNet-Santé. Thèse de Doctorat en Santé publique, Université Sorbonne (Paris, France), 220 p.
- Le Loir Y., Baron F. & Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2 (1) : 63-76.
- Leneveu-Jenvrin C., Remizer F., UMR QualiSud, (2018). La biopréservation des fruits et légumes de 4^e gamme, Université de La Réunion 97490, Sainte-Clotilde. Canada, 7p.
- Leneveu-Jenvrin C., Quentin B., Assemat S., Hoarau M., Meile J-C. & Remize F. (2020). Changes of Quality of Minimally-Processed Pineapple (*Ananas comosus*, var. 'Queen Victoria') during Cold Storage : Fungi in the Leading Role. *Microorganisms*, 8(2) : 179-185.
- Li M., Fan Y., Zhang X., Hou W. & Tang Z. (2014). Fruit and vegetable intake and risk of type 2 diabetes mellitus: meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ open*, 4(11) : 54-97.

- Liao C.H. & Fett W.F. (2001). Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, 64(8) : 1110–1115.
- Liao N., Borges C.A., Rubin J., Hu Y., Ramirez H.A., Chen J., Zhou B., Zhang Y., Zhang R., Jiang J. & Riley L.W. (2020). Prevalence of β -Lactam Drug-Resistance Genes in *Escherichia coli* Contaminating Ready-to-Eat Lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(12) : 739-742.
- Lorente-Mento J.M., Valverde J.M., Serrano M. & Pretel M.T. (2022). Fresh-Cut Salads: Consumer Acceptance and Quality Parameter Evolution during Storage in Domestic Refrigerators. *Sustainability*, 14(6) : 1-13.
- Low J.C. & Donachie W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Veterinary Journal*, 153(1) : 9-29.
- Luo L. & Xu L. (2003). Vitamin K and osteoporosis. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 25(3) : 346-349.
- MacDonald E., Einöder-Moreno M., Borgen K., Thorstensen Brandal L., Diab L., Fossli Ø., Guzman Herrador B., Hassan A. A., Johannessen G. S., Johansen E. J., JørgensenKimo R., Lier T., Paulsen B. L., Popescu R., TokleSchytte C., SæbøPettersen , Vold L., Ørmen Ø., Wester A. L., Wiklund M. & Nygård K. (2016). National out break of *Yersinia enterocolitica* infections in military and civilian populations associated with consumption of mixed salad, Norway, 2014. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21 (34) : 30312-30321.
- Maciel N.O.P., Pilo F.B., Freitas L.F.D., Gomes F.C.O., Johann S., Nardi R.M.D., Lachance M., Rosa C.A. (2013). The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. *Internet Journal Microbiology*, 160(3) : 201–205.
- Mainardi J.L., Goldstein F.W. & Gutmann L. (1996). Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Encyclopédie médico-chirurgicale. *Maladies Infectieuses*, 1 : 1-8.
- Manthou E., Coeuret G., Chaillou S. & Nychas G-J.E. (2021). Evolution of fungal community associated with ready-to-eat pineapple during storage under different temperature conditions. *Food Microbiology*, 97 : 1-9.
- Marklinder I. M., Lindblad M., Eriksson L. M., Finnson A. M. & Lindqvist R. (2004). Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in sweden. *Journal of Food Protection*, 67(11) : 2570-2577
- Martinez de la Peña C.F., De Masi L., Nisa S., Mulvey G., Tong J., Donnenberg M.S. & Armstrong G.D. (2016). BfpI, BfpJ, and BfpK Minor Pilins Are Important for the

- Function and Biogenesis of Bundle-Forming Pili Expressed by Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(5) : 846-856.
- Martínez-González N.E., Martínez-Chávez L., Cabrera-Díaz E., Martínez- Cárdenas C., Gutiérrez-González P. & Castillo A. (2015). Use of a Novel Medium, the Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium, for Isolation of *Listeria monocytogenes* From Raw or Non-Pasteurized Foods. *Food Microbiology*, 22 : 241-245
- Massaglia S., Merlino V.M., Borra D., Bargetto A., Sottile F. & Peano C. (2019). Consumer Attitudes and Preference Exploration towards Fresh-Cut Salads Using Best–Worst Scaling and Latent Class Analysis. *Foods*, 8(11) : 553-568.
- McLauchlin J. & Low J.C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *The Veterinary Record*, 135(26) : 615–617.
- Mehdi S. (2008). La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan ii de Settat. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V(Rabat, Maroc), 51 p.
- Mehrotra M., Wang G. & Johnson W.M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3) : 1032-1035.
- Mekhloufi O.A., Chieffi D., Hammoudi A., Bensefia S.A., Fanelli F. & Fusco V. (2021). Prevalence, Enterotoxigenic Potential and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from algerian ready-to-eat foods. *Toxins*, 13(12) : 818-835.
- Merzougui S., Lkhider M., Grosset N., Gautier M. & Cohen N. (2014). Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(11) : 1-5.
- Meskine A. & Benabdelkader L. (2016). Etude de la résistance et la multirésistance aux antibiotiques de souches isolées du milieu hospitalier. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 74 p.
- Mgbakogu R.A. & Eledo B.O. (2015). Evaluation of *Bacillus cereus* contamination of local vegetables in Obosi, Nigeria. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 5(15): 62–66.
- Mizehoun A.G.C. (2015). Apport alimentaire de sodium, potassium et iode, relation avec l'état nutritionnel au Bénin. Thèse de Doctorat en Santé Publique/Nutrition-Diététique, Université de Limoges (Limoges, France), 157 p.

- Moreno Switt A.I., Soyer Y., Warnick L.D. & Wiedmann M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(4) : 407-415.
- Morioka H., Oka K., Yamada Y., Nakane Y., Komiya H., Murase C., Iguchi M. & Yagi T. (2022). Lysinibacillus fusiformis bacteremia: Case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 28(2) : 315-318.
- Morot-Bizot S. (2006). Les Staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de Doctorat en Science des aliments, Université Blaise Pascal (Paris, France), 127 p.
- Mritunjay S.K. & Kumar V. (2017). A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *Biotechnonology*, 7(1) : 1-13.
- Muller A. (2017). Bon usage des antibiotiques : résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé. Thèse de Doctorat en Sciences de la vie et de la santé, Université Bourgogne Franche-Comté (Besançon, France), 177 p.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1) : 263-273.
- Multon J.L. (1998). L'emballage des denrées alimentaires de grande consommation/coordonnateurs ,*Technical documentation, Lavoisier*, Paris, France, 1082 p.
- Munk M.E. & Kaufmann S.H.E. (1988). Listeria monocytogenes reactive T lymphocytes in healthy individuals. *Microbial Pathogenesis*, 5(1) : 49-54.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., & Tenover, R.H. (2003). Manual of Clinical Microbiology, 8^{ème} édition. *American Society for Microbiology*, Herdon, VA, USA, 2113 p.
- Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., & Pfaller M.A. (2007). Manual of Clinical Microbiology, 9^{ème} édition. *American Society for Microbiology*, Washington, USA, 2256 p.
- Mutsch L. (2018). Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Lignes directrices pour l'interprétation, Division de la sécurité alimentaire, Luxembourg, Luxembourg, 57 p.

- Nandy P., Roy S., Thakur A.R. & Chaudhuri S.R. (2013). Comparative study on characterization of three staphylococcal isolates from varied origin. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 7 (1) : 44-51.
- Nahdi S. (2016). Caractérisation des bactéries Psychrotrophes de deux types aliments (Viande de Volaille et de Poisson Sardine). Mémoire de Master, Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences Biologiques. Université des frères Mentouri (Constantine, Algérie), 55 p.
- Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P. & Levine M.M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 6(9) : 829-831.
- Neidhardt F.C. & Curtiss R. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella* spp: cellular and molecular biology. *ASM Press*, Washington, DC(USA): 4-9.
- Nguyen-the C. & Carlin F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4) : 371–401.
- Nguyen-The (1999). Fresh and Processed Vegetables. *In* : The microbiological safety and quality of food. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. ISBN, USA:1-47.
- Niemz A., Ferguson T.M. & Boyle D.S. (2011). Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in Biotechnology*, 29(5) : 240–250.
- Nouri M. & Ziadi C. (2015). Etude bactériologique et résistance aux antibiotique de klebsiellapneumonie.Génétiquemoléculaire ,Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 69 p.
- Nováková D., Pantůcek R., Petrás P., Koukalová D. & Sedláček I. (2006). Occurance of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. *FEMS Microbiology Letters*, 263(2) : 163-168.
- Nyenje M.E., Odjadjare C.E., Tanih N.F., Green E. & Ndip R.N. (2012). Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8) : 2608–2619.
- O’Beirne D., Gomez-Lopez V., Tudela J.A., Allende A. & Gil M.I. (2015). Effects of oxygen-depleted atmospheres on survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut Iceberg lettuce stored at mild abuse commercial temperatures. *Food Microbiology*, 48 : 17–21.
- Ogston A. (1884). Report upon microorganisms in surgical diseases. *British Médical Journal*, 1(1054) : 369-375.

- Oje O., David O., Adeosun O., Adebayo A. & Famurewa O. (2016). Multiple Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in Ready-to-eat Foods from Food Outlets in Ekiti State University and Its Environ. *British Microbiology Research Journal*, 13(1) : 1-11.
- Ok L.P., & Gil N.H. (2007). Aging and senescence of the leaf organ. *Journal of Plant Biology*, 50 : 291-300.
- Okhuysen P.C. & Dupont H.L. (2010). Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4) : 503-505.
- Olanrewaju A-S., Alamgir Hossain M., Whiteside N. & Mercieca P. (2020). Social media and entrepreneurship research: A literature review. *International Journal of Information Management*, 50 : 90-110.
- Oliveira M. A. de, Maciel de Souza V., Morato Bergamini A. M. & De Martinis E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8) : 1400–1403.
- Oliveira E.S., Noronha T.B. & Tondo E.C. (2019). *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence and Levels on Lettuce: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Food Microbiology*, 84 : 103-217.
- Olsvik Ø., Wasteson Y., Lund A. & Hornes E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12(1) : 103-113.
- Ongeng D., Geeraerd A.H., Springael D., Ryckeboer J., Muyanja C. & Mauriello G. (2015). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the manure-amended soil-plant ecosystem of fresh vegetable crops: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3) : 273-294.
- Orsi R.H. & Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12) : 5273-5287.
- Ouedraogo M. (1997). Contribution à l'amélioration de l'antibiothérapie dans le District de Bamako : Analyse de la consommation des antibiotiques dans les officines Carrefour de Lafiabougou et les Hirondelles. Thèse de Pharmacie, Université de Bamako, (Bamako, Mali), 74p.
- Pagán R., Condón S. & Sala F.J. (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8) : 3225–3232.

- de Paiva-Santos W., de Sousa V.S. & Giambiagi-deMarval M. (2018). Occurrence of virulence-associated genes among *Staphylococcus saprophyticus* isolated from different sources. *Microbial Pathogenesis*, 119 : 9-11.
- Pollard C., Miller M., Woodman R. J., Meng R. & Binns C. (2009). Changes in Knowledge, Beliefs, and Behaviors Related to Fruit and Vegetable Consumption Among Western Australian Adults from 1995 to 2004. *American Journal of Public Health*, 99(2) : 355-361.
- Park J.H., Oh S.S., Oh K.H., Shin J., Jang E.J., Jun B.Y., Youn S.K. & Cho S.H. (2014). Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(10) : 775–781.
- Park K.M., Jeong M., Park K.J. & Koo M. (2018). Prevalence, enterotoxin genes, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from Raw Vegetables in Korea. *Journal of Food Protection*, 81(10) : 1590–1597.
- Paudyal N., Anihouvi V., Hounhouigan J., Matsheka M.I., Sekwati-Monang B., Amoa-Awua W., Atter A., Ackah N.B., Mbugua S., Asagbra A., Abdelgadir W., Nakavuma J., Jakobsen M. & Fang W. (2017). Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries - A meta-analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 249 : 35-43.
- Peng J., Yang J. & Jin Q. (2009). The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(1): 147-52.
- Pei A., Oberdorf W., Nossa C., Agarwal A., Chokshi P., Gerz E., Jin Z., Lee P., Yang L., Poles M., Brown S., Sotero S., DeSantis T., Brodie E., Nelson K. & Pei Z. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 : 3886-3897.
- Piccart K., Verbeke J., De Visscher A., Piepers S., Haesebrouck F. & De Vlieghe S. (2016). Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus fleurettii* and different strains of *Staphylococcus* chromogenes in dairy heifers. *Veterinary Research*, 47(1) : 45-56.
- Pirie J. H. H. (1940). *Listeria* : Change of name for a genus bacteria. *Nature*, 145(3668) : 1-264.
- Plyusnin I., Kant R., Jääskeläinen A.J., Sironen T., Holm L., Vapalahti O. & Smura T. (2020). Novel NGS Pipeline for Virus Discovery from a Wide Spectrum of Hosts and Sample Types. *HELDA*, 6(2) : 1-10.

- Pollard C., Miller M., Woodman R. J., Meng R. & Binns C. (2009). Changes in Knowledge, Beliefs, and Behaviors Related to Fruit and Vegetable Consumption Among Western Australian Adults from 1995 to 2004. *American Journal of Public Health*, 99(2) : 355-361
- Pompey M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R. & Cormier M. (1996). Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12) : 4621–4626.
- Prabhakar K. (2014). Intermediate Moisture Foods. In: *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, eds. Batt C.A. & Tortorello M.L., Academic Press, New York, USA, pp. 372-376.
- Prescott L.M., Harley J.P & Klein D. (2010). Microbiologie. *Edition 2 Française. De Boeck Supérieur*, Paris, France, 1200 p.
- Qadri O.S., Yousuf B. & Srivastava A.K. (2015). Fresh-cut fruits and vegetables : Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks-A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1) : 1-11.
- Quincampoix J.C. & Mainardi J.L. (2001). Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation*, 10(3): 267-275.
- Raviart C. (1990). Flore microbienne des végétaux prêts à l'emploi dits de la quatrième gamme. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Paris 5(Paris, France), 66 p.
- Rekhy R. & McConchie R. (2014). Promoting consumption of fruit and vegetables for better health : have campaigns delivered on the goals ?. *Appetite*, 79 : 113-123.
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M.C., Michael I. & Fatta-Kassinos D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of The Total Environment*, 447 : 345–360.
- Roberts M.C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L.B., Rood J. & Seppala H. (1999). Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12) : 2823–2830.
- Robert D. (2013). *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique sportive, Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Université Angers (Angers, France), 22p.
- Rodrigo D., Rosell C.M. & Martinez A. (2021). Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods*, 10(2) : 291-302.

- Ryan K. J., & Ray C. G. (2004). *Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Disease*. 4^{ème} édition McGraw-Hill, New York, USA, 997 p.
- Ryffel C., Kayser F.H. & Berger-Bächi B. (1992). Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(1): 25–31.
- Sahlström L., De Jong B. & Aspan A. (2006). *Salmonella* isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis. *Letters in Applied Microbiology*, 43(1): 46–52.
- Şanlıbaba P., Tezel B.U. & Çakmak G.A. (2018). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Turkey. *Journal of Food Quality*, 1 : 1-9.
- Sant'Ana A.S., Landgraf M., Destro M.T. & Franco B.D.G.M. (2011). Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology*, 28(6) : 1235-1237.
- Sapkota A. (2022). Esculin Hydrolysis Test- Principle, Procedure, Results, Uses. *Microbe Notes*, 13^{ème} édition, Elsevier, Masson, France, 16 p.
- Schleifer K.H. & Kilpper-Balz R. (1984). "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. As *Enterococcus faecalis* comb.nov. And *Enterococcus faecium* comb. nov." *International Journal Systematic and Bacteriology*, 34 : 31–34.
- Schmidt S.J. & Fontana Jr.A.J. (2007). Appendix E: Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products. *In : Water Activity in Foods*, Wiley Online Books, USA: 407-420.
- Schiffers B., Moreira C. (2011). *Fondements de la protection des cultures*, Manuel n° 7. COLEACP/PIP Press. Programme PIP/COLEACP, Bruxelles (Belgique), 294 p.
- Schroeder G.N. & Hilbi H. (2008). Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1) : 134-156.
- SciCom (2017). Priorisation des risques microbiologiques et directives pour garantir la sécurité alimentaire microbiologique des denrées alimentaires végétales crues et minimalement transformées en Belgique *Sécurité alimentaire microbiologique denrées alimentaires végétales*. Avis scientifique approuvé par le Comité scientifique, Belgique, 63 p.
- SciCom (2009). Advice 28-2009 on the quality of irrigation water used in primary plant production in terms of food safety. Avis approuvé par le Comité scientifique le 9 octobre 2009, Belgique, 19 p.

- Sergelidis D., Abraham A., Anagnostou V., Govaris A., Papadopoulos T. & Papa A. (2012). Prevalence, Distribution, and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* in Ready-to-Eat Salads and in the Environment of a Salad Manufacturing Plant in Northern Greece. *Czech Journal of Food Sciences*, 30 : 285-291.
- Seydi M., Sow A.I., Soumaré M., Diallo H.M., Hatim B., Tine R., Diop B.M. & Sow P.S. (2004). *Staphylococcus aureus* bacteremia in the Dakar Fann University Hospital. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 34(5) : 210-215.
- Shailesh K.S, Samantha N.F & Ashutosh K.M. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis : The players involved and the roles they play. *Gut Microbes*, 8(6) : 1-9.
- Shawish R. & Tarabees R. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* isolated from beef products in Egypt. *Open Veterinary Journal*, 7(4) : 337-341.
- Shepard S.M., Danzeisen J.L., Isaacson R.E., Seemann T., Achtman M. & Johnson T.J. (2012). Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(2) : 395-405.
- Slavin J.L. & Lloyd B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*, 3(4) : 506-516.
- Slimestad R., Fossen T. & Brede C. (2020). Flavonoids and other phenolics in herbs commonly used in Norwegian commercial kitchens. *Food Chemistry*, 309 : 1-28.
- Smati M., Clermont O., Bleibtreu A., Fourreau F., David A., Daubié A.-S., Hignard C., Loison O., Picard B. & Denamur E. (2015). Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *Microbiology Open*, 4(4) : 604-615.
- Söderqvist K. (2017). Is your lunch salad safe to eat? Occurrence of bacterial pathogens and potential for pathogen growth in pre-packed ready-to-eat mixed-ingredient salads. *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1) : 1-7.
- Soliva-Fortuny R., Elez-Martinez P. & Martin-Belloso O. (2004). Microbiological and biochemical stability of fresh-cut apples preserved by modified atmosphere packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5: 215–224.
- Soncy K., Anani K., Djeri B., Adjrah Y., Karou D. S., Ameyapoh Y. & de Souza C. (2019). Assessment of microbial contamination risks factors and safety of out of home food in Lomé-Togo. *International Journal of Food Research*, 6 : 1-8.
- Soumahoro S., Ouattara H.G., Droux M., Nasser W., Niamke S.L. & Reverchon S. (2020). Acetic acid bacteria (AAB) involved in cocoa fermentation from Ivory Coast: species

- diversity and performance in acetic acid production. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5) : 1904-1916.
- Stine S.W., Song I., Choi C.Y. & Gerba C.P. (2005). Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68(5) : 913-918.
- Sulaiman I.M., Hsieh Y-H., Jacobs E., Miranda N., Simpson S. & Kerdahi K. (2018). Identification of *Lysinibacillus fusiformis* Isolated from Cosmetic Samples Using MALDI-TOF MS and 16S rRNA Sequencing Methods. *Journal of AOAC International*, 101(6) : 1757-1762.
- Suthep S., Prat I., Pisit V. & Kraichat T. (2016). Uptake of Copper and Zinc in Lettuce (vegetable to green leaf) Planted in Sida Soil and Lignite Bottom Ash Mixtures. *Naresuan University Journal : Science and Technology*, 25(3) : 31-42.
- Tahamtan Y., Hayati M. & Namavari M. (2010). Prevalence and distribution of the stx1, stx2 genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1) : 8-13.
- Taneja N., Singh M., Rao P., Biswal M., Priya S., Chander R. & Sharma M. (2011). Fecal contamination of drinking water supplies in and around Chandigarh and correlation with acute gastroenteritis. *The Journal of Communicable Diseases*, 43(3) : 193-199.
- Tankoua Y. (1992). Evaluation de l'antibiothérapie dans le service de médecine interne de l'Hôpital du Point-G de Bamako, Mali. Thèse de Pharmacie, Université de Bamako (Bamako, Mali), 109 p.
- Tanui C.K., Benefo E.O., Karanth S. & Pradhan A.K. (2022). A Machine Learning Model for Food Source Attribution of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens*, 11(6) : 679-691.
- Taxt A., Aasland R., Sommerfelt H., Nataro J. & Puntervoll P. (2010). Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a Vaccine Target. *Infection and Immunity*, 78(5) : 1824-1831.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B. & Denamur E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3) : 207-217.
- Thévenot D., Dernburg A. & Vernozy-Rozand C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1) : 7-17.
- Tian J.-Q., Bae Y.-M., Choi N.-Y., Kang D.-H., Heu S. & Lee S.-Y. (2012). Survival and growth of foodborne pathogens in minimally processed vegetables at 4 and 15 °C. *Journal of Food Science*, 77(1) : 48-50.

- Tirilly Y. & Bourgeois C.M. (1999). Technologie des légumes. *Agriculture et agro-alimentaire. Librairie Eyrolles*, Paris, France, 558 p.
- Titchenal C. & Dobbs J. (2005). Nutritional Value of Vegetables. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, 4(1) : 1-14.
- Toe E., Dadié A.T., Dako E., Loukou G., Djé K.M. & Blé Y.C. (2018). Prevalence and potential virulence of *Escherichia coli* in ready-to-eat raw mixed vegetable salads in collective catering in Abidjan, Côte d'Ivoire. *British Food Journal*, 20(1) : 32-44.
- Tournas V.H. (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1) : 71-77.
- Tsironi T., Dermesonlouoglou E., Giannoglou M., Gogou E., Katsaros G. & Taoukis P. (2017). Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. *International Journal of Food Microbiology*, 240 : 131-140.
- Tucci P., Centorotola G., Salini R., Iannetti L., Sperandii A.F., D'Alterio N., Migliorati G. & Pomilio F. (2019). Challenge test studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Science & Nutrition*, 7(12) : 3845-3852.
- Uddin M.N., Zaman S., Aziz A., Yamamoto K., Nakaura Y. & Bari M.L. (2021). Microbial safety, visual quality and consumers' perception of minimally-processed ready-to-eat salad vegetables prepared and stored at room and refrigeration temperature. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 38(2) : 51-62.
- Ulusoy B., Sancar B. & Öztürk M. (2017). Prevalence of staphylococcal enterotoxins in ready-to-eat foods sold in Istanbul. *Journal of Food Protection*, 80 : 1734-1736.
- Uyttendaele M., Jaykus L.-A., Amoah P., Chiodini A., Cunliffe D., Jacxsens L., Holvoet K., Korsten L., Lau M., McClure P., Medema G., Sampers I. & Rao Jasti P. (2015). Microbial hazards in irrigation water : standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4) : 336-356.
- Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E. & Vargas-Albores F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41 : 297-313.
- Van de Peer Y., Chapelle S. & De Wachter R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, 24(17) : 3381-3391.
- VanLoo E.J., Ricke S.C., Milillo S.R., Seideman S. & Crandall P. (2010). Consumer food safety perceptions of ready-to-eat deli foods in Northwest. *Food Protection Trends*, 30 (11) : 635-643.

- Varoquaux P. (2002). Fruits frais prêts à l'emploi dits de 4ème gamme. In Technologies de Transformation des Fruits. Albagnac édition, Lavoisier, Paris(France) : 119-156.
- Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J. & Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3) : 584-640.
- Vela A.I., Fernández-Garayzábal J.F., Latre M.V., Rodríguez A.A., Domínguez L. & Moreno M.A. (2001). Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(3) : 215-220.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne J. & Freney J. (2000). *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4) : 1521–1527.
- Vernozy-Rozand C., Montet M. P., Bertin Y., Trably F., Girardeau J.P., Martin C., Livrelli V. & Beutin L. (2004). Serotyping, stx2 Subtyping, and Characterization of the Locus of Enterocyte Effacement Island of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 Strains Isolated from the Environment in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4) : 2556–2559.
- Vestrheim D.F., Lange H., Nygård K., Borgen K., Wester A.L., Kvarme M.L. & Vold L. (2016). Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of Salmonella Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013. *Epidemiology & Infection*, 144(8) : 1756-1760.
- Vidal L., Ares G. & Giménez A. (2013). Projective techniques to uncover consumer perception: Application of three methodologies to ready-to-eat salads. *Food Quality and Preference*, 28(1) : 1-7.
- Vierling E. (2003). Aliments et boissons : filières et produits. Doin Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, Rueil-Malmaison, Bordeaux, France, 270 p.
- Wahab A., Chaudhary S., Ahmad A., Kollu V. & Smith S. (2017). A life-devastating cause of gastroenteritis in an immunocompetent host: was it suspected? *Clinical Case Reports*, 6(1) : 209-213.
- Wang S., Meckling K.A., Macrone F.M., Kakuda Y. & Tsao R. (2011). Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents ? *Food Research International Journal*. 44 : 2545-2554.

- Wang X., Gao X. & Hardwidge P.R. (2012). Heat-labile enterotoxin-induced activation of NF- κ B and MAPK pathways in intestinal epithelial cells impacts enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adherence. *Cellular Microbiology*, 14(8) : 1231-1241.
- Wang Y.-T., Lin Y.-T., Wan T.-W., Wang D.-Y., Lin H.-Y., Lin C.-Y., Chen Y.-C. & Teng L.-J. (2019). Distribution of antibiotic resistance genes among *Staphylococcus* species isolated from ready-to-eat foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(4) : 841–848.
- Weber P. (2001). Vitamin K and bone health. *Nutrition*, 17(10) : 880-887.
- Wenzler E., Kamboj K. & Balada-Llasat J.-M. (2015). Severe sepsis secondary to persistent *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. *International Journal of Infectious Diseases*, 35 : 93-95.
- Wilke M., Lovering A. & Strynadka N. (2005). Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8 : 525-533.
- Who P.Y., Thong K.L., Behnke J.M., Lewis J.W. & Zain S.N.M. (2017). Characterization of non-typhoidal *Salmonella* isolates from asymptomatic migrant food handlers in Peninsular Malaysia. *Journal of Food Protection*. 80(8) : 1378-1383.
- Woese C.R. & Fox G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11) : 50-88.
- Xenou D., Tzelves L., Terpos E., Stamatelopoulos K., Sergentanis T.N. & Psaltopoulou T. (2022). Consumption of Fruits, Vegetables and Bladder Cancer Risk : A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Nutrition and Cancer*, 74(6) : 2003-2016.
- Xu C., Jiao C., Sun H., Cai X., Wang X.-L., Ge C., Zheng Y., Liu W., Sun X., Xu Y., Deng J., Zhang Z., Huang S., Dai S., Mou B., Wang Q. & Fei Z. (2017). Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions. *Nature Communications*, 8 : 1-10.
- Xylia P., Botsaris G., Chrysargyris A., Skandamis P. & Tzortzakis N. (2019). Variation of microbial load and biochemical activity of ready-to-eat salads in Cyprus as affected by vegetable type, season, and producer. *Food Microbiology*, 83 : 200-210.
- Xylia P., Chrysargyris A. & Tzortzakis N. (2021). The combined and single effect of marjoram essential oil, ascorbic acid, and chitosan on fresh-cut lettuce preservation. *Foods*, 10(3) : 553-575.
- Yahia B.K.A.H. (2016). Etude phénotypique de quelques souches d'*Escherichia coli* productrices des carbapénèmes. Mémoire de Master en Sciences de la Nature et de la

- Vie, Filière : Sciences Biologiques, Université des Frères Mentouri (Constantine, Algérie), 41p.
- Yam K.L., Takhistov P.T. & Miltz J. (2005). Intelligent Packaging: Concepts and Applications. *Journal of Food Science*, 70(1) : 1-10.
- Yang S.-C., Lin C.-H., Aljuffali I.A. & Fang J.-Y. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, 199(6) : 811-825.
- Yao N.B., Kpata-Konan N.E., Guetandé K.L., Tano K. (2020). Caractérisation De Quelques Légumes-Feuilles Les Plus Consommés Dans La Ville De Daloa (Centre-Ouest, Côte d'Ivoire). *European Scientific Journal*, 16(36) : 1857-7881.
- Yao W., Doué G., Ouattara G.H., Goualié G.B., Koua G. & Niamké S. (2017). Selection of potential *Bacillus* starters for cocoa beans fermentation improvement. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology*, 41: 131-146.
- Yaron S., Kolling G.L., Simon L. & Matthews K.R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10) : 4414-4420.
- Yildirim Y., Pamuk S., Gürler Z. & Ertas N. (2013). The Microbiological Quality of Ready to Eat Salads Sold in Afyonkarahisar, Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19(6) : 1001-1006.
- Zhang H., Wang J., Chang Z., Liu X., Chen W., Yu Y., Wang X., Dong Q., Ye Y. & Zhang X. (2021). *Listeria monocytogenes* Contamination Characteristics in Two Ready-to-Eat Meat Plants From 2019 to 2020 in Shanghai. *Frontiers in Microbiology*, 12 : 1-12.
- Zhang Q., Qing S., Tang G. P., Zou Z. T., Yao G. H. & Zeng G. (2012). A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China. *Western Pacific surveillance and response journal : Western Pacific Surveillance and Response journal*, 3 : 39-43.
- Ziegler M., Kent D., Stephan R. & Guldemann C. (2019). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International Journal of Food Microbiology*, 296 : 83-92.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Fiche d'enquête

Fiche d'enquête – consommation de salades prêtes à l'emploi

Enquêteur : Superviseur :

Date : Numéro du questionnaire :

Caractéristiques sociodémographiques

Commune : 1-Adjamé 2-Abobo 3-Yopougon 4-Port-bouet 5-Plateau 6-Atékoubé
7-Cocody 8-Treichville 9-Williamsville 10-Bengerville

Sexe : 1- Masculin 2- Féminin **Age** : 1- Entre 15-25 ans 2- Entre 25-35 ans
3- Entre 35- 45ans 4- Entre 45- 55ans 5- Entre 55- 65ans 6- 65 ans et plus

Nationalité : 1-Ivoirienne 2-Non Ivoirienne **Religion** : 1-Musulmane 2-Chrétienne
3-Animiste

Situation matrimoniale : 1- Célibataire 2- Marié (e)

Niveau d'instruction : 1-Analphabète 2-Primaire 3- Secondaire 4-Supérieure

Profession : \...../

Consommation des salades prêtes à l'emploi vendues dans les supermarchés ?	
(1) Connaissez-vous les salades prêtes à l'emploi vendues en supermarchés ?	0-Non <input type="checkbox"/> 1-Oui <input type="checkbox"/>
(2) Consommez-vous les salades prêtes à l'emploi vendues en supermarchés ? Si oui laquelle?	0-Non <input type="checkbox"/> 1-Oui <input type="checkbox"/> 1-Salade de fruits <input type="checkbox"/> 2- Salade de légumes <input type="checkbox"/>
(3) À quel moment de la journée consommez-vous ces salades ?	0-Non <input type="checkbox"/> 1-Oui <input type="checkbox"/> 1-Au petit déjeuner <input type="checkbox"/> 2-Au déjeuner <input type="checkbox"/> 3-Au diner <input type="checkbox"/> 4-Autres <input type="checkbox"/>
(4) Consommez-vous quotidiennement ces salades ?	0-Non <input type="checkbox"/> 1-Oui <input type="checkbox"/>
(5) Combien de fois consommez-vous ces salades par semaine?	1-Au plus une fois <input type="checkbox"/> 2-Au moins une fois <input type="checkbox"/>
(6) Avez-vous déjà eu un malaise (une infection) après la consommation les salades prêtes à manger vendues en supermarchés?	0-Non <input type="checkbox"/> 1-Oui <input type="checkbox"/>
(7) Si oui quels ont été les symptômes ?	1- Fièvre <input type="checkbox"/> 2-vomissement <input type="checkbox"/> 3-Diarrhée <input type="checkbox"/> 4-Autres <input type="checkbox"/>

Annexes

Annexe 2 : Fiche de collecte d'échantillons

Numéro d'ordre.....

Lieux de prélèvement

Commune : 1-Adjamé 2-Abobo 3-Yopougon 4-Port-bouet 5-Plateau 6-Atékoubé
7-Cocody 8-Treichville 9-Williamsville 10-Bengerville

Grandes surfaces : 1-Cap Sud 2-Cap Nord 3- Carrefour 4-Sococé 5-Leaders Price

Caractéristiques du produit

Composition : 1- Un seul type de Légume 2- Deux types de légumes 3-Au moins 3 types de légumes

OU : 1- Un seul type de fruit 2- Deux types de fruits 3- Au moins 3 types de fruits

Origine : 1- Cote d'Ivoire 2- Autres

Identification des conditions de conservation...

I- Conditionnement	
1- Pour les produits importés, comment sont-ils conditionnés à la réception?	1-Barquette plastique <input type="checkbox"/> 2-Pot plastique <input type="checkbox"/> 3-Sachet plastique <input type="checkbox"/> 4-Saladier Plastique <input type="checkbox"/> 5-Plastiques terephlatate <input type="checkbox"/>
2- Pour les produits faits maison, comment sont-ils conditionnés après formulation?	1-Barquette plastique <input type="checkbox"/> 2-Pot plastique <input type="checkbox"/> 3-Sachet plastique <input type="checkbox"/> 4-Saladier Plastique <input type="checkbox"/> 5-Plastiques terephlatate <input type="checkbox"/>
II- Stockage	
1- Comment conservez-vous les salades après réception / Formulation	1-Température ambiante <input type="checkbox"/> 2-Au réfrigérateur <input type="checkbox"/>
2- A quelles températures conservez-vous vos salades	1- Entre 0 et 4 °C <input type="checkbox"/> 3- Entre 4 et 8 °C <input type="checkbox"/> 4- Entre 8 °C et plus <input type="checkbox"/>
3- Pendant combien de temps conservez-vous vos salades	1- De 1 à 10 jours <input type="checkbox"/> Préciser :..... 2- 10 jours et plus <input type="checkbox"/> Préciser :.....
4- Vos salades sont-elles mélangées a d'autres types de produits pendant la conservation?	1-OUI <input type="checkbox"/> Préciser :..... 2-NON <input type="checkbox"/>

Annexes

Annexe 3 : Matériel technique



Centrifugeuse marque OHAUS^R Centrifugeuse marque SIGMA^R VOTEX marque XH-D^R



Balance de marque ADAM^R Incubateur de marque Stuart^R Autoclave prestige Médical



Thermocycleur minipcr^R



Dispositif a électrophorèse

Annexes



Visualiseur de Gel



Microscope a écran



Microonde Proline



Congélateur marque



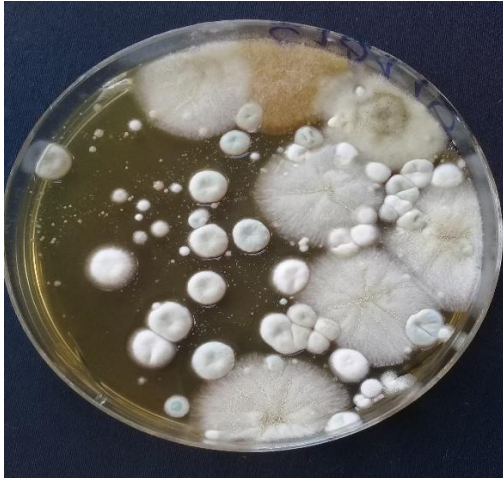
Adagio de marque BioRad



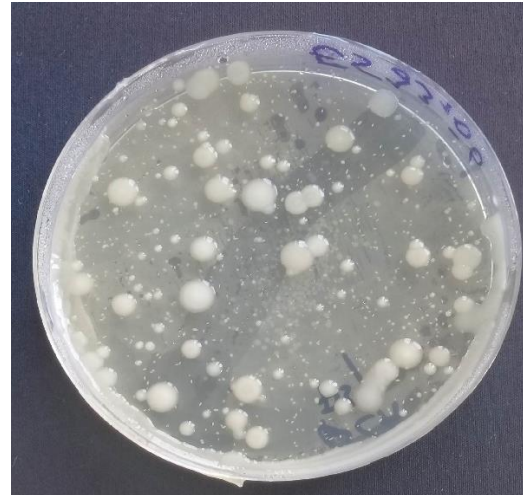
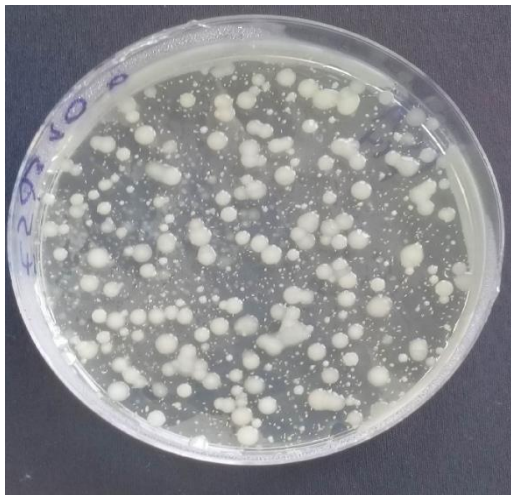
Distributeur d'antibiotiques

Annexes

Annexe 4 : Aspects cultureux des germes recherchés



Colonies présomptives de la flore fongique

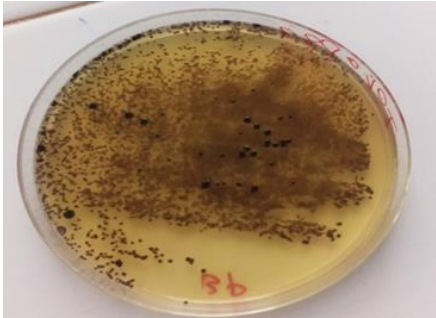


Colonies présomptives de germes aérobies mésophiles

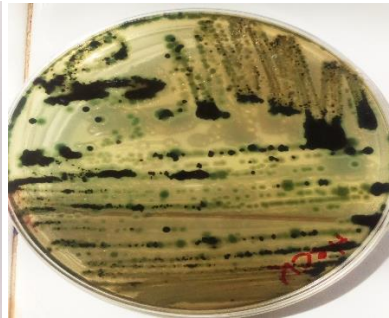


Colonies présomptives de germes aérobies psychrophiles

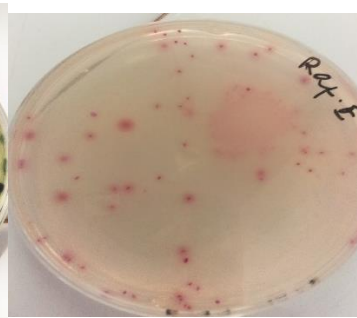
Annexes



S. aureus sur
Baird Parker



Salmonella sp sur
HeKtoen



E. coli sur
E. coli Chromogène

Annexe 5 : Tests d'identifications bactériennes



Utilisation du citrate



Fermentation du mannitol



Test de lysine de fer



Milieu Kligler-Hajna

Annexes



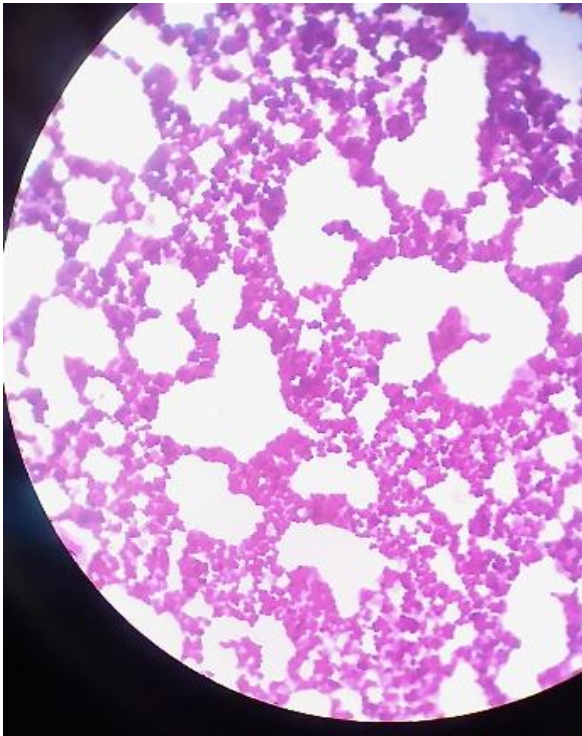
Test d'Oxydase



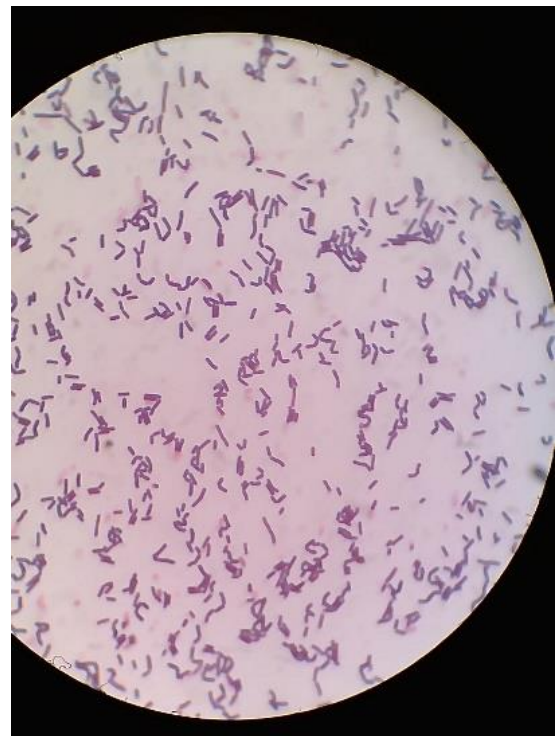
Test de Catalase



Tests d'Urée-indole



Coloration de Gram de *S. aureus*



Coloration de Gram des entérobactéries

Annexes

Tableau XIX : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de *E. coli*

Souches	Gram	LDA	LDC	H ₂ S	Gaz	Glu	Lac	Uré	Ind	Cs	Man	Mob
SCA	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SCH	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SN	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SCOM	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SChV	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SFC	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SFR	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
SME	BG-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+

SCA : Salades Carottes ; SCH : Salades Choux ; SN : Salades Nicoises ; SCOM : Salades Composées ; SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; SFPC : Salades de Fruits de Papaye + Citron ; (+) : positif, (-) : négatif, (BG-) : Bacille Gram négatif.

Gram : coloration de Gram ; **LDA** : Lysine désaminase ; **LDC** : Lysine décarboxylase ; **H₂S** : Sulfure dihydrogène ; **Gaz** : production de gaz ; **Glu** : Glucose ; **Lac** : Lactose ; **Uré** : Urée ; **Ind** : Indole ; **Cs** : Citrate de Simmons ; **Man** : Mannitol ; **Mob** : Mobilité ; **Oxy** : Oxydase.

Tableau XX : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de *Salmonella spp.* dans les salades

Souches	Gram	LDA	LDC	H ₂ S	Gaz	Glu	Lac	Uré	Ind	Cs	Man	Mob	Oxy
JP	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
MR	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SA	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SCH	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SChV	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SFR	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SN	BG-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-

JP : Jeunes Pousses ; MR : Maches +Roquettes ; SA : Salades Aperitives ; SCH : Salades Choux, ; SChV : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; SFR : Salades de Fruits de Raisin ; SN : Salades Nicoises.

(+) : positif, (-) : négatif, (BG-) : Bacille Gram négatif.

Gram : coloration de Gram ; LDA : Lysine desaminase ; LDC : Lysine décarboxylase ; H₂S : Sulfure dihydrogène ; Gaz : production de gaz ; Glu : Glucose ; Lac : Lactose ; Uré : Urée ; Ind : Indole ; Cs : Citrate de Simmons ; Man : Mannitol ; Mob : Mobilité ; Oxy : Oxydase.

Annexes

Tableau XXI : Caractères morphologiques et biochimiques des souches suspectées de *S. aureus* dans les salades

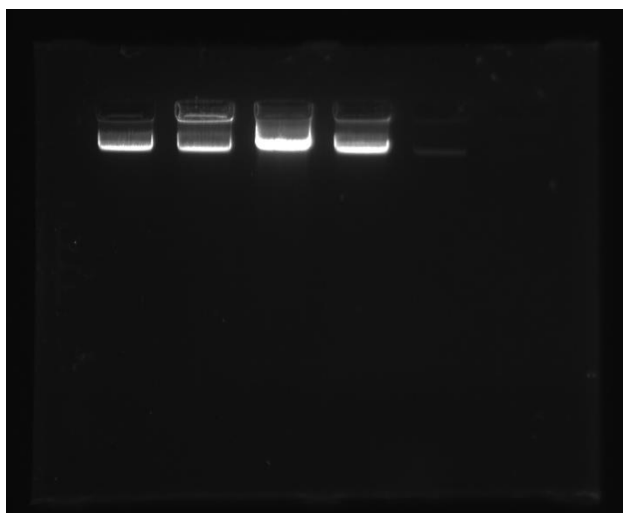
Souches	Gram	Cat	Man	ADNase	Mob
Rq	CG+	+	+	+	+
SCA	CG+	+	+	+	+
SA	CG+	+	+	+	+
SCOM	CG+	+	+	+	+
SN	CG+	+	+	+	+
SChV	CG+	+	+	+	+
SME	CG+	+	+	+	+
SFR	CG+	+	+	+	+
SFPA	CG+	+	+	+	+

Rq : Roquettes ; *SCA* : Salades Carottes ; *SA* : Salades Aperitives ; *SCOM* : Salades Composées ; *SN* : Salades Nicoises, *SChV* : Salades Feuilles de Chênes Vertes ; *SME* : Salades Meli Melo ; *SFR* : Salades de Fruits de Raisin ; *SFPA* : Salades de Fruits de Papaye +Ananas.

(+) : positif, (-) : négatif ; CG+ : Cocci Gram positif

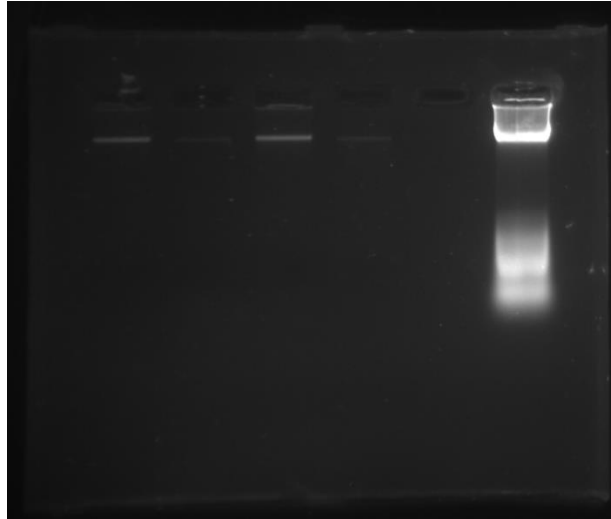
Gram : Coloration de Gram ; **Cat** : Catalase ; **Man** : Mannitol ; **Mob** : Mobilité ; **ADNase** : Tests de ADNase.

Annexe 6 : Electrophorèse des extraits d'ADN

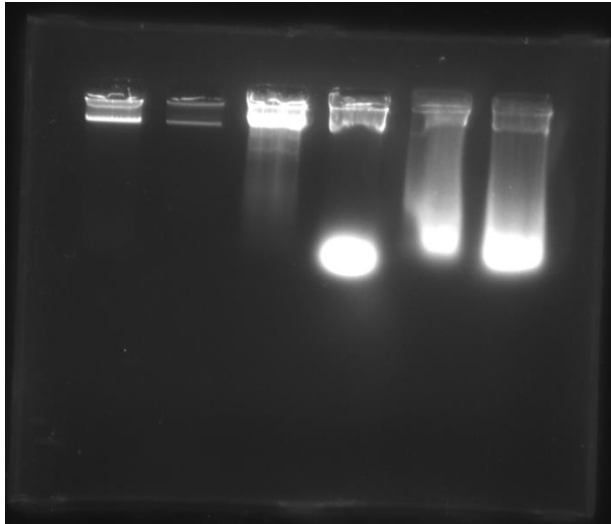


Profil électrophorétique des extraits d'ADN de *S. aureus*

Annexes



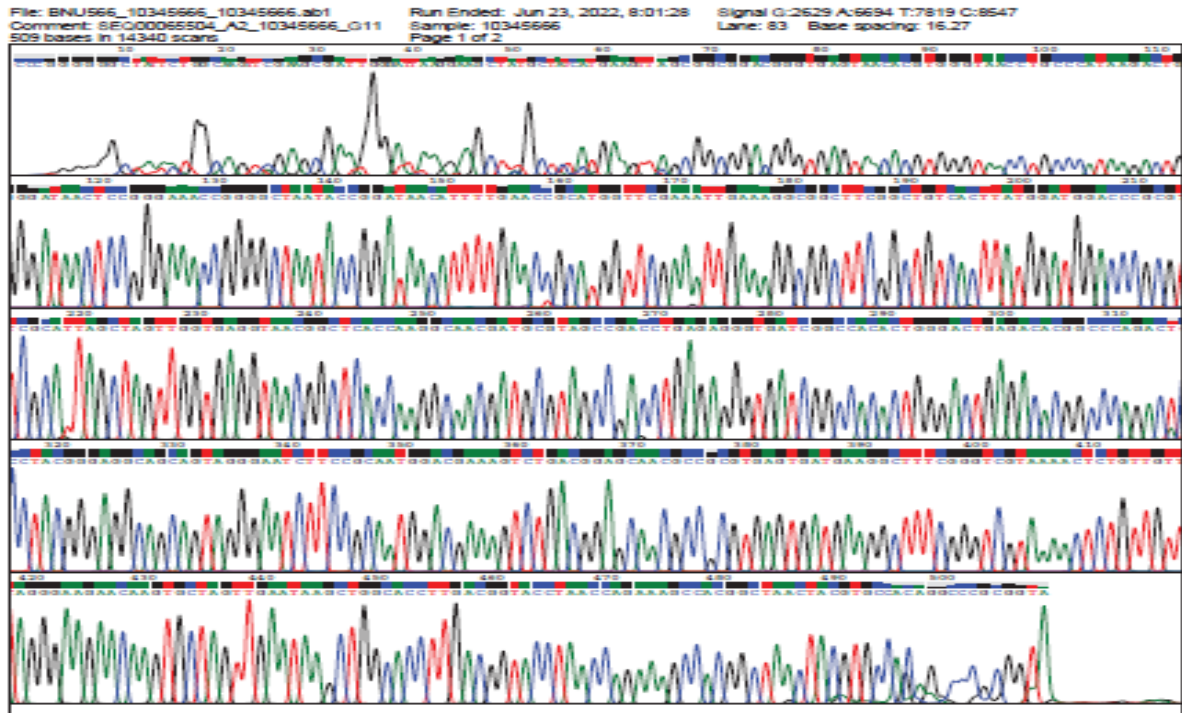
Profil électrophorétique des extraits d'ADN de *E. coli*



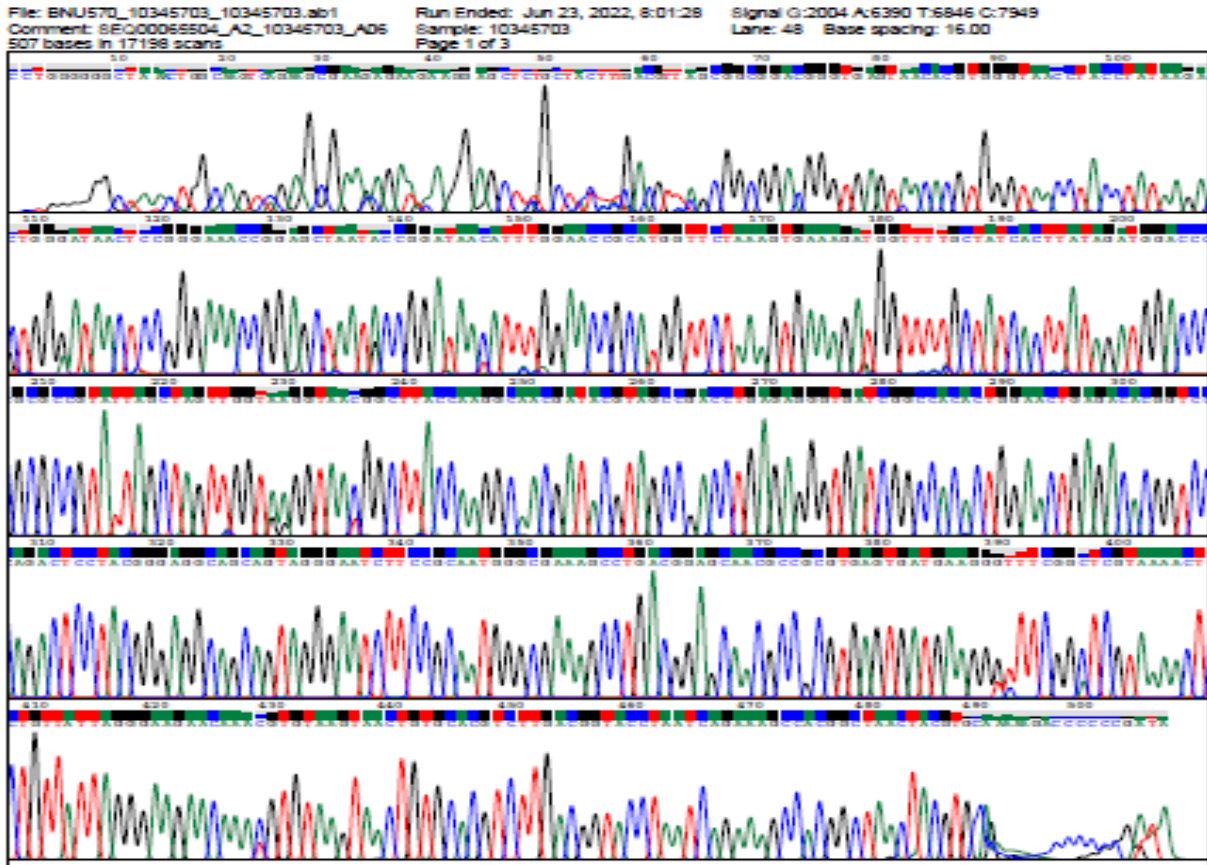
Profil électrophorétique des extraits d'ADN de *E. coli*

Annexe 7 : Observations graphiques du séquençage des Echantillons

Annexes

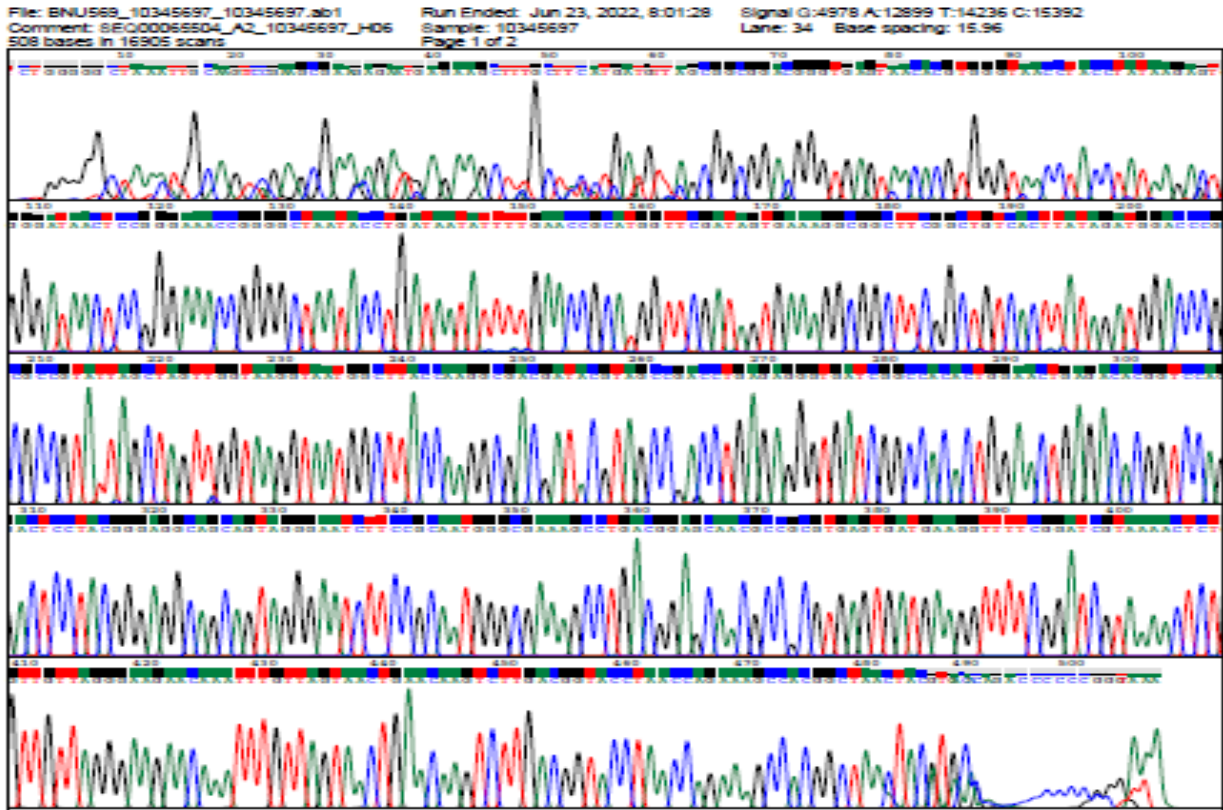


Séquençage du Germe provenant de l'échantillon E9

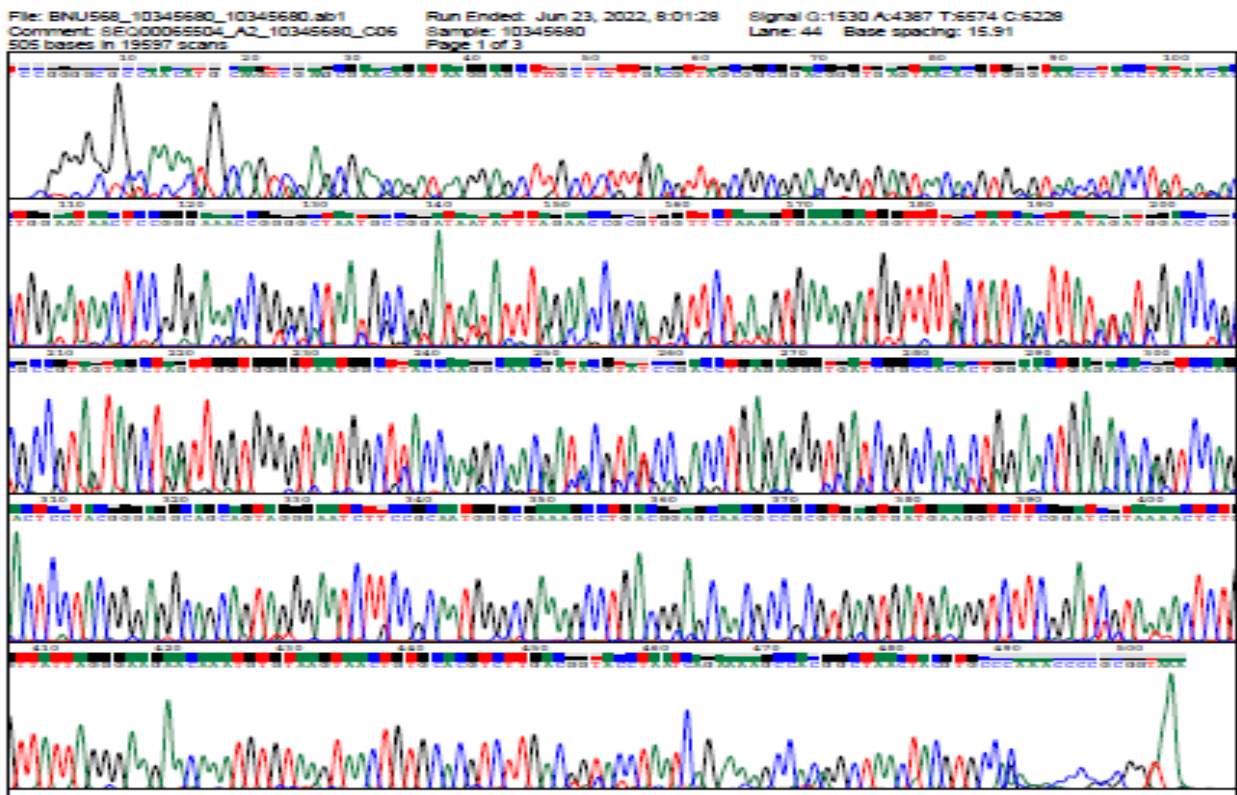


Séquençage du germe provenant de E3

Annexes

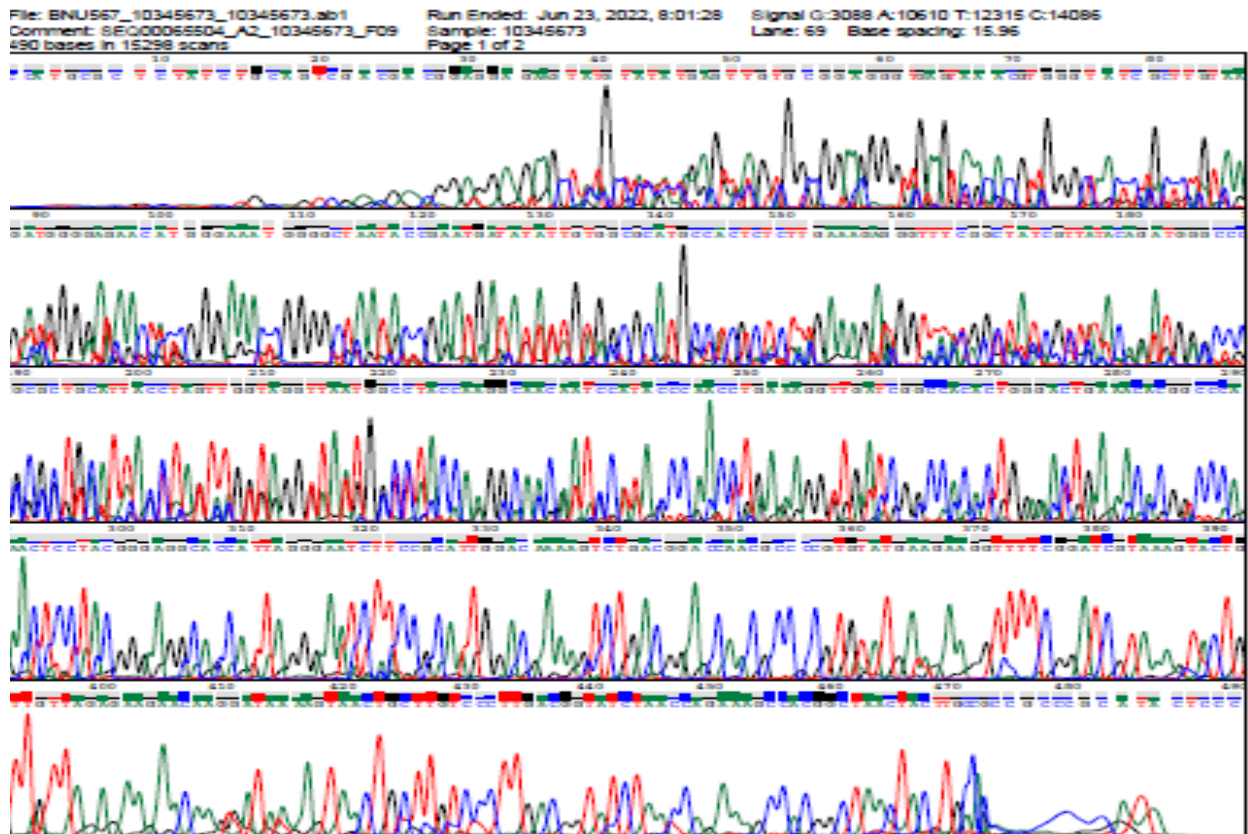


Séquençage du germe provenant de E4

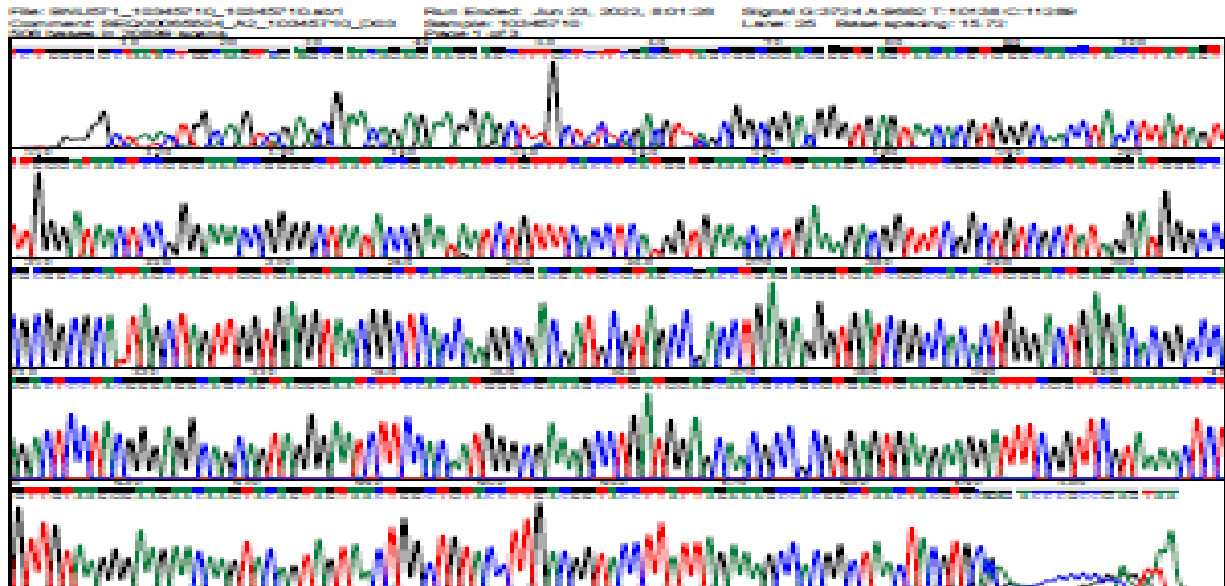


Séquençage du germe provenant de E6

Annexes



Séquençage du germe provenant de E8



PUBLICATIONS

Characterization of Psychrophilic Pathogens in Ready-to-eat Salads Sold in Supermarkets in the City of Abidjan (Côte d'Ivoire)

N'Goran Parfait N'Zi^{1,2}, Hadja Djénéba Ouattara³, Yao Paul Attien¹,
Valérie Carole Gbonon², Nathalie Kouadio Guessenn², Djédoux Maxime Angaman^{1,*}

¹Department of Biochemistry-Microbiology, Agrovalorization Laboratory, Jean Lorougnon Guédé University, Daloa, Côte d'Ivoire

²Department of Bacteriology-Virology, National Reference Center for Antibiotics, Pasteur Institute, Abidjan, Côte d'Ivoire

³Laboratory of Biotechnology, Agriculture and Valorization of Biological Resources, Biotechnology Unit, Felix HOUPOUET-BOIGNY University, Abidjan, Côte d'Ivoire

*Corresponding author: angaman@ujlg.edu.ci

Received XX; Revised XXXX; Accepted XXXX

Abstract Ready-to-eat salads have become highly demanded foods in the city of Abidjan (Côte d'Ivoire) because of their considerable benefits both nutritionally and therapeutically. However, these foods are considered products that are very vulnerable to microbial contamination. In order to contribute to food safety in Côte d'Ivoire, in particular among the Abidjan population, we have set the objective of inventorying psychrophilic pathogenic species in ready-to-eat salads sold in supermarkets. Thus, a total of 60 samples were analyzed using the techniques of classical microbiology, molecular biology, bioinformatics and statistics. For the search for psychrophilic pathogens, the selective culture medium (Oxford agar) of the pathogens frequently isolated (*L. monocytogenes*) was used. Microbiological analyzes revealed the presence of similar germs in 6 samples based on growth characters with Oxford's selective medium. However, molecular sequencing allowed to identify six (6) different pathogens, *Lysinibacillus fusiformis* in spinach salads (EP), *Listeria monocytogenes* in mixed salads (SCOM), *Staphylococcus saprophyticus* in lamb's lettuce and arugula, *Staphylococcus fleurettii* in carrots (SCA), *Staphylococcus nepalensis* in young shoots (JP) and *Bacillus cereus* in cabbage (SCH). The growth kinetics showed the characterized species grow significantly in the different lettuces under domestic storage conditions after opening the packaging except for *S. fleurettii*. However, the growth of *L. fusiformis* and *B. cereus* was found to be more significant. In conclusion, *S. saprophyticus*, *S. nepalensis*, *B. cereus*, *L. fusiformis* and *B. cereus* grow easily on oxford agar presenting similar culture characters like *L. monocytogenes*. In addition, the presence of unknown pathogenic species in ready-to-eat salads and their significant growth during the domestic storage period is a real public health problem. It would therefore be wise for the health authorities to set up a monitoring program for these species in the ready-to-eat sold in supermarkets in Côte d'Ivoire.

Keywords: ready-to-eat salads, psychrophilic pathogens, Abidjan (Côte d'Ivoire)

Cite This Article: N'Goran Parfait N'Zi, Hadja Djénéba Ouattara, Yao Paul Attien, Valérie Carole Gbonon, Nathalie Kouadio Guessenn, and Djédoux Maxime Angaman, "Characterization of Psychrophilic Pathogens in Ready-to-eat Salads Sold in Supermarkets in the City of Abidjan (Côte d'Ivoire)." *Journal of Food Security*, vol. 10, no. x (2022): XX-XX. doi: xxxxxxxx.

1. Introduction

The consumption of ready-to-eat salads has gained momentum in developed countries nowadays, which could be justified by the simple fact that these foods are perceived by consumers as fresh, safe, nutritious, healthy products and socially appreciated [1,2,3]. However, despite the cold chain recommended as a condition for preserving these pre-cleaned fresh products, which are mainly packaged and ready-to-consume without prior preparation or cooking [4], their health safety is not always guaranteed [5]. Indeed, ready-to-eat salads have

been a veritable reservoir of pathogenic microorganisms throughout the world [6,7,8,9]. Based on currently available statistics, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) is one of the most important ready-to-eat food-associated pathogens. This bacteria is a psychrophilic bacteria and responsible for Listeriosis, the 3rd cause of death from food-borne illnesses with a lethality rate from 20 to 30% and a very high hospitalization rate (> 97%), generating high patient care costs [10]. In addition, the presence of this bacteria in these products has been reported in several countries, with the detection of rate ranging from 0.6 to 9.1% [11]. However, the consumption of these salads is becoming more and more important in Côte d'Ivoire and raises concerns because the work of [12] described a

significant evolution of psychrophilic bacteria in ready-to-eat salads sold in Abidjan' supermarkets. But data on the psychrophilic pathogenic species present in these foods sold in Abidjan are unknown. During 2021 and 2022, 60 samples of 20 types of salads were analysed in order to provide information to Ivorian health authorities on the presence of psychrophilic pathogens in ready-to-eat salad samples and to ascertain the risk of these products for consumers.

2. Materials and Methods

The biological material consisted of 20 types of ready-to-eat salads composed of fruits or vegetables. These are salads packaged in transparent bags (500 g) or in trays (125 g) made of polyethylene terephthalate (PET) plastic. These salads are of various origins and sold in supermarkets in the city of Abidjan (Côte d'Ivoire). In total, 60 samples were evaluated.

The microorganisms sought are psychrophilic bacterial pathogens, in particular *Listeria monocytogenes*, and other pathogens capable to develop on the oxford medium. The search for these microorganisms has been possible thanks to several techniques of classical microbiology and molecular biology..

2.1. Microbiological Study

The search for *L. monocytogenes* and other psychrophilic pathogens was carried out by counting in accordance with the ISO 11290-2 standard. In fact, all the samples were subjected to enrichment in liquid medium with ½ Fraser broth incubated at 30°C for 24 hours. Next, the selective enrichment culture underwent a decimal dilution series up to 10⁻³. Then 0.1 mL of each dilution was inoculated on the Oxford medium and incubated at 37°C for 24 to 48 hours. The colonies enveloped in black halos were counted then the average concentration or bacterial load was reported according to the ISO 7218 (2007) standard. Three colonies of each strain were isolated on the same selective medium (Oxford) to check compliance between the different strains isolated. Finally, purification by subculture of the strains was carried out on Luria Bertani (LB) agar followed by Gram staining.

2.2. Molecular Characterization of Psychrophilic Pathogens

2.2.1. Preparation of Cell Extract

The preparation of the cell extract in an Eppendorf tube containing 100 µL of distilled water was carried out by diluting a colony in the Eppendorf tube with 1.5 µL. Then a 1/50th dilution was performed.

2.2.2. PCR Amplification

The method used is colony PCR. It consisted of amplified hypervariable regions of the 16S gene which is about 500 bp. The universal primers used are F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and R520 (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3') [15]. The reaction mixture

consisted of 15 µL sterile H₂O; 25 µL of 2X Phusion Master Mix; 2.5 µL primer F; 2.5 µL primer R; 5 µL of cell extract. The amplification was carried out according to this program: an initial denaturation at 95°C for 4 min then 35 reaction cycles; each cycle includes a denaturation phase at 95°C for 1 min, an annealing phase at 54°C of the primers for 1 min and an elongation phase at 72°C for 1 min. These 35 cycles are followed by a final extension of 10 min at 72°C.

In order to purify the PCR products, a centrifugation for 1 min at 13000 g was performed after adding the elution buffer (30 µL) of purification kit (OMEGA bio-tek E.Z.N.A. Gel Extraction Kit).

2.2.3. Sequencing

Sequencing was performed at Paul Sabatier University (Toulouse, France) with the BigDyeV3.1 Dye Terminator kit (Thermo Fisher Scientific). The sequences were then purified with the BigDyeXterminator kit (Thermo Fisher Scientific) before being analyzed on the ABI3730XL 96 capillary sequencer (Thermo Fisher Scientific).

2.2.4. Bioinformatics and Statistical Analysis

The significance of the evolution of bacterial loads as a function of storage time was assessed using analyzes of variance (ANOVA) at 5% threshold by Rcmdr package of R software [16]. However, the DNA sequences obtained were compared to homologous sequences contained in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) sequence database using the Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) program <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [17]. The overall alignment of these sequences was carried out thanks to Clustal omega with the Jalview software and the phylogenetic tree on the MEGA11 software.

3. Results

3.1. Cultural and Morphological Characteristics of Presumptive Psychrophilic Pathogens

The microbiological analyzes showed contamination of six (6) types of salads samples by microorganisms with substantially the same cultural characteristics. These are spinach (Ep), lamb's lettuce+arugula (MR), young shoots (JP), cabbage (SCH), carrot (SCA) and mixed salad (SCOM) salads. The colonies of these microbial germs were all surrounded by a black halo which is an identical characteristic to *Listeria monocytogenes* on this culture medium. Indeed, on the oxford medium, *Listeria monocytogenes* presents small greenish colonies surrounded by a black halo. However, the colonies obtained on this medium after culturing, although surrounded by black halos, showed various shapes and colors. The isolation of these bacterial strains on Oxford agar clearly shows (Figure 1) the presence of non-identical strains. Thus, based on morphological identification, Gram staining confirmed the presence of Gram-positive *Bacilli* and Gram-positive *Cocci* (Figure 2).

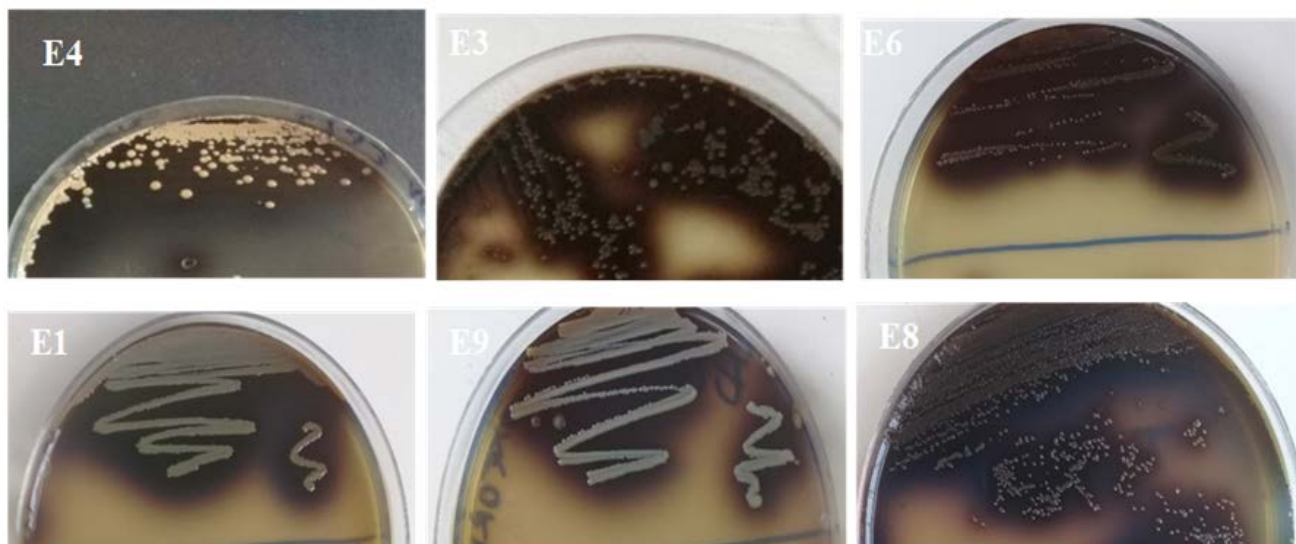


Figure 1. Cultural aspects of psychrophilic pathogens on Oxford agar. E1: Spinach (EP); E3: Lamb's lettuce+arugula (MR); E4: Young shoots (JP); E6: Carrots (SCA); E8: Mixed salad (SCOM); E9: Cabbage (SCH)

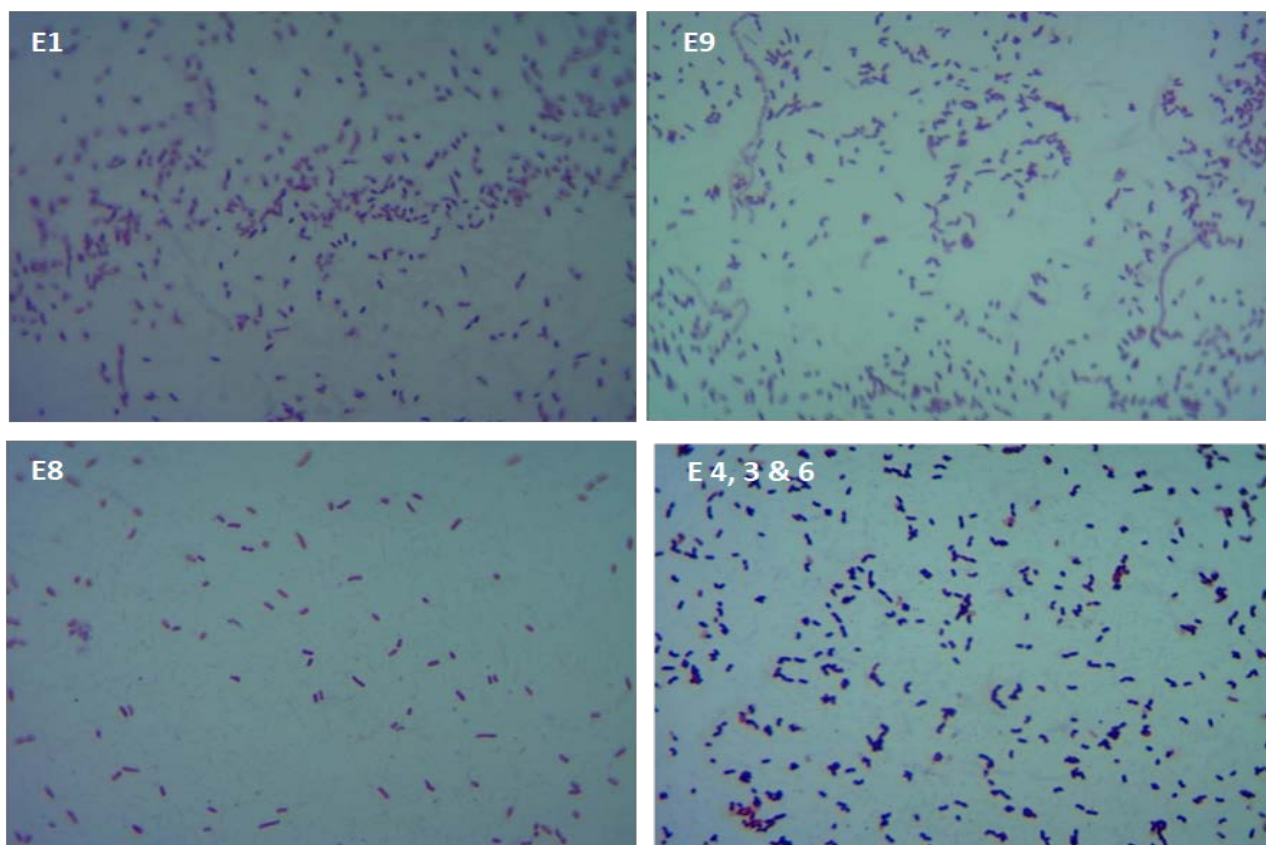


Figure 2. Morphological characteristics of suspected psychrophilic pathogens isolated on oxford agar. E1: Spinach (EP); E3: Lamb's lettuce+arugula (MR); E4: Young shoots (JP); E6: Carrots (SCA); E8: Mixed salad (SCOM); E9: Cabbage (SCH)

3.2. Molecular Identification of Psychrophilic Pathogen Strains

The results observed on the electrophoretic profile of the amplification product in Figure 3 showed that the hypervariable regions of 16S rRNA (500 bp) have been amplified. In addition, the analysis of the sequencing made it possible to identify the different bacterial species isolated from the ready-to-eat salads. Similarity, E-value, maximum score, query's coverage rates are recorded in Table I. It emerges that the strain isolated from the Ep

salads is a *Lysinibacillus fusiformis*, that of the MR salads is a strain of *Staphylococcus saprophyticus*, that of the JPs was the species *Staphylococcus fleurettii*. As for the SCA salads, they were contaminated by *Staphylococcus nepalensis*, those of SCH were contaminated by *Bacillus cereus* and SCOM by *Listeria monocytogenes*. To better appreciate the areas of similarity between the different species, a multiple alignment was performed between the sequences obtained after sequencing through the Clustal Omega algorithm with the default parameters (Figure 4). Thus, the phylogenetic tree produced through a BLAST

between the sequences of the different characterized species made it possible to determine the coefficients of similarity between these strains on the hypervariable regions of the 16S rRNA (Figure 5). The tree revealed that on the hypervariable regions of this gene the different pathogens identified can be grouped into three (3) classes,

the first of which includes the 3 three species of the genus *Staphylococcus sp* which showed strong homology varying between 93 and 99%. The second presents a homology between *Lysinibacillus fusiformis* and *Listeria monocytogenes* (58%) and the 3rd class contains *Bacillus cereus* which is different from all of the characterized species.

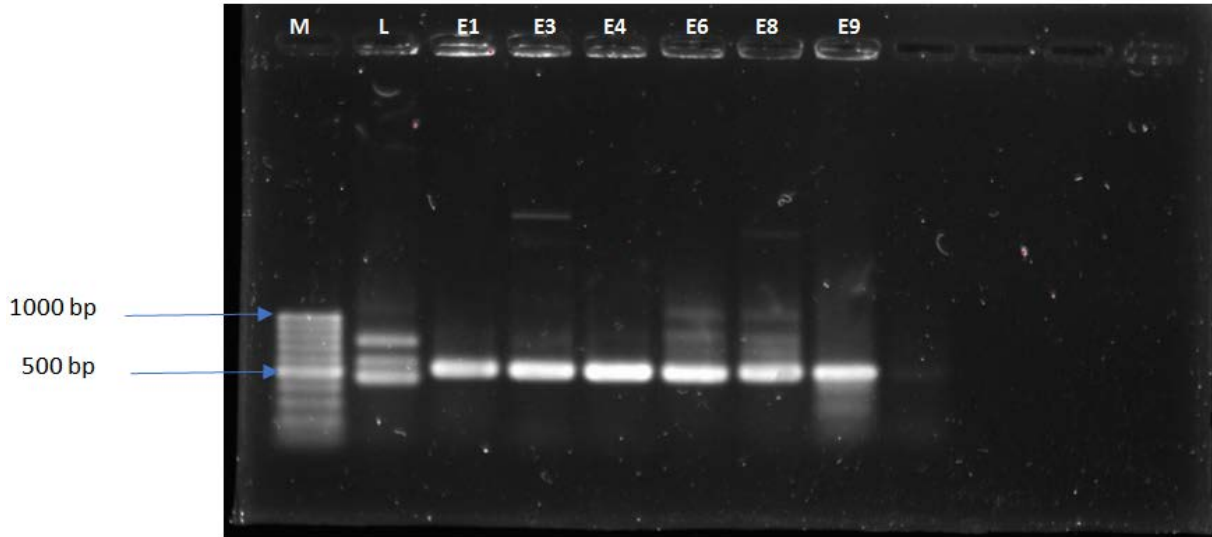


Figure 3. Electrophoretic profile of 16S rRNA amplification product (500 bp) of psychrophilic pathogen strains (M: Molecular marker (100 bp); L: Lactobacillus, E1: Spinach (EP); E3: Lamb's lettuce+arugula (MR); E4: Young shoots (JP); E6: Carrots (SCA); E8: Mixed salad (SCOM); E9: Cabbage (SCH))

Table 1. Similarity between the different sequences of the isolated pathogens and the catalogue species

Samples	Species	Max score	Query cover	E. value	Per.Iden	Accession number
Ep (E1)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	817	98 %	0,0	100,0 %	JN624748.1
MR (E3)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	800	98%	0,0	99,77%	CP054575.1
JP (E4)	<i>Staphylococcus fleurettii</i>	822	94%	0,0	97,72%	MN758802.1
SCA (E6)	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	830	96%	0,0	97,54%	AB697721.1
SCOM (E8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	257	99 %	3e-64	96,75 %	OK644491.1
SCH (E9)	<i>Bacillus cereus</i>	822	98%	0,0	99,56%	KF025653.

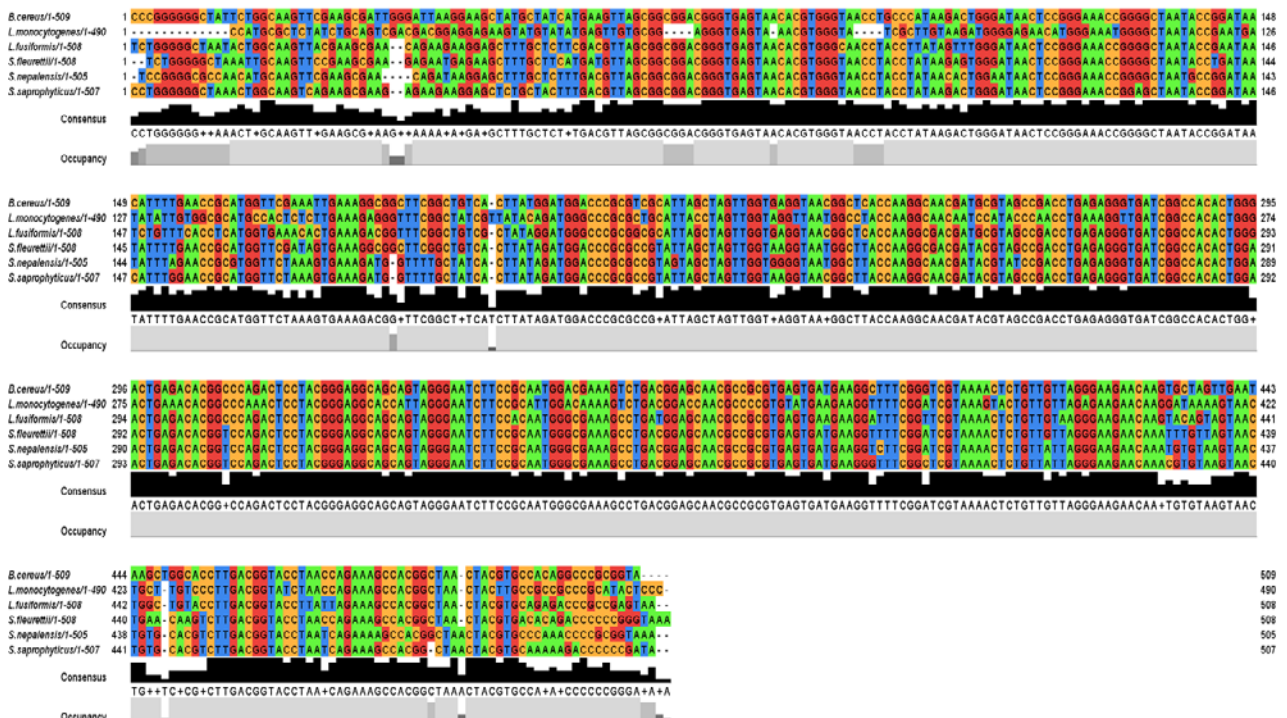


Figure 4. Multiple sequences alignment of microorganisms isolated from salads

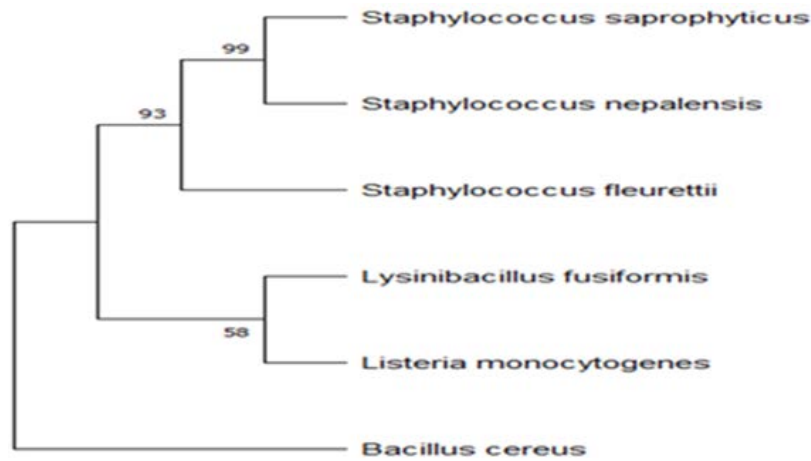


Figure 5. Phylogenetic tree of identified species

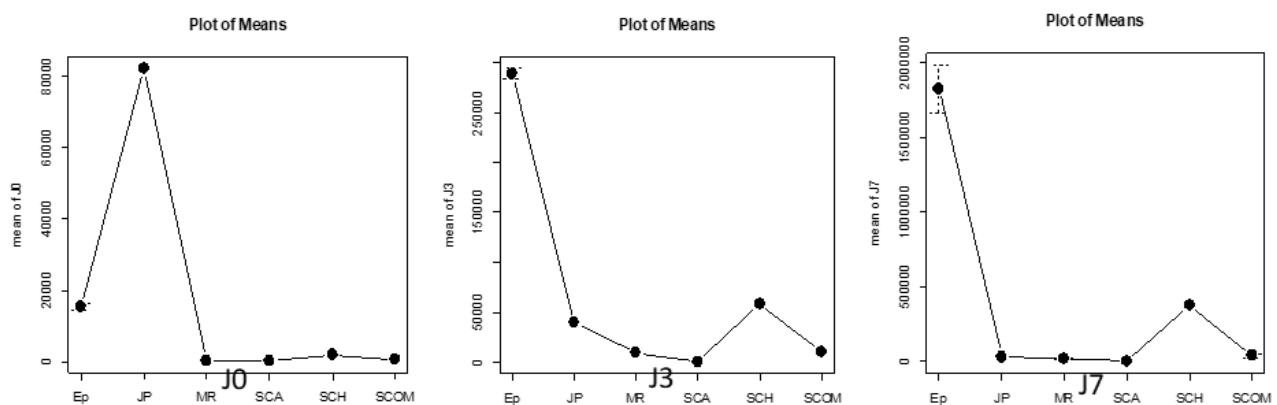


Figure 6. Growth of bacterial species as a function of domestic storage time of salads after opening the packaging. (Ep: Spinach, MR: Lamb's lettuce + arugula, JP: Young shoots, SCA: Carrot salads, SCH: Cabbage salads, SCOM: Mixed salads)

3.3. Kinetics of Identified Bacterial Species as a Function of Domestic Storage Time after Opening the Packaging

Upon opening the packaging, samples of ready-to-eat salads collected for searching psychrophilic pathogens were contaminated. The results obtained from the count after opening the packaging and during storage time at 7°C made it possible to evaluate the evolution of the different bacterial species. In general, the average pathogen loads vary between $2.80 \cdot 10^2 \pm 0$ and $8.20 \cdot 10^4 \pm 0$ CFU/g at the first day (J0). At the third day (J3) of analysis, the loads are between $9.00 \cdot 10^2 \pm 0$ and $2.89 \cdot 10^5$ CFU/g. At the seventh day (J7), the loads are of the order of $1.32 \cdot 10^3 \pm 2.80 \cdot 10^2$ to $1.82 \cdot 10^6 \pm 2.75 \cdot 10^5$ CFU/g. In accordance with the statistical analyzes of variance (one-way ANOVA), there was a significant evolution of the microorganisms in ready-to-eat salads during the storage period despite the cold chain as storage method (Figure 6). But this growth was found to be positively more significant in *Lysinibacillus fusiformis* in Ep and *Bacillus cereus* in SCH. However, a considerable decrease in average load was observed in *Staphylococcus fleurettii* in JP. Concerning *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus nepalensis*, their evolution was substantially identical during the storage period. Indeed, these bacteria clearly developed during cold storage. It follows from these analyzes that the domestic storage temperature is favorable to the growth of all characterized

bacterial species except *Staphylococcus fleurettii*. However, *Lysinibacillus fusiformis* and *Bacillus cereus* show more significant growth at home storage temperature.

4. Discussion

During this study we searched for *Listeria monocytogenes* and also shed light on the presence of other pathogens capable of growing at domestic refrigeration temperature on Oxford agar. This culture medium made it possible to highlight in six samples of ready-to-eat salads, microorganisms showing similar cultural characteristics to *Listeria monocytogenes*. However, the molecular characterization revealed the presence of different pathogenic species even if among these, the pathogenic power of some is unknown. These include *Listeria monocytogenes*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus fleurettii* and *Staphylococcus nepalensis*. Indeed, these different species, on the basis of the cultural characteristics presented a black halo around the colonies on the Oxford culture medium as *Listeria monocytogenes*. This precipitate around the colonies would provide information on the probable presence of an esculinase within these microorganisms which makes it possible to catalyze the hydrolysis of the esculin present in the medium into esculetin and glucose. Consequently, the product, through its phenol function, esculetin reacts with the Fe^{3+} of the

iron citrate contained in the medium and forms a brown or black precipitate [18]. This precipitate darkens the medium surrounding the growing colonies. Biochemical tests for enterococci such as the genus *Bacillus* show a positive reaction to esculin (esculin +) [19]. However, the presence of these microorganisms on Oxford base could reflect resistance of these bacteria to inhibitors such as the three antibiotics (colistin, cefotetan and fosfomicin) incorporated into the medium.

In this study, the species *L. monocytogenes* was identified in mixed salads (SCOM) containing lettuce, tomatoes, green beans, corn, carrots, peas, cabbage, ham and egg. This contamination would probably come from the primary or secondary source of production, in this case the association of meat products (ham and egg). Indeed, this species is a pathogen of environmental origin frequently found in irrigation water, soil, vegetation and the excrement of farm animals. According to [20], recycled wastewater includes the potential to transport this foodborne pathogen if the water is not treated properly or if the treatment process is not validated. [21] also showed in South Africa that *L. monocytogenes* strains identified in surface water were recovered from vegetables. It was also published in an update review of *L. monocytogenes* in the pork meat industry and its products in France, that the prevalence of this bacterium generally increases from the farm to the manufacturing plants due to the cross contamination [22]. Indeed, according to these authors, *L. monocytogenes* can survive and/or develop despite the obstacles during the manufacturing and storage processes. [23] isolated *L. monocytogenes* strains from two ready-to-eat meat processing plants in Shanghai Municipality, China, from 2019-2020 using pulsed-field gel electrophoresis and whole genome sequencing. These results are in agreement with ours because they would justify the source of contamination of our ready-to-eat salads by this bacterial pathogen. Therefore, the presence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat salads that do not undergo heat treatment before consumption is a real problem for Côte d'Ivoire. Because this germ is responsible for listeriosis and despite its low morbidity, this disease has a high mortality rate due to the severity of its clinical manifestation. While the source of human listeriosis is often uncertain [24].

In addition to *L. monocytogenes*, *B. cereus* is also known for its worrying pathogenic power for humans and is regularly found in food products. *B. cereus* has been recognized as the most frequently detected foodborne pathogen in fresh-cut salads in Korea [25]. Our results are similar to those obtained by [26]. Indeed, these authors during a study carried out on the evaluation of *B. cereus* contamination of local vegetables in Obosi in Nigeria detected the presence of this pathogen in cabbage samples. The presence of this species in samples of ready-to-eat salads sold in supermarkets in the city of Abidjan does not guarantee food safety for consumers because *B. cereus* is a new emerging pathogen widely isolated from animal feed, and food chains and the direct consequence of which could be a huge economic loss for the animal industry and a high risk for human health [27].

Also, Coagulase Negative Staphylococcus (CNS) inhabit various ecological habitats, between the environment and the host, the environment of dairy farms, on the skin and

mucous membranes of cattle. They are also the most widespread bacteria whose reservoirs and transmission routes have not yet been fully elucidated [28,29]. During this study a *S. saprophyticus* strain was isolated as well as other species of *Staphylococcus* such as *Staphylococcus fleurettii* and *Staphylococcus nepalensis*. Indeed, although *S. aureus* is the species responsible for food poisoning regularly isolated from food, *S. saprophyticus* is an important pathogen responsible for community-acquired urinary tract infections. In addition for composing the human microbiota, this species is widely distributed in the environment and the origins of this organism for human infection are not fully characterized [30]. Some researchers have already detected in ready-to-eat foods as in our case. Thus, [31] in Taiwan, isolated more than 10 species of *Staphylococcus sp* in ready-to-eat foods, in which *S. saprophyticus* appeared in all categories. This species was also identified during the screening of community microbes associated with endive salad during post-harvest processing on an industrial scale by [32], in Germany. In addition to this species, *Staphylococcus fleurettii* (*S. fleurettii*) is a new species of the genus *Staphylococcus* which is coagulase-negative and resistant to novobiocin. This species is differentiated from other staphylococci by its resistance to novobiocin on the basis of ribotype and intergenic transcriptional spacer, DNA-DNA reassociation reactions, cell wall composition and phenotypic characteristics [33]. However, the isolation of *S. nepalensis* is sporadic and the first report of the presence of this species in human clinical material as well as in other sources was made by [34]. Furthermore, an instructive case of *S. nepalensis* bacteremia in a 71-year-old man who presented with Boerhaave syndrome after a meal was reported by [35]. The presence of this species in ready-to-eat salads is therefore not a guarantee for food safety. Coagulase-negative species of the genus *Staphylococcus* would be of capital interest in the study and control of foods with a view to ensuring food security in Côte d'Ivoire.

In spinach salads, the presence of *L. fusiformis* would provide information on poor cultural practices in the production of this vegetable from the field. This contamination could also come from the soils on which these vegetables were grown. Indeed, this species is considered to be a natural bacterium, isolated in environmental samples, wastewater from factories and agricultural soils. It produces dormant, non-reproductive, spherical endospores that can withstand desiccation, high temperatures, and ultraviolet radiation and can survive for long periods causing severe sepsis due to persistent bacteremia, tropical ulcers, and respiratory disease in man [36]. Although it has been identified in endive salads during post-harvest processing on an industrial scale by [32], in Germany, its presence in the food chain remains rare. However, this species must be taken into account in food security programs because serious cases of persistent bacteremia have been reported in recent years in 2022 [37].

In addition, the species identified in ready-to-eat salads, samples are mostly rare in the bacterial ecosystem of Côte d'Ivoire and the existence of certain poorly described species in food products has led to a determination of the kinetics of their growth during domestic conservation. Thus, a significant evolution of these bacteria in ready-to-

eat salads was observed. *L. monocytogenes*, *S. nepalensis* and *S. saprophyticus* developed significantly in mixed salads (SCOM), carrots (SCA) and lamb's lettuce+arugula (MR), respectively. As *S. fleurettii*, it was inhibited during storage. The evolution of growth was found to be greatest in *L. fusiformis* and *B. cereus* respectively in the salads of EP and SCH. According to [38], *B. cereus* will grow in most foods under favorable conditions of pH (4.5 to 9.5), water activity (>0.93) and temperatures of 4 to 48°C. Then, its spores have the ability to survive to common food treatments like temperature storage. The growth of this pathogen was found to be significant in our cabbage samples (SCH) whose pH is 6.80±0.57. This increase in *L. fusiformis* and *B. cereus* suggests that it is related to their spores. However, the growth behavior of *L. monocytogenes* during the storage time of ready-to-eat salads studied by [39] varied depending on the temperature and type of lettuce product. Also, work done on shelf life on ready-to-eat pre-cut iceberg lettuce packaged in a modified atmosphere [40] has shown that *L. monocytogenes* can easily grow in this product at a temperature of 4°C. Consequently, the slow growth of this bacteria at the temperature of 7°C in the mixed salads makes it possible to understand that the growth of these microorganisms could depend not only on the storage conditions but also on the extrinsic and intrinsic composition of the different lettuces.

5. Conclusion

During this study the search of psychrophilic microorganisms through the oxford medium resulted in the identification of 6 bacterial species. These include, among others, *L. monocytogenes*, *L. fusiformis*, *B. cereus*, *S. nepalensis*, *S. fleurettii* and *S. saprophyticus*. In addition, *L. fusiformis* and *B. cereus* species developed very significantly respectively in spinach salads (EP) and cabbage salads (SCH) at domestic storage temperature (7°C). *L. monocytogenes*, *S. nepalensis* and *S. saprophyticus* developed significantly in mixed lettuces (SCOM), carrots (SCA) and lamb's lettuce+arugula (MR), respectively. However, *S. fleurettii* was inhibited by storage temperature. In short, ready-to-eat salads sold in supermarkets of the city of Abidjan harbor unknown highly pathogenic species which develop very quickly under domestic storage conditions (7°C) after opening the packaging.

Acknowledgements

The authors thank Profs. Caroline Conte, Eric Lacazette, Vincent Ecochard and Mr. Simon Marques from Paul Sabatier University (Toulouse, France) for their precious assistance in the sequencing of our samples.

References

- [1] Rico, D., Martin-Diana, A. B., Barat, M. and Barry-Ryan, C. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables A Review Trends in Food Science and Technology, 18, 373-386, 2007.
- [2] De Corato, U. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60, 940-975, 2020.
- [3] Lorente-Mento, J. M., Valverde, J., Serrano, M. and Pretel, M. T. 2022. Fresh-Cut Salads: Consumer Acceptance and Quality Parameter Evolution during Storage in Domestic Refrigerators. Sustainability, 14, 3473, 2022.
- [4] Paudyal, N., Anihouvi, V., Hounhouigan, J., Matsheka, M. I., Sekwati-Monang, B., Amoa-Awua, W., Atter, A., Ackah, N. B., Mbugua, S., Asagbra, A., Abdelgadir, W., Nakavuma, J., Jakobsen, M. and Fang, W. Prevalence of Foodborne Pathogens in Food from Selected African Countries - A Meta-Analysis. International Journal of Food Microbiology, 249, 35-43, 2017.
- [5] N'Zi, N. P., Angaman, D. M., Gbonon, V. C. and Tiekoura, K. B. Etude de la qualité microbiologique des salades de 4ème gamme vendues dans des supermarchés de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire) durant la période de conservation domestique après ouverture des emballages, International Journal of Innovation and Applied Studies, 36 (2), 577-587, 2022.
- [6] Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B. N., Greiner, R. and Roohinejad, S. Microbiological Contamination of Ready-to-Eat Vegetable Salads in Developing Countries and Potential Solutions in the Supply Chain to Control Microbial Pathogens. Food Control, 85, 235-44, 2018.
- [7] Allende, A., Aguayo, E. and Artés, F. Microbial and Sensory Quality of Commercial Fresh Processed Red Lettuce throughout the Production Chain and Shelf Life. International Journal of Food Microbiology, 91 (2), 109-17, 2004.
- [8] Tian, J. Q., Bae, Y. M., Choi, N.Y., Kang, D. H., Heu, S. and Lee, S. Y. Survival and Growth of Foodborne Pathogens in Minimally Processed Vegetables at 4 and 15 °C. Journal of Food Science, 77 (1), 48-50, 2012.
- [9] Becker, B., Stoll, D., Schulz, P., Kulling, S. and Huch, M. Microbial Contamination of Organically and Conventionally Produced Fresh Vegetable Salads and Herbs from Retail Markets in Southwest Germany. Foodborne Pathogens and Disease, 16 (4), 269-75, 2019.
- [10] Churchill, K. J., Sargeant, J. M., Farber, J. M. and O'connor, A. M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Select Ready-to-Eat Foods Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Food Protection, 82 (2), 344-57, 2019.
- [11] Chen, M., Chen, Y., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Li, F., Zeng, H., Lei, T., Pang, R., Ye, Q., Bai, J., Xianhu, J. W., Wei., Zhang, Y. and Ding, Y. Genetic characteristics and virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh vegetables in China. BMC Microbiology 19 (1), 119, 2019.
- [12] Angaman, D. M., N'zi, N. P. and Gbonon, V. C. Kinetics of Microorganisms in Ready-To-Eat Salads Stored at 4°C Sold in Supermarkets in the City of Abidjan, Côte d'Ivoire. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 10 (03), 1984-1992, 2021.
- [13] ISO 11290-2:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 2: Enumeration method.
- [14] ISO 7218: 2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.
- [15] Ouattara, H. G., Revercho, n S. and Niamke, S. L., Nasser W. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation. Food Microbiology, 28, 1-8, 2011.
- [16] Boko A.C.E. and Angaman D. M. Evaluation de L'entomophagie dans Quatre Grandes Villes de Côte d'Ivoire. European Scientific Journal, 17(37), 1, 2021.
- [17] Boumba, A. E. L., Lebonguy, A. A., Chancelvy, P. L. P., Moukala, M. B. and Goma-Tchimbakala, J. Hygienic Quality of Fermented Pepper Sold in the Markets of Brazzaville. Journal of Food Security, 10 (1), 17-24, 2022.
- [18] Sapkota A. Esculin Hydrolysis Test- Principle, Procedure, Results, Uses. Microbe Notes, 2022.
- [19] Baatouche Amina M. Synthèse bibliographique sur caracteres et methodes bacteriologiques horizontales pour denombrement des

- especies *Listeria monocytogenes* dans les denrees alimentaires. 2021.
- [20] Gartley, S., Brienna, A. C, Manan S. and Kalmia, E. K. *Listeria Monocytogenes* in Irrigation Water: An Assessment of Outbreaks, Sources, Prevalence, and Persistence. *Microorganisms*, 10 (7), 13-19, 2022.
- [21] Ijabadeniyi, Oluwatosin A., Buys, E.M., Debusho, L. K., Van der Linde, and Michael J. Irrigation Water as a Potential Preharvest Source of Bacterial Contamination of Vegetables. *Journal of Food Safety* 31 (4), 452-61, 2011.
- [22] Thévenot, D., Dernburg, A. and Vernozy-Rozand, C. An Updated Review of *Listeria Monocytogenes* in the Pork Meat Industry and Its Products. *Journal of Applied Microbiology* 101 (1), 7-17. 2006.
- [23] Zhang, H., Wang, J., Chang, Z., Liu, X., Chen, W., Yu, Y., Wang, X., Dong, Q., Ye, Yulong, and Zhang, X. *Listeria monocytogenes* Contamination Characteristics in Two Ready-to-Eat Meat Plants From 2019 to 2020 in Shanghai. *Frontiers in Microbiology*, 12, 729-114. 2021.
- [24] Tanui, C. K., Benefo, E. O., Karanth, S. and Pradhan, A. K. Machine Learning Model for Food Source Attribution of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens* 11 (6), 691, 2022.
- [25] Kim, H. J., Koo, M., Hwang, D., Choi, J. H., Kim, S. M. and Se-Wook Oh. Contamination Patterns and Molecular Typing of *Bacillus Cereus* in Fresh-Cut Vegetable Salad Processing. *Applied Biological Chemistry* 59 (4), 573-77, 2016.
- [26] Mgbakogu, R. A. and Eledo, B. O. Studies on Urinary Tract Infection among Diabetics in Some Eastern States of Nigeria. *Advances in Life Science and Technology*, 34, 4246. 2015.
- [27] Haque, M. D., Quan, H., Zuo, Z., Khan, A., Siddique, N. and Cheng H. Pathogenicity of Feed-Borne *Bacillus Cereus* and Its Implication on Food Safety. *Agrobiological Records*, 3, 1-16, 2020.
- [28] De Visscher A., Supré K., Haesebrouck F., Zadoks R.N., Piessens V., Van Coillie E., Piepers S. & De Vlieghe S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 466-474, 2014.
- [29] Piccart K., Verbeke J., De Visscher A., Piepers S., Haesebrouck F. & De Vlieghe S. Local host response following an intramammary challenge with *Staphylococcus fleurettii* and different strains of *Staphylococcus chromogenes* in dairy heifers. *Veterinary Research*, 47(1), 56, 2016.
- [30] De Paiva-Santos, W., De Sousa, V. S. and De Marval, M. G. Occurrence of Virulence-Associated Genes among *Staphylococcus Saprophyticus* Isolated from Different Sources. *Microbial Pathogenesis*, 119, 9-11, 2018.
- [31] Wang, Y. T., Lin, Y. T., Wan, T. W. Wang, D. Y., Lin, H. Y. Lin, C. Y., Chen, Y. C. and Teng, L. J. Distribution of Antibiotic Resistance Genes among *Staphylococcus* Species Isolated from Ready-to-Eat Foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27 (4), 841-48, 2019.
- [32] Fröhling, A., Rademacher, A., Rumpold, B., Klocke, M. and Schlüter, O. Screening of Microbial Communities Associated with Endive Lettuce during Postharvest Processing on Industrial Scale. *Heliyon*, 4 (7), 00671, 2018.
- [33] Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Meugnier H., Bes M., Lasne Y., Fiedler F., Etienne J. and Freney J. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1521-1527, 2000.
- [34] Nováková D., Pantůček R., Petrás P., Koukalová D. & Sedláček I. Occurrence of *Staphylococcus nepalensis* strains in different sources including human clinical material. *FEMS microbiology letters*, 263(2), 163-168, 2006.
- [35] Hosoya S., Kutsuna S., Shiojiri D., Tamura S., Isaka E., Wakimoto Y., Nomoto H. & Ohmagari N. *Leuconostoc lactis* and *Staphylococcus nepalensis* Bacteremia, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9), 2283-2285, 2020.
- [36] Sulaiman, I. M., Hsieh, Y. H., Jacobs, E., Miranda, N., Simpson, S. and Kerdahi, K. Identification of *Lysinibacillus fusiformis* Isolated from Cosmetic Samples Using MALDI-TOF MS and 16S RRNA Sequencing Methods. *Journal of AOAC International*, 101 (6), 1757-62, 2018.
- [37] Morioka H., Oka K., Yamada Y., Nakane Y., Komiya H., Murase C., Iguchi M. & Yagi T. *Lysinibacillus fusiformis* bacteremia: Case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 28(2): 315-318, 2022.
- [38] Rodrigo, Dolores, Cristina M. Rosell, et Antonio Martinez. Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods* 10 (2), 302, 2021.
- [39] Alegbeleye, O. and Sant'Ana, A. S. Survival and Growth Behaviour of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Vegetable Salads. *Food Control*, 138, 109023. 2022.
- [40] Tucci, P., Centorotola, G., Salini, R., Iannetti, L., Sperandii, A. F., D'Alterio, N., Migliorati, G. and Pomilio, F. Challenge test studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Science & Nutrition*, 7 (12): 3845-52, 2019.



Etude de la qualité microbiologique des salades de 4^{ème} gamme vendues dans des supermarchés de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire) durant la période de conservation domestique après ouverture des emballages

[Study of the microbiological quality of 4th range salads sold in supermarkets in the city of Abidjan (Côte d'Ivoire) during the domestic conservation period after opening the packaging]

N'Goran Parfait N'Zi^{1,2}, Djédoux Maxime Angaman¹, Valérie Carole Gbonon², and And Konan Bertin Tiekoura²

¹Département de Biochimie-Microbiologie, Laboratoire d'Agrovalorisation, Université Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

²Département de Bactériologie-Virologie, Centre National de Référence des Antibiotiques, Institut Pasteur, 01 BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Copyright © 2022 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The consumption of salads of the fourth range (4th range) has become increasingly worrying in Abidjan (Côte d'Ivoire). This work was undertaken to determine the microbiological status of these foods during the period of domestic conservation (7°C) after opening the packaging in order to prevent the risk of intoxication from bacterial pathogens. The material and methods used for the microbiological analyses refer to the techniques of classical microbiology followed by statistical tests through R4.1.2 and excel software. The results obtained showed that the 4th range salads sold in the hypermarkets of the city of Abidjan were highly contaminated by bacterial pathogens such as *S. aureus* with a prevalence of 24%, *E. coli* O157: H7 with 16% and *Salmonella* spp. with 18%. On opening the packages (D0), 63.43% of the salads were unfit for consumption, 5% had an acceptable load and 31.57% were of satisfactory microbiological quality. On the third day (D3), the rate of salads unfit for consumption increased (68.43%). On the seventh day (D7), the microbiological quality was the same as on the third day. However, the Salads of the Green Oaks (SChV) and the Meli melo salads (SMel), with perforated packaging were more conducive to the growth of the pathogens studied. Domestic refrigeration does not guarantee the safety of 4th range salads after opening the packages.

KEYWORDS: Fourth range, Carriage pathogens, Domestic refrigeration.

RESUME: La consommation des salades de quatrième gamme (4^{ème} gamme) est devenue de plus en plus préoccupante à Abidjan (Côte d'Ivoire). Ces travaux ont été entrepris pour déterminer le statut microbiologique de ces aliments durant la période de conservation domestiques (7 °C) à près ouverture des emballages afin de prévenir les risques intoxications vis-à-vis des pathogènes bactériens de portages. Le matériel et les méthodes utilisés pour les analyses microbiologiques font références aux techniques de la microbiologie classique suivi des tests statistiques à travers les logiciels R4.1.2 et excel. Les résultats obtenus ont montré que les salades de 4^{ème} gamme vendues dans les Hypermarchés de la ville d'Abidjan étaient fortement contaminées par les pathogènes bactériens de portages comme *S. aureus* de prévalence 24 %, *E. coli* O157: H7 de 16 % et *Salmonella* spp. de 18 %. A l'ouverture des emballages (J0), 63,43 % des salades étaient impropres à la consommation, 5 % avait une charge acceptable et 31,57% de qualité microbiologique satisfaisante. Au troisième jour (J3), le taux des salades impropres à la consommation a augmenté (68,43 %). Au septième jour (J7), la qualité microbiologique était de même que celle du troisième jour. Cependant, les Salades des feuilles de Chênes Vertes (SChV) et les salades Meli melo (SMel), avec des

emballages perforés étaient plus propices à la croissance des pathogènes étudiés. La réfrigération domestique ne garantir donc pas la sécurité sanitaire des salades de 4^{ème} gamme après ouverture des emballages.

MOTS-CLEFS: Quatrième gamme, Pathogènes de Portages, Réfrigération domestique.

1. INTRODUCTION

En Côte d'Ivoire, le secteur de la grande distribution des produits alimentaires connaît un essor fulgurant dû au développement d'une classe socioprofessionnelle. Le pays dispose de plus d'une centaine de supermarchés repartis sur l'ensemble du territoire national. Aujourd'hui, les rayons de la plupart des grands supermarchés d'Abidjan sont bondés des produits prêts-à-consommer. Le déménagement vers un mode de vie sain de la population ivoirienne en particulier abidjanaise a fait tourner son régime alimentaire vers celui des pays européens d'où le choix des produits prêts-à-consommer (principalement les salades). En effet, les fruits et les légumes représentent un élément essentiel pour une alimentation saine car ils constituent la principale source de macro et de micronutriments [1]. Ce sont des aliments faibles en gras et en énergie, relativement riches en vitamines, minéraux et d'autres composés bioactifs, en plus d'être une bonne source de fibres [2].

De façon générale, une alimentation riche en fruits et légumes est susceptible de réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de protéger contre certains types de cancer [3]. Ainsi, la consommation de 400 à 600 g de fruits et légumes par jour est recommandée par l'OMS, la FAO et le Fonds Mondial de Recherche contre le cancer [4], [5]. En outre, les salades de 4^{ème} gamme sont une option saine, peu calorique et pratique pour un style de vie contemporain et actif [6]. C'est ainsi que la demande de ces produits par les consommateurs est devenue de plus en plus forte [7].

Cependant, malgré l'application du froid comme mode de conservation, ces produits ont fait l'objet d'une forte contamination par des agents pathogènes d'origine alimentaire dans certains pays africains [8], [9]. De plus, Angaman *et al* [10] ont montré une forte croissance des microorganismes comme la flore aérobie mésophile, la flore aérobie psychrophile et la flore fongique dans les salades de 4^{ème} gamme vendues dans les grands supermarchés de la ville d'Abidjan durant la période de conservation après ouverture des emballages.

La croissance donc de la flore aérobie mésophile donne lieu à l'évaluation de la qualité microbiologique de ces aliments vis à vis des pathogènes bactériens de portage afin de prévenir les risques d'intoxication alimentaire et aussi de combler le déficit d'informations dans la table scientifique ivoirienne.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. MATÉRIEL VEGETAL

C'est une étude expérimentale qui a porté sur des salades de 4^{ème} gamme vendues dans des grands supermarchés de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). En effet, 19 types de salades dont 38 échantillons a raison de 2 échantillons par types de salades ont été analysés.

2.2. MÉTHODES

Elle a concerné la recherche, le dénombrement par intervalle de temps et de l'identification des pathogènes tels que *Escherichia coli* entérohémorragique (*E. coli* O157: H7), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Salmonella spp.*

2.2.1. PRÉPARATION DE MILIEUX DE CULTURES ET DILUTIONS DÉCIMALES

D'abord, une préparation des milieux de cultures a été effectué en fonction des besoins et des germes à rechercher selon la prescription du fabriquant. Ensuite, les suspensions mères et les dilutions décimales ont été réalisées conformément à la norme AFNOR NF V08-010-2.

2.2.2. DÉNOMBREMENT DE SOUCHES BACTÉRIENNES

2.2.2.1. E. COLI O157: H7

Le dénombrement a été réalisé selon la Norme XP ISO/TS 16649-3 par la technique d'ensemencement dans la masse. En effet, une quantité de 1 mL de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-3}) a été ensemencée sur milieu *E. coli* chromogène puis incubée à une température de 44 °C pendant 24 à 48 h. Les colonies caractéristiques ont été dénombrées puis isolées pour identification.

2.2.2.2. S. AUREUS

Les techniques de microbiologie classique selon les normes (NF EN ISO 6888-1 et 2, NF V08-057-1) ont été utilisées. Une quantité de 0,1 mL de chaque solution (10^{-1} à 10^{-4}) a été ensemencée en surface sur milieu gélosé Baird Parker déjà coulé et séché. Après incubation à 37 °C pendant 24 h. Les colonies caractéristiques de *S. aureus* ont été dénombrées puis isolées pour les tests d'identification.

2.2.2.3. SALMONELLA SPP.

La recherche de ce germe a été effectué selon les Normes EN ISO 6579-1. D'abord, un pré-enrichissement été réalisé avec une prise d'essais de 25 g de salade homogénéisée dans 225 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT) puis incubé à 37°C pendant 24 h. Ensuite, un enrichissement sélectif a été réalisé dans du rapport vassilliadis (RV) puis incubé à 44°C pendant 24 h. Après l'incubation, un isolement a été effectué par la technique des stries d'épuisement sur le milieu Hektoën. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Après cette incubation, des colonies caractéristiques de *salmonella spp.* ont été isolées puis identifiées.

2.2.3. IDENTIFICATIONS BACTÉRIENNES ET ANALYSES STATISTIQUES

D'abord une coloration de Gram a été effectuée sur toutes les souches bactériennes suivie des tests biochimiques tels que les tests de Catalase, d'Oxydase, d'ADNase, Mannitol mobilité et du Portoir réduit de Le Minor selon les méthodes employées par Abdelali [11], Débarras [12] et Ogbankotan [13].

L'analyse des données a été effectuée à travers le logiciel R 4.1.2. Pour les analyses de variances des packages comme Ade4, Rcmdr et FactomineR ont été utilisés après dépouillement des résultats sur le logiciel Excel. Les différences ont été considérées comme significatives pour des valeurs de $P < 0,05$

3. RÉSULTATS

3.1. PRÉVALENCE DES PATHOGÈNES BACTÉRIENS DE PORTAGE

Les analyses microbiologiques des différents types de salades collectées ont permis d'identifier quelques germes de portage comme *E. coli O157: H7*, *S. aureus* et de *Salmonella spp.* En effet, l'étude a révélé une forte contamination de ces aliments par les pathogènes bactériens faisant état d'une présence de 22 souches réparties comme suit, 6 souches de *E. coli O157: H7* avec une prévalence de 16 %, 9 souches de *S. aureus* soit une prévalence de 24 % et 7 souches de *Salmonella spp.* dont une prévalence de 18 % (**Figure 1**).

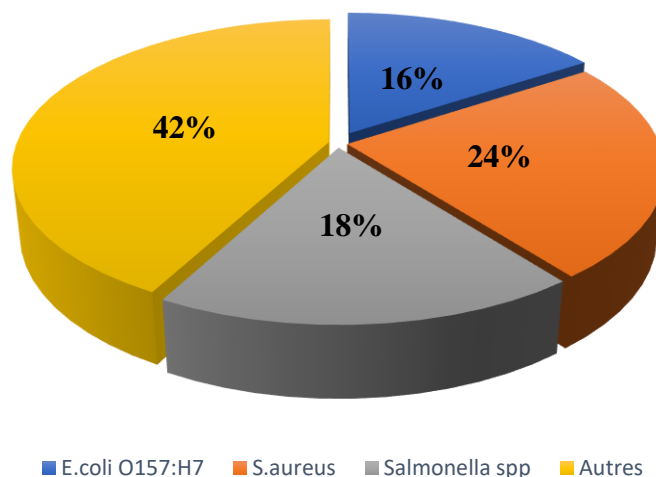


Fig. 1. Prévalence des souches de portage dans les salades de 4ème gamme

3.2. QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES SALADES DURANT LA PÉRIODE DE CONSERVATION

Le dénombrement par intervalle de temps des germes étudiés a donné les charges moyennes consignées dans les **tableaux I, II et III**. Les résultats montrent que les échantillons de salades qui ont fait l'objet d'étude avaient des charges élevées de bactéries pathogènes (*E. coli O157: H7*, *S. aureus* et *Salmonella spp.*) à l'ouverture des emballages (J0). En effet, les charges de *E. coli O157: H7* variaient entre $1,87.10^2$ et $2,21.10^6$ UFC/g dont la plus forte charge a été observée dans les salades des feuilles de chênes vertes (SChV). Concernant les charges de *S. aureus*, elles variaient entre $1,89.10^3$ et $4,63.10^5$ UFC/g, elles avaient également la plus forte charge élevée dans les salades des feuilles de chênes vertes (SChV). Pour les souches de *Salmonella spp.*, elles ont été présentes dans 7 types de salades dont les salades de feuilles de chênes vertes (SChV). Pour apprécier la qualité microbiologique ou la conformité des échantillons analysés, les critères font référence à la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

Ainsi, les qualités microbiologiques à l'ouverture des emballages (J0) ont permis de faire une classification hiérarchique, des différentes salades, représentée par la **Figure 2**.

L'arbre hiérarchique montre une classification à 8 classes dont la première à droite en couleur rouge représente les salades de qualité satisfaisante vis-à-vis des germes étudiés (31,57%). La classe représentée en noir est de qualité microbiologique acceptable (5%), elle concerne la salade de fruits composées (SFC). Les six (6) autres classes sont de qualité microbiologique insatisfaisante (63,43 %).

Pour mieux apprécier la qualité microbiologique des salades contaminées, l'Analyse des Correspondances Multiples (ACM) a montré que les salades des feuilles de chênes vertes (SChV) et les salades nicoises (SN) sont plus favorables à la prolifération bactérienne car ces salades sont plus corrélées aux germes étudiés (*Salmonella spp.*, *E. coli O157: H7*, *S. aureus*). Il en ressort également que les souches de *S. aureus*, prolifèrent plus aisément dans les salades des feuilles de chênes vertes (SChV) et les salades nicoises (SN) ce qui est le cas pour les souches de *E. coli O157: H7* même si sa croissance est aussi marquée dans les salades de Choux (Sch). Cette dernière est également plus propice à la prolifération de *Salmonella spp.*

Au troisième jour (J3) d'analyse, les charges moyennes des souches de *E. coli O157: H7* variaient entre $2,24.10^4$ et $6,63.10^6$ UFC/g dont la plus forte charge est observée dans les SChV. Quant aux souches de *S. aureus*, les charges moyennes variaient entre $1,91.10^4$ et $4,98.10^6$ UFC/g avec pour plus forte charge celle des SChV. Conformément aux critères microbiologiques, les salades de qualité microbiologique satisfaisante sont restées intactes. Cependant, la SFC qui était de qualité acceptable, au troisième jour (J3) était devenue de qualité insatisfaisante ce qui a augmenté le taux des salades impropres à la consommation (68,43 %).

Au septième jour (J7) d'analyse, les charges moyennes de *E. coli O157: H7* étaient toujours plus élevées dans les SChV ($1,23.10^7$ UFC/g). Les plus fortes charges enregistrées chez les souches de *S. aureus* étaient dans les salades Meli melo (SMe) et les SChV avec des charges respectives de $9,79.10^7$ UFC/g et de $4,76.10^7$ UFC/g. Même s'il y a eu une augmentation des charges bactériennes dans l'ensemble, le statut microbiologique de façon générale du troisième (J3) au septième jour (J7) n'a pas changé.

L’Analyse des Correspondances Multiples montre que durant la période de conservation domestique, les souches de *E. coli* O157: H7 ont une forte croissance dans les SChV et les SN mais elle s’est avérée significative que dans les SChV ($p\text{-value} = 0,005492 < P$). L’ACM montre également que les SCa, SCom, SFC, SMe sont plus propices à la prolifération des souches de *S. aureus* cependant l’analyse de variance a révélé une croissance plus significative de ces souches dans les SMe avec une $p\text{-value} = 2,502.10^{-12}$ (Figure 3). En outre, la corrélation faible entre la croissance de *E. coli* O157: H7 et celle de *S. aureus* au troisième jour ($p\text{-value} = 0,2699$) et au septième jour ($p\text{-value} = 0,1538$) d’analyse montre que la croissance de ces deux pathogènes bactériens est indépendante dans les différentes salades analysées

Tableau 1. Charges moyennes des souches bactériennes à l’ouverture des emballages (J0)

Salades	Germes	<i>E. coli</i> O157: H7 (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp. (UFC/g)
100% Coeur de frisés (Cf)		<1	<1	Absence
Baby Epinards (Ep)		<1	<1	Absence
Jeunes Pousses (JP)		<1	<1	Présence
Mâches (Ma)		<1	<1	Absence
Mâches + Roquettes (MR)		<1	<1	Présence
Roquettes (Rq)		<1	$1,89.10^3 \pm 8,57.10^2$	Absence
Salades Apéritives (SA)		<1	$9,01.10^4 \pm 9,45.10^3$	Présence
Salades Carottes (SCa)		$4,75.10^2 \pm 45$	$5,42.10^4 \pm 4,53.10^4$	Absence
Salades Choux (SCh)		$8,87.10^4 \pm 2.10^4$	<1	Présence
Salades Feuilles de Chênes Vertes (SChV)		$2,21. 10^6 \pm 2.10^5$	$4,63.10^5 \pm 3,75.10^4$	Présence
Salades Composées (SCom)		$1,87.10^2 \pm 2$	$4,45.10^3 \pm 1,05.10^3$	Absence
Salades de Fruits d’Ananas (SFA)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits Composées (SFC)		$2,80.10^2 \pm 10$	<1	Absence
Salades de Fruits d’Ananas +Mangues (SFAM)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Papaye +Ananas (SFPA)		<1	$2,20.10^5 \pm 10^5$	Absence
Salades de Fruits de Papaye + Citron (SFPC)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Raisin (SFR)		<1	$2,07.10^3 \pm 85$	Présence
Salades Meli melo (SMe)		<1	$6,25.10^4 \pm 6,5.10^3$	Absence
Salades Nicoises (SN)		$8,23.10^3 \pm 5,25.10^2$	$4,3.10^5 \pm 6,05.10^4$	Présence
Critères		m= 10^2 (UFC/g) M= 10^3 (UFC/g)	m = 10^2 (UFC/g) M= 10^3 (UFC/g)	Absence dans 25 g d’aliment

Tableau 2. Charges moyennes des souches bactériennes au troisième jour (J3) d'analyse

Salades	Germes	<i>E. coli</i> O157: H7 (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella spp</i> (UFC/g)
100% Coeur de frisés (Cf)		<1	<1	Absence
Baby Epinards (Ep)		<1	<1	Absence
Jeunes Pousses (JP)		<1	<1	Présence
Mâches (Ma)		<1	<1	Absence
Mâches + Roquettes (MR)		<1	<1	Présence
Roquettes (Rq)		<1	1,91.10 ⁴ ± 4,87.10 ³	Absence
Salades Aperitives (SA)		<1	1,16.10 ⁵ ± 4,50.10 ³	Présence
Salades Carottes (SCa)		7,27.10 ⁵ ± 3,84.10 ⁵	1,36.10 ⁵ ± 1,25.10 ⁵	Absence
Salades Choux (SCh)		1,12.10 ⁵ ± 2,08.10 ⁴	<1	Présence
Salades Feuilles de Chênes Vertes (SChV)		6,63.10 ⁶ ± 1,94.10 ⁶	4,98.10 ⁶ ± 1,37.10 ⁶	Présence
Salades Composées (SCom)		1,65.10 ⁵ ± 1,50.10 ⁴	8,45.10 ⁵ ± 1,25.10 ⁵	Absence
Salades de Fruits d'Ananas (SFA)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits Composées (SFC)		2,57.10 ⁵ ± 3,25.10 ⁴	<1	Absence
Salades de Fruits d'Ananas +Mangues (SFAM)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Papaye +Ananas (SFPA)		<1	7,95.10 ⁵ ± 5,50.10 ²	Absence
Salades de Fruits de Papaye + Citron (SFPC)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Raisin (SFR)		<1	1,59.10 ⁶ ± 5.10 ³	Présence
Salades Meli melo (SMe)		<1	5,95.10 ⁶ ± 5.10 ⁴	Absence
Salades Nicoises (SN)		2,24.10 ⁴ ± 1,1.10 ³	1,21.10 ⁷ ± 1,57.10 ⁶	Présence
Critères		m= 10 ² (UFC/g) M= 10 ³ (UFC/g)	m = 10 ² (UFC/g) M= 10 ³ (UFC/g)	Absence dans 25 g d'aliment

Tableau 3. Charges moyennes des souches bactériennes au septième jour (J7) d'analyse

Salades	Germes	<i>E. coli</i> O157: H7 (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella spp</i> (UFC/g)
100% Coeur de frisés (Cf)		<1	<1	Absence
Baby Epinards (Ep)		<1	<1	Absence
Jeunes Pousses (JP)		<1	<1	Présence
Mâches (Ma)		<1	<1	Absence
Mâches + Roquettes (MR)		<1	<1	Présence
Roquettes (Rq)		<1	2,90.10 ⁴ ± 2.10 ³	Absence
Salades Aperitives (SA)		<1	2,38.10 ⁵ ± 2,25.10 ⁴	Présence
Salades Carottes (SCa)		2,56.10 ⁶ ± 3,89.10 ⁵	3,96.10 ⁵ ± 2,84.10 ⁵	Absence
Salades Choux (SCh)		1,16.10 ⁵ ± 1,45.10 ⁴	<1	Présence
Salades Feuilles de Chênes Vertes (SChV)		1,23.10 ⁷ ± 1,51.10 ⁶	4,76.10 ⁷ ± 1,60.10 ⁶	Présence
Salades Composées (SCom)		1,60.10 ⁶ ± 3,50.10 ⁵	4,89.10 ⁶ ± 4.10 ⁴	Absence
Salades de Fruits d'Ananas (SFA)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits Composées (SFC)		2,36.10 ⁶ ± 2,19.10 ⁶	<1	Absence
Salades de Fruits d'Ananas +Mangues (SFAM)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Papaye +Ananas (SFPA)		<1	1,02.10 ⁷ ± 2.10 ⁴	Absence
Salades de Fruits de Papaye + Citron (SFPC)		<1	<1	Absence
Salades de Fruits de Raisin (SFR)		<1	3,65.10 ⁶ ± 5,50.10 ⁴	Présence
Salades Meli melo (SMe)		<1	9,79.10 ⁷ ± 1,50.10 ⁴	Absence
Salades Nicoises (SN)		3,22.10 ⁵ ± 1,30.10 ⁴	6,69.10 ⁶ ± 4,50.10 ⁵	Présence
Critères		m= 10 ² (UFC/g) M= 10 ³ (UFC/g)	m = 10 ² (UFC/g) M= 10 ³ (UFC/g)	Absence dans 25 g d'aliment

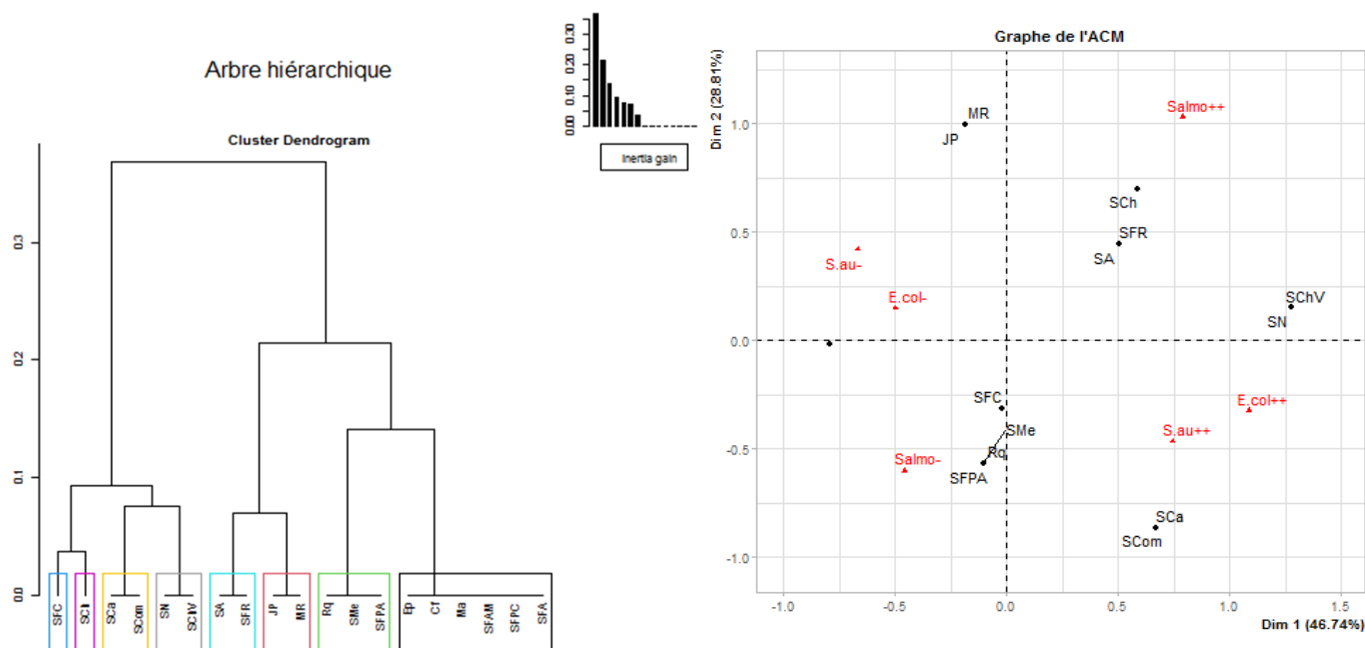


Fig. 4. Qualité microbiologique des salades au septième jour (J7) d'analyses

4. DISCUSSION

La 4^{ème} gamme des produits alimentaires joue un rôle essentiel dans l'industrie agroalimentaire en ce sens qu'elle répond aux attentes des consommateurs. De nos jours, les repas sont pris de plus en plus hors domicile et les ménages commencent à consacrer moins de temps à l'élaboration des repas. De plus, la volonté de bien s'alimenter est désormais une tendance générale. Cependant, le procédé de formulation, de conditionnement, de conservation ainsi que le transport peuvent occasionner une contamination bactérienne entraînant des cas d'intoxications alimentaires et des épidémies graves causes de décès.

Ainsi, au cours de cette étude nous avons constaté une forte contamination des salades de 4^{ème} gamme par des pathogènes bactériens de portage en occurrence *S. aureus*, *E. coli* O157: H7 et *Salmonella* spp. La présence de ces germes dans les salades pourrait s'expliquer par un état sanitaire médiocre des matières premières, du matériel de production, à une mauvaise hygiène du personnel ou à la contamination croisée d'agents pathogènes des aliments crus qui pourrait s'aggraver par un environnement insalubre [8].

Cette étude a fait mention de la présence de 9 souches de *S. aureus* avec une prévalence de 24 %, 7 souches de *Salmonella* spp. d'une prévalence de 18 % et 6 souches de *E. coli* O157: H7 dont d'une prévalence de 16 %. Ces résultats sont similaires à ceux de Paudyal *et al.* [8], au cours d'une étude réalisée sur la prévalence d'agents pathogènes d'origine alimentaire dans les aliments crus provenant des pays Africains. Ces auteurs ont trouvé une prévalence en *S. aureus* de 27,8 % et en *Salmonella* spp. de 19,9 % dans les aliments de 4^{ème} gamme. Dans une étude réalisée en Iran, sur un total de 60 échantillons de salades de légumes prêtes à consommer, 10 échantillons étaient positifs pour *E. coli* O157: H7 dont d'une prévalence de 16,66 % [14]. Nos résultats sont sensiblement conformes à ces résultats. Aussi, les travaux réalisés sur la prévalence des pathogènes dans les salades prêtes à consommer en Grèce, ont fait état d'une prévalence de 27 % des souches de *S. aureus* [15]. Mekhloufi *et al.* [16], quant à eux ont montré une prévalence de *S. aureus* de 23,2 % dans les aliments prêts-à-consommer collectés en Algérie. Habibi Najafi [17] a montré également de fortes contaminations des herbes fraîches mélangées par *S. aureus* (23.6 %) et *E. coli* O157: H7 (11.4 %). Les salades de légumes prêtes à consommer vendues dans le quartier central des affaires de Tamale au Ghana étaient aussi fortement contaminées par *Salmonella* spp. avec une prévalence de 73,3 % [18]. Ces résultats sont similaires à la forte contamination des salades de 4^{ème} gamme par les pathogènes bactériens de portage obtenus au cours de nos travaux. Mais Sant'Ana *et al.* [19] ont trouvé des résultats contraires au cours de leurs travaux réalisés sur les légumes peu transformés à São Paulo au Brésil où le niveau de contamination par *Salmonella* spp. était de 0,7 % (4/512). Cette différence expliquerait l'application de bonne pratique d'hygiène qui témoigne un état hygiénique satisfaisant dans la production de leurs salades.

Il ressort de nos analyses que 6 salades à savoir Baby Epinards (Ep), 100 % Cœur de frisés (Cf), Mâches (Ma), Salades de Fruits d'Ananas (SFA), Salades de Fruits d'Ananas+Mangues (SFAM), Salades de Fruits de Papaye+Citron (SFPC), conformément aux critères microbiologiques du règlement 2073/2005/CE étaient de qualité microbiologique satisfaisante (31,57 %), une était de qualité acceptable (5 %) et toutes les autres étaient insatisfaisantes (63,43 %) à l'ouverture des emballages (J0). En effet, la qualité microbiologique insatisfaisante enregistrée en grande partie dans les salades est liée à la présence de souches de *Salmonella spp.*, de la forte charge moyenne de *S. aureus* comprise entre $1,89.10^3$ et $4,63.10^5$ UFC/g et celle de *E. coli O157: H7* qui variait entre $1,87.10^2$ et $2,21. 10^6$ UFC/g. La qualité microbiologique médiocre dominante sur l'ensemble des salades témoigne un risque direct et élevé pour la santé de la population avec des conséquences imminentes sérieuses à cause de la présence de de *Salmonella spp.* Ce qui pourrait être lié à une insuffisance dans la pratique d'hygiène durant la production de ces aliments. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Vestrheim *et al.* [20] en Norvège. La forte présence de ce pathogène pourrait aussi s'expliquer par une prolongation de la durée de stockage de ces aliments dans les rayons des supermarchés. Arienzo *et al.* [21] au cours de leurs travaux réalisés sur la qualité et la sécurité microbiologiques des salades légumes-feuilles prêts-à-consommer vendues dans les grandes chaînes de supermarchés du Latium, en Italie, ont montré une qualité microbiologique insatisfaisante dans tous les échantillons analysés à la date d'emballage et à la date de péremption et une prévalence très élevée de *Salmonella spp.* (67 %) quelles que soient les variétés sélectionnées et les catégories de coûts. Xylia *et al.* [22], au cours de leurs travaux ont indiqué que la date de péremption et la durée de conservation des légumes peu transformés sont des paramètres importants dans la gestion de la sécurité sanitaire de ces produits. Ces paramètres augmentaient la croissance bactérienne ce qui est en conformité avec nos résultats. Aussi, les charges élevées de *S. aureus* et de *E. coli O157: H7* indiquent que les différentes salades contaminées pourraient avoir sur la santé des consommateurs des répercussions indésirables temporaires, sans menacer leur vie [23]. Ainsi, la préparation de salades à ingrédients mixtes nécessite une manipulation humaine, ce qui présente un risque supplémentaire de contamination bactérienne [24]. Yildirim *et al.* [25], durant une étude réalisée sur la qualité microbiologique des salades prêtes à consommer vendues à Afyonkarahisar en Turquie ont montré de forte contamination par les charges supérieures à 2 log UFC/g *S. aureus*. Ils ont ainsi, affirmé que les fortes contaminations de ces aliments peuvent constituer un danger potentiel pour la santé publique. Une qualité microbiologique des légumes peu transformés prêts-à-consommer consommés au Brésil, a fait état de contamination par *Salmonella spp* et de *E.coli* [26]. Ces résultats concordent avec les nôtres. Nos résultats confirment également ceux de Giwa *et al.* [27] qui ont montré que de bonnes pratiques d'hygiène peuvent minimiser le nombre de bactéries, diminuant ainsi les réservoirs de contamination bactérienne. De plus, la contamination observée au cours de nos travaux pourrait aussi s'expliquer par un abus de température de conservation commerciale [28]. Au troisième jour (J3) d'analyses le taux de contamination a augmenté (68,43 %) à cause de la variation croissante des charges bactériennes dans les SFC. Cette variation de la charge microbienne dans cette variété de salade serait probablement liée à sa forte teneur en eau mais aussi à sa composition ce qui confirme également les travaux de Söderqvist [24]. Selon cet auteur, les salades à ingrédients mixtes nécessitent une manipulation humaine, ce qui présente un risque supplémentaire de contamination bactérienne. Au septième jour d'analyse le statut microbiologique par rapport au troisième d'analyse n'a pas changé parce que la contamination microbienne de ces aliments proviendrait des procédés de formulation, le conditionnement, le transport, la température de conservation ou des matières premières.

De façon générale, la croissance des pathogènes bactériens de portage se sont avérés plus significatives dans les salades. Salades des feuilles de Chênes Vertes (SChV) et les salades Meli melo (SMe) durant la période de conservation domestique. Cette forte croissance observée serait probablement liée à l'emballage de ces produits. En effet, l'emballage de ces deux salades était en matériel de téréphtalate polyéthylène mais plutôt perforé. Pourtant, l'atmosphère d'un emballage des salades prêtes à consommer doit être modifiée de sorte à avoir 0,25-3 % O₂ et 3-12 % CO₂ avec un bilan en N₂ [29] ce qui est contraire dans notre cas. Alors, la croissance significative des bactéries se traduirait donc par une accumulation d'eau dans les produits, durant la période de conservation. Selon Prescott & Harley [30], lorsque les aliments sont mis à l'humidité, ils absorbent l'eau en surface ce qui permet finalement une croissance microbienne.

5. CONCLUSION

Les résultats ont montré dans cette étude que les salades de 4^{ème} gamme des grandes chaînes des supermarchés de la ville d'Abidjan étaient fortement contaminées par les pathogènes bactériens de portage dont *S. aureus* avec une prévalence de 24 %, *E. coli O157: H7* de 16 % et *Salmonella spp.* de 18 %. Aussi, le dénombrement par intervalle de temps a montré que dès l'ouverture des emballages les pathogènes étudiés se développent aisément dans les salades de 4^{ème} gamme durant la période de conservation domestique. Cependant, les salades des feuilles de chênes vertes (SChV) et les salades Meli melo (SMe), avec des emballages perforés étaient plus propices à la croissance bactérienne. Il serait donc judicieux pour la population abidjanaise d'éviter une conservation des salades de 4^{ème} gamme à 7 °C au-delà de 2 jours après ouverture des emballages.

REFERENCES

- [1] M. Kaczmarek, S. V. Avery & I. Singleton. Microbes Associated with Fresh Produce: Sources, Types and Methods to Reduce Spoilage and Contamination. *Advances in Applied Microbiology* 107: 29-82. 2019.
- [2] R. Rekhy & R. McConchie. Promoting Consumption of Fruit and Vegetables for Better Health. Have Campaigns Delivered on the Goals ? *Appetite* 79: 113-23. 2014.
- [3] A. Kalia, and R. P. Gupta. (2006). Fruit Microbiology, in Hui Y.H, J., Cano, M.P., Gusek, W., Sidhu, J.W., Sinha, N.K. Handbook of Fruit and Fruit processing. 1st Edition, Blackwell publishing, pp3-28.
- [4] C. Pollard, M. Miller, R. J. Woodman, R. Meng & C. Binns. Changes in Knowledge, Beliefs, and Behaviors Related to Fruit and Vegetable Consumption among Western Australian Adults from 1995 to 2004. *American Journal of Public Health* 99 (2): 355-61. 2009.
- [5] Y. Adjrah, D.S. Karou, B. Djéri, K Anani, Soncy, Y. Ameyapoh, C. de Souza and M. Gheassor. Hygienic quality of commonly consumed vegetables, and perception about disinfecting agents in Lomé. *International Food Research Journal*, 18 (4): 1499-1503. 2011.
- [6] P. Xylia, G. Botsaris, A. Chrysargyris, P. Skandamis & N. Tzortzakis. Variation of Microbial Load and Biochemical Activity of Ready-to-Eat Salads in Cyprus as Affected by Vegetable Type, Season, and Producer. *Food Microbiology* 83: 200-210. 2019.
- [7] M. Cofelice, F Lopez & F Cuomo. Quality Control of Fresh-Cut Apples after Coating Application. *Foods (Basel, Switzerland)* 8 (6): 189. 2019.
- [8] N. Paudyal, V. Anihouvi, J. Hounhouigan, M. I. Matsheka, B. Sekwati-Monang, W. Amoa-Awua, A. Atter, N. B. Ackah, S. Mbugua, A. Asagbra, W. Abdelgadir, J. Nakavuma, M. Jakobsen & W. Fang. Prevalence of Foodborne Pathogens in Food from Selected African Countries - A Meta-Analysis. *International Journal of Food Microbiology* 249: 35-43. 2017.
- [9] M. E. Nyenje, C. E. Odjadjare, N. F. Tanih, E. Green & R. N. Ndip. Foodborne Pathogens Recovered from Ready-to-Eat Foods from Roadside Cafeterias and Retail Outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: Public Health Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 9 (8): 2608-19. 2012.
- [10] D. M. Angaman, N. P. N'zi and V. C. Gbonon. Kinetics of Microorganisms in Ready-To-Eat Salads Stored at 4°C Sold in Supermarkets in the City of Abidjan, Côte d'Ivoire. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 10 (03): 1984-1992. 2021.
- [11] S. Abdelali. Résistance des entérocoques aux antibiotiques. *Microbiologie Appliquée, département de biologie. Mémoire de Master en faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen, Algérie*, 45p. 2016.
- [12] C. Delarras. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle Sanitaire*. Lavoisier, Paris. 476p. 2007.
- [13] I. Ogbankotan. Prevalence et caractérisation de souches d'Escherichia coli O157 productrices de Shigatoxines isolées de denrées alimentaires et feces d'origine animale au Bénin. *Mémoire, Normes et contrôle de qualité des produits agroalimentaires, Université D'abomey-Calavi (Uac)*. 78p. 2014.
- [14] H. Kochakkhani, P. Dehghan, M. H. Mousavi & B. Sarmadi. Occurrence, Molecular Detection and Antibiotic Resistance Profile of Escherichia coli O157: H7 Isolated from Ready-To-Eat Vegetable Salads in Iran, 22 (3): 195-202. 2016.
- [15] D. Sergelidis, A. Abraham, V. Anagnostou, A. Govaris, T. Papadopoulos & A. Papa. Prevalence, Distribution, and Antimicrobial Susceptibility of Staphylococcus aureus in Ready-to-Eat Salads and in the Environment of a Salad Manufacturing Plant in Northern Greece. *Czech Journal of Food Sciences* 30: 285-91. 2012.
- [16] O. A. Mekhloufi, D. Chieffi, A. Hammoudi, S. A. Bensefia, F. Fanelli & V. Fusco. Prevalence, Enterotoxigenic Potential and Antimicrobial Resistance of Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Isolated from Algerian Ready to Eat Food. *Toxins* 13 (12): 835. 2021.
- [17] M. B. Habibi Najafi & M. Bahreini. Microbiological Quality of Mixed Fresh-Cut Vegetable Salads and Mixed Ready- to-Eat Fresh Herbs in Mashhad, Iran. *International Conference on Nutrition and Food Sciences*, 39 (2012): 62-66. 2012.
- [18] G. Abakari, S. J. Cobbina & E. Yeleliere. Microbial quality of ready-to-eat vegetable salads vended in the central business district of Tamale, Ghana. *Food Contamination* 5, 3. 2018.
- [19] A. S. Sant'Ana, M. Landgraf, M. T. Destro & B. D. G. M. Franco. Prevalence and Counts of Salmonella Spp. In Minimally Processed Vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology* 28 (6): 1235-37. 2011.
- [20] D. F. Vestrheim, H. Lange, K. Nygård, K. Borgen, A. L. Wester, M. L. Kvarme & L. Vold. Are ready-to-eat salads ready to eat? An outbreak of Salmonella Coeln linked to imported, mixed, pre-washed and bagged salad, Norway, November 2013. *Epidemiology & Infection* 144 (8): 1756-60. 2016.
- [21] A. Arienzo, L. Murgia, I. Fraudentali, V. Gallo, R. Angelini & G. Antonini. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods* 9 (10): 1421. 2020.
- [22] P. Xylia, G. Botsaris, P. Skandamis & N. Tzortzakis. Expiration Date of Ready-to-Eat Salads: Effects on Microbial Load and Biochemical Attributes. *Foods* 10 (5): 941. 2021.

- [23] Critères Microbiologiques Applicables aux Denrées Alimentaires (CMADA). Lignes directrices pour l’interprétation. Edition Août. 2018.
- [24] K. Söderqvist. Is your lunch salad safe to eat? Occurrence of bacterial pathogens and potential for pathogen growth in pre-packed ready-to-eat mixed-ingredient salads. *Infection Ecology & Epidemiology* 7 (1): 1407-216. 2017.
- [25] Y. Yildirim, S. Pamuk, Z. Gürler & E. Nurhan. The Microbiological Quality of Ready to Eat Salads Sold in Afyonkarahisar, Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 19 (6): 1001-1006. 2013.
- [26] M.A. Oliveira, V. Maciel de Souza, A. M. M Bergamini & E. C. P. De Martinis. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Minimally Processed Vegetables Consumed in Brazil. *Food Control*, 22 (8): 1400-1403. 2011.
- [27] A. S. Giwa, A. G. Memon, A. A. Shaikh, R. Korai, G. U. Maitlo, I. Maitlo, S. Ali & A. Jabran. Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in cafeterias of public sector universities ». *Environmental Pollutants and Bioavailability* 33 (1): 11-18. 2021.
- [28] C. Calonico, V. Delfino, G. Pesavento, M. Mundo & A. Lo Nostro. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Salads from Processing Plant to the Consumers. *Journal of Food and Nutrition Research*, 8.
- [29] D. O’Beirne, V. Gomez-Lopez, J. A. Tudela, A. Allende & M. I. Gil. Effects of Oxygen-Depleted Atmospheres on Survival and Growth of *Listeria Monocytogenes* on Fresh-Cut Iceberg Lettuce Stored at Mild Abuse Commercial Temperatures. *Food Microbiology* 48: 17-21. 2015.
- [30] L. M. Prescott, J. H. P. Harley, D. E. Boeck & Larcier. *Microbiologie*, Editions De Boeck Université. Pour la traduction et l’adaptation française. 2003.

Original Research Article

<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1003.253>

Kinetics of Microorganisms in Ready-To-Eat Salads Stored at 4°C Sold in Supermarkets in the City of Abidjan (Côte d'Ivoire)

Djédoux Maxime Angaman^{1*}, N'goran Parfait N'zi^{1,2} and Valérie Carole Gbonon²

¹Department of Biochemistry-Microbiology, Laboratory of Agrovalorization, University Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire

²Department of Bacteriology-Virology, National Reference Center for Antibiotics, Pasteur Institute of Côte d'Ivoire, Abidjan, Côte d'Ivoire

*Corresponding author

ABSTRACT

Consumption of ready-to-eat salads is increasingly observed in large African cities, in particular Abidjan (Côte d'Ivoire). Thus, monitoring the microbiological quality of these salads packaged in polyethylene terephthalate (PET) plastics is a necessity in order to guarantee their compliance and prevent occurrence of food poisoning. The objective of this work was to assess microbiological quality of fourth-range salads sold in supermarkets in the City of Abidjan during the storage period at 4°C after opening the packages. Our study focused on 4 types of salads, Spinach, Lamb's lettuce, Lamb's lettuce and Arugula and Young shoots (lettuce, arugula, spinach, red chard, bull's blood) bought in Abidjan's supermarkets. We proceeded to an enumeration of mesophilic and psychrophilic aerobic bacteria as well as yeasts and molds by an interval of 3 days. The results revealed the presence of these microorganisms as soon as the packages were opened. Most of ready-to-eat salads were of satisfactory quality from the opening of the packaging but not on the 2nd and 3rd day of analysis. However, composition of salads and shelf life favored the growth of microorganisms. Good practice guides for the purchase, storage and consumption of these foods must be put in place to prevent poisoning.

Keywords

Fourth range salads, Mesophilic and psychrophilic bacteria, Fungal flora

Article Info

Accepted:

xx February 2021

Available Online:

xx March 2021

Introduction

Fourth range of food products concerns products that are pre-cleaned, mainly packaged and ready to be eaten without preparation or prior cooking (Paudya *et al.*, 2017). Nowadays, the changing lifestyle of

consumers and the great attention paid to healthy and nutritious foods have widened the demand for fourth range products (Cofelice *et al.*, 2019). Fourth range therefore plays an important role in the food industry because it meets the demand of consumers, who have little time to cook, but who want to follow a

healthy and balanced diet, without having to spend a lot of time in the kitchen. In addition, salads of fresh fruits and vegetables are the most preferred because the WHO, FAO and the World Cancer Research Fund recommend the consumption of 400 to 600g of fruits and vegetables per day (Pollard *et al.*, 2009; Adjrah *et al.*, 2011). However, the production and distribution of these products requires the use of a specific manufacturing process, all phases of which are governed by common health and safety rules (OESAAS, 2018). Despite the many advantages of fourth-range salads, several studies have shown their major involvement in food-borne epidemics (Zhang *et al.*, 2012; MacDonald *et al.*, 2016; Espenhain *et al.*, 2019). In Africa, the prevalence of foodborne pathogens in foods in some African countries is the high prevalence of major pathogens in ready-to-eat foods, almost as high as in raw foods (Paudyal *et al.*, 2017).

In Côte d'Ivoire, the trend to move towards a healthy lifestyle is pushing the population to take more and more interest in ready-to-eat salads (fourth range). We are therefore witnessing a flood of several types of salads of various origins in supermarkets in Abidjan. However, consumers sometimes lack knowledge about adequate refrigeration (Marklinder *et al.*, 2004). Anin *et al.*, (2016) assessed the microbiological contamination of certain artisanal fourth range products sold on local markets in Abidjan.

Also, Toe & Dadié (2018) determined the prevalence and potential virulence of *Escherichia coli* in ready-to-eat raw vegetable salads in collective catering in Abidjan. However, scientific data on kinetics of microflora in fourth range salads are not yet available. That's why we determine devolution of the microflora growth according to conditions of domestic storage over time after packaging opening.

Materials and Methods

This study took place over a three-month period from July to September 2020. Collection of salads packaged in polyethylene terephthalate (PET) plastics was purchased in supermarkets of Abidjan (Côte d'Ivoire). Indeed, the salads selected are of 4 types (2 from one type of salad, one with 2 types of salads and last one with 5 salads) and have foreign origins (Europe). After collection, samples were stored at -80 ° C. Microbial evolution was determined by time interval (Day 0; Day 3; Day 7).

Enumeration of microorganisms focused on mesophilic aerobic flora, psychrotrophic aerobic flora and fungal flora. Techniques used for enumeration refer to AFNOR standards and ISO standards. First, decimal dilutions were carried out in accordance with the AFNOR NF V 08 010 standard of March 1996. A quantity of 25 g of products was diluted in a volume of 225 mL of buffered peptone water, From the suspension obtained (stock suspension), a series of dilutions was carried out in the order of 10^{-1} to 10^{-6} . Enumeration of mesophilic aerobic flora was carried out on PCA Agar according to UNI EN ISO 4833-1: 2013 standard, incubated at 30 °C for 72 h. Psychrophilic aerobic flora was also counted on the PCA agar according to ISO 17410 (2001) incubated at 6.5 °C for 72 h. As for fungal flora, it was counted on Sabouraud-Chloramphenicol Agar according to ISO/IEC 17025 at 25 °C for 72.

Presumptive colonies are counted and then average concentration or bacterial load was reported according to ISO 7218 (2007). The data processing was carried out using two software programs, Excel 2016 and Statistica 7.1. Fisher's LSD Test was performed to distinguish differences between averages.

Results and Discussion

Microorganisms growth evolution during storage periods

Spinach

The average loads of microorganisms in spinach sample during storage period are listed in Table 1. On opening the packaging of these samples, the revivable microorganisms were counted. The results show that microbial loads varied between 6.80×10^2 CFU/g and 2.97×10^5 CFU/g. During storage period (4°C), mesophilic and psychrophilic aerobic flora developed slowly until the 3rd day (D3). However, after the 3rd day to the 7th day of storage, significant growth was observed in psychrophilic aerobic bacteria while mesophilic remained slow. This salad was also marked by a low load of yeast and mold when opening the package. But this flora underwent significant growth during storage at 4 °C.

Lamb's lettuce

Lamb's lettuce when opening the packaging had a very low average load of mesophilic aerobic flora (7.80×10^2 CFU/g) as did psychrophilic aerobic flora (5.90×10^2 CFU/g).

In this sample the number of mesophilic bacteria which was low when the packaging was opened reproduced slowly on the 3rd day and very rapidly on the 7th day of storage. Psychrophilic bacteria, also with a low initial load, experienced rapid growth from the 3rd day until the 7th day of storage. However, the count did not reveal the presence of mold and yeast in this type of salad (Table 2).

Lamb's lettuce and Arugula

Microbiological analyzes revealed low average microbial loads varying between 1.20×10^3 CFU/g and 1.82×10^4 CFU/g. However,

fungi flora was not detected. During storage at 4 °C, mesophilic aerobic flora reproduced significantly from day 3 to day 7. Psychrophilic flora also developed significantly throughout storage period (Table 3).

Mixture of young shoots

The enumeration of this salad gave very high bacterial loads, 1.73×10^8 CFU/g for the mesophilic flora and 2.81×10^7 CFU/g for the psychrophilic flora. Yeast and mold had a load of 4.20×10^2 CFU/g.

During the storage period, psychrophilic bacteria developed significantly unlike the mesophilic flora and fungal flora which developed slowly (Table 4).

Comparison of the evolution of microbial growth in different salads

Mesophilic aerobic flora

With regard to the aerobic mesophilic flora, the salad consisting of lamb's lettuce and arugula showed a statistical difference in the average loads during storage time.

It follows that lamb's lettuce salad showed significant growth on the 7th day. Young shoots (although having high values) and spinach salads did not obtain significant growth over time (Figure 1).

Psychrophilic aerobic flora

Psychrophilic bacteria showed significant growth in all of our samples. The increase in average loads was a function of the number of components in the package. This is how the salad made from young people growing with 5 elements (lettuce, arugula, spinach, red chard, bull's blood) had the highest values (figure 2).

Table.1 Microbial evolution in spinach during storage time. MAF: Mesophilic Aerobic Flora, PAF: Psychrophilic Aerobic Flora, FF: Fungal Flora

Days	D0	D3	D7
Flora			
MAF (CFU/g)	2.97 10 ^{5a}	3.2910 ^{6 a}	5.9310 ^{7a}
PAF (CFU/g)	2.80 10 ^{5a}	3.3710 ^{6 a}	4.6410 ^{7b}
FF (CFU/g)	6.80 10 ^{2a}	1.5010 ^{3b}	2.7210 ^{3c}

Values followed by the same letter on the same lines are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test.

Table.2 Microbial evolution in Lamb's lettuce during storage time. MAF: Mesophilic Aerobic Flora, PAF: Psychrophilic Aerobic Flora, FF: Fungal Flora

Days	D0	D3	D7
Flora			
MAF (UFC/g)	7.80 10 ^{2a}	2.5510 ^{6a}	3.16×10 ^{7 b}
PAF (UFC/g)	5.90 10 ^{2a}	3.04×10 ^{6 b}	1.26×10 ^{7c}
FF (UFC/g)	< 1	< 1	< 1

Values followed by the same letter on the same lines are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test.

Table.3 Microbial evolution in spinach during storage time. MAF: Mesophilic Aerobic Flora, PAF: Psychrophilic Aerobic Flora, FF: Fungal Flora.

Days	D0	D3	D7
Flora			
MAF (UFC/g)	1.20 10 ^{3 a}	2.9510 ^{6 b}	1.6810 ^{7c}
PAF (UFC/g)	1.8210 ^{4 a}	3.2510 ^{7 b}	1.6010 ^{8c}
FF (UFC/g)	< 1	< 1	< 1

Values followed by the same letter on the same lines are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test

Table.4 Microbial evolution in young shoots during storage time. MAF: Mesophilic Aerobic Flora, PAF: Psychrophilic Aerobic Flora, FF: Fungal Flora

Days	D0	D3	D7
Flora			
MAF (UFC/g)	1.7310 ^{8a}	2.7710 ^{8a}	2.9610 ^{8 a}
PAF (UFC/g)	2.8110 ^{7 a}	1.2410 ^{8b}	2.6410 ^{8c}
FF (UFC/g)	4.2010 ^{2 a}	7.5010 ^{2 a}	1.02010 ^{3a}

Values followed by the same letter on the same lines are not significantly different at the 5% level according to Fisher's LSD test

Fig.1 Evolution of the mesophilic aerobic flora as a function of time in the different types of sample.* $p \leq 0.05$

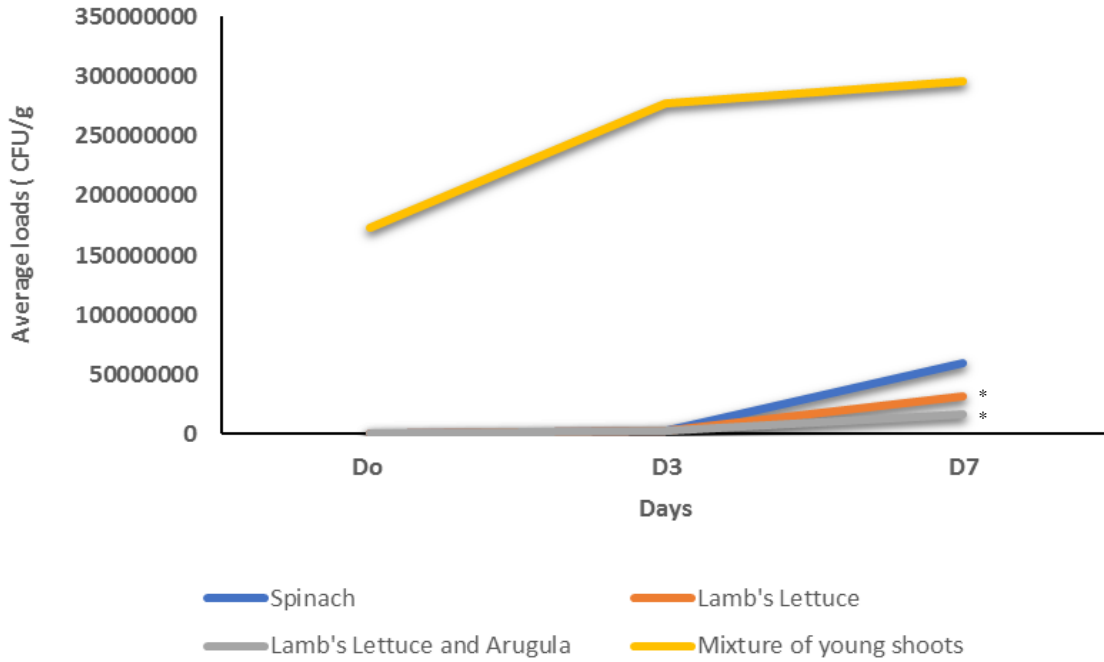


Fig.2 Evolution of the psychrophilic aerobic flora as a function of time of the samples from batch 1. * $p \leq 0.05$

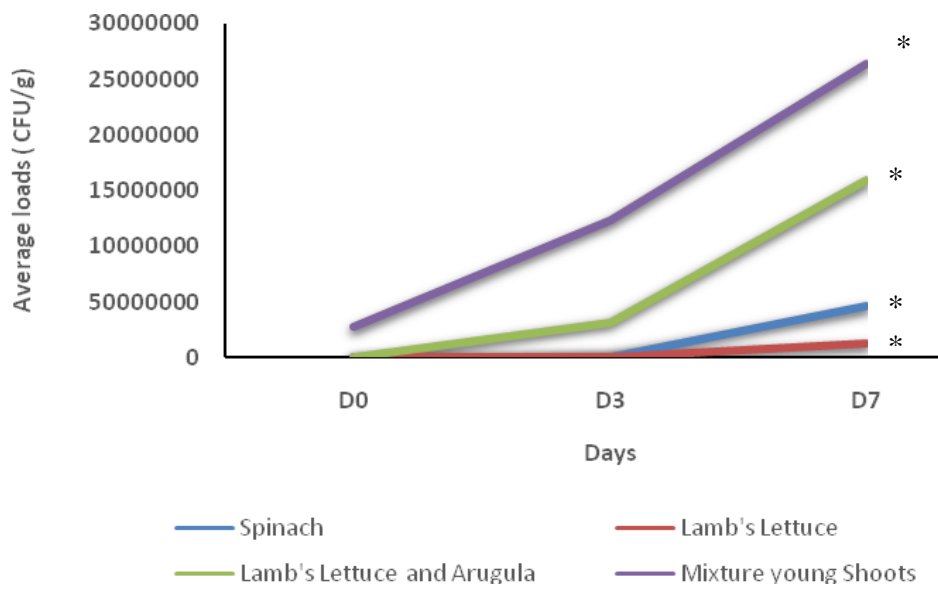
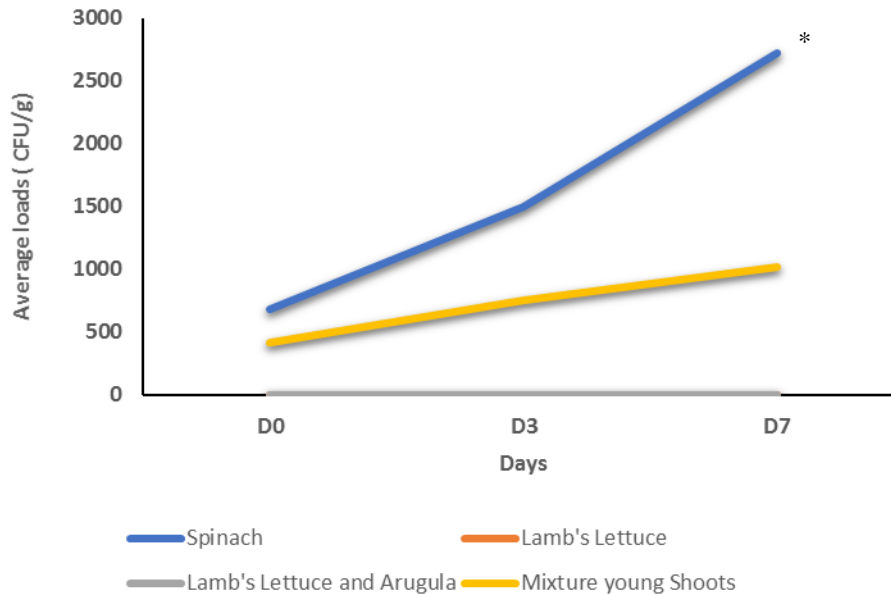


Fig.3 Evolution of the fungal flora as a function of the time of the samples. * $p \leq 0.05$



Fungal Flora (FF)

Only spinach had significant growth with yeasts and molds (figure 3). In general, the values with yeasts and molds were of the same order. Lamb's lettuce and Arugula had low values.

In this work, we analyzed the microbiological quality of ready-to-eat salads sold in supermarkets in Abidjan and the evolution of microbial growth monitored after opening the packages. Thus, the count of spinach salad showed that this salad was of satisfactory microbiological quality when packaging was opened due to the microbial load which varied between $6.80 \cdot 10^2$ CFU/g and $2.97 \cdot 10^5$ CFU/g. Indeed, according to microbiological criteria in accordance with regulation 2073/2005/EC, average acceptable loads in total aerobic flora and fungal flora for fresh little processed foods do not exceed 10^7 CFU/g and 10^4 CFU/g respectively (CMADA, 2018). Our results are different to Mritunjay & Kumar(2017) who showed the highest microbial counts in samples of spinach.

According to them, this may be linked to poor handling practice during storage and at the point of selling. Valentin-Bon *et al.*, (2008) also demonstrated a strong microbial contamination of this food. The difference observed when opening the packaging of our spinach sample would probably be due to a more controlled situation in the production and distribution chain such as type of washing recommended, stability of the storage temperature, good packaging and shelf life of the product. Indeed, the commercial atmosphere modified by 0.25-3% O₂ and 3-12% CO₂ with a balance in N₂ (O'Beirne *et al.*, 2015), storage at a maximum temperature of 4 °C and a shelf life between 7 to 10 days (De Giusti *et al.*, 2010) would be necessary to control spoilage of minimally processed foods. Soendjojo (2012), for its part, showed a low average load of yeast and mold in spinach from grocery stores, which confirms the low average loads of fungal flora obtained in our sample. During the storage period at 4 °C, the growth of the mesophilic aerobicflora was slow while this of aerobic psychrophilic flora was very significant. Garg *et al.*, (1990)

showed in their work that the storage of spinach salads at refrigeration temperature promotes the growth of psychrophilic microorganisms. However, mesophilic bacteria grew slowly at a low temperature which is in line with our results.

For lamb's lettuce, microbiological analyzes showed that it was also of satisfactory quality because of the absence of fungal flora and its very low average load in mesophilic aerobic flora ($7.80 \cdot 10^2$ CFU/g) and aerobic psychrophilic flora ($5.90 \cdot 10^2$ CFU/g) which comply with microbiological criteria. However, from the 3rd day of storage, an exponential growth was noticed in psychrophilic aerobic flora. Mesophilic aerobic flora multiplied slowly. This result is consistent with the work of Garg *et al.*, (1990).

Regarding the salad composed of lamb's lettuce and arugula, it was also of satisfactory quality when opening the packaging but from the 3rd day of storage it proved to be unsatisfactory due to a significant multiplication of the psychrophilic flora. This result is similar to those of Schuh *et al.*, (2020) on the evaluation of microbiological quality of minimally processed vegetables. The strong growth of the different bacterial flora conferred an unsatisfactory quality on these two salad samples from the 3rd day of storage. Our results are substantially similar to those of Arienzo *et al.*, (2020), who showed that after 2 days of storage at 4 °C, these same types of products analyzed presented an unsatisfactory microbiological quality.

For young shoots, studies have shown high concentrations of mesophilic aerobic flora ($1.73 \cdot 10^8$ CFU/g) and psychrophilic aerobic flora ($2.81 \cdot 10^7$ CFU/g) when opening the packaging. Abadias *et al.*, (2008) produced similar results in salads from young shoots during their work on the microbiological

quality of fresh and minimally processed fruits and vegetables, and sprouts from retail establishments.

This strong contamination could be linked to growing conditions and also to processing operations, such as delays in post-harvest refrigeration or processing after receipt of vegetables in the factory (Caponigro *et al.*, 2010). Which is in agreement with the work of Akoachere *et al.*, (2018) who showed that hygiene and poor storage practices for vegetables can aggravate bacterial contamination. Caleb *et al.*, (2012) also showed that the packaging of fresh, minimally processed products (4th range) must have a specific temperature. However, excessive storage temperature would lead to bacterial growth. Delibato *et al.*, (2018) also showed in their study on the persistence of microbial contamination of products that complete decontamination was not achieved in ready-to-eat fresh plant products despite the recommended types of washing. Low temperature storage during our analyzes could also inhibit the growth of the mesophilic aerobic flora as described by Garg *et al.*, (1990). In general, psychrophilic aerobic flora developed more rapidly in the mixed salad composed of young shoots than in the other samples. This result would probably be due to the composition of the salad which could act on the pH. Indeed, an acidic food promotes a significant growth of psychrophilic lactic acid bacteria. Garcia-Gimeno & Zurera-Cosano (1997), showed that the spoilage of mixed salads stored at a temperature of 4 °C was linked to lactic acid bacteria.

The results of the microbiological study showed the presence of mesophilic and psychrophilic aerobic bacteria as well as fungal flora in the salads. When packaging was opened the greatest loads of Mesophilic ($1.73 \cdot 10^8$ CFU/g) and psychrophilic germs ($2.81 \cdot 10^7$ CFU/g) were found in young shoots

and fungal flora (6.80×10^2 CFU/g) in spinach leaves. Despite the adequate conservation conditions recommended after opening the packaging, the counts of microorganisms also showed that after opening the packaging, the imported 4th range salads, sold in supermarkets in Abidjan, are of poor microbiological qualities from the 3rd day of storage period. Thus, strict hygiene and safety measures must be taken in the production chain, in packaging and transport in order to considerably reduce the contamination of 4th range products which are not only an important source of nutrients but also contribute to the disease reduction.

References

- Abadias, M., J. Usall, M. Oliveira, I. Alegre and Viñas, I. 2008. Efficacy of Neutral Electrolyzed Water (NEW) for Reducing Microbial Contamination on Minimally-Processed Vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 123 (1-2): 151-58.
- Adjrah Y., D.S. Karou, B. Djéri, K Anani, Soncy, Y. Ameyapoh, C. de Souza and Gheassor M. 2011. Hygienic quality of commonly consumed vegetables, and perception about disinfecting agents in Lomé. *International Food Research Journal*, 18(4): 1499-1503.
- Akoachere, J.F.T.K., B. F Tatsinkou and Nkengfack, J. M. 2018. Bacterial and Parasitic Contaminants of Salad Vegetables Sold in Markets in Fako Division, Cameroon and Evaluation of Hygiene and Handling Practices of Vendors. *BMC Research*, 11(1): 100.
- Anin L. A., 2016. Evaluation Microbiologique Et Origines De La Contamination Des Produits De 4ème Gamme Vendus Sur Les Marchés D'abidjan, Cote D'Ivoire. *European Scientific Journal*, 12(36): 1857 – 7881.
- Arienzo, A., L. Murgia, I. Fraudentali, V. Gallo, R. Angelini and Antonini, G. 2020. Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods* 9(10): 1421.
- Caponigro, V., M. Ventura, I. Chiancone, L. Amato, E. Parente and Piro, F. 2010. Variation of Microbial Load and Visual Quality of Ready-to-Eat Salads by Vegetable Type, Season, Processor and Retailer. *Food Microbiology* 27 (8): 1071-77.
- Caleb, O J., U. L. Opara and Witthuhn, C. R. 2012. Modified Atmosphere Packaging of Pomegranate Fruit and Arils: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 5 (1): 15-30.
- Cofelice, M., L. Francesco and Cuomo, F. 2019. Quality Control of Fresh-Cut Apples after Coating Application. *Foods* 8 (6).
- Critères Microbiologiques Applicables aux Denrées Alimentaires (CMADA). Lignes directrices pour l'interprétation. Edition Août 2018
- De Giusti M., F.Y. Castro, L. Marinelli, D. Tufi, D. De Medici, S. Di Pasquale, C. De Vito and Boccia A. 2010. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *Journal of applied microbiology* 109(2): 996-1006
- Delibato, E., I. Luzzi, E. Pucci, Y. T. R. Proroga, F. Capuano and De Medici, D. 2018. Fresh Produce and Microbial Contamination: Persistence during the Shelf Life and Efficacy of Domestic Washing Methods. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita* 54(4): 358-63.
- Espenhain, L., M. Riess, L. Müller, S. Colombe, S. Ethelberg, E. Litrup, C. Jernberg, E. Litrup, C. Jernberg, S. Kühlmann-Berenzon, M. Lindblad, N. K. Hove, M. Torpdahl and Mörk, M. J. 2019. Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019. *Eurosurveillance*, 24 (24): 1900368
- Garcia-Gimeno, R. M., and Zurera-Cosano, G. 1997. Determination of ready-to-eat vegetable salad shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 36 (1997) 31-38
- Garg, N., J. J. Churey and Splittstoesser, D. F. 1990. Effect of Processing Conditions on the Microflora of Fresh-Cut Vegetables. *Journal of Food Protection* 53 (8): 701-3.

- MacDonald, E., M. Einöder-Moreno, K. Borgen, L. Thorstensen Brandal, L. Diab, Ø. Fossli, B. Guzman Herrador, A. A. Hassan, G. S. Johannessen, E. J. Johansen, R. Jørgensen Kimo, T. Lier, B. L. Paulsen, R. Popescu, C. Tokle Schytte, K. Sæbø Pettersen, L. Vold, Ø. Ørmen, A. L. Wester, M. Wiklund and Nygård, K. 2016. National Out break of *Yersinia Enterocolitica* Infections in Military and Civilian Populations Associated with Consumption of Mixed Salad, Norway, 2014. *Euro Surveillace: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21 (34):30321.
- Marklinder I. M., M. Lindblad, L. M. Eriksson, A. M. Finnson And Lindqvist, R. 2004. Home storage temperatures and consumer handling of refrigerated foods in Sweden. *Journal of Food Protection*, 67(11): 2570–2577
- Mritunjay, S. K., and Kumar, V. 2017. A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *3 Biotech* 7(1):13
- O’Beirne, D., V. Gomez-Lopez, A. Juan, Tudela, A. Allende and Gil, M. I. 2015. Effects of Oxygen-Depleted Atmospheres on Survival and Growth of *Listeria Monocytogenes* on Fresh-Cut Iceberg Lettuce Stored at Mild Abuse Commercial Temperatures. *Food Microbiology*, 48 (June): 17-21.
- Paudyal N., V. Anihouvi, J. Hounhouigan, M. I. Matsheka, B. Sekwati-Monang, W. Amoa-Awua, A. Atter, N. B. Ackah, S. Mbugua, A. Asagbra, W. Abdelgadir, J. Nakavuma, M. Jakobsen and Fang, W. 2017. Prevalence of Foodborne Pathogens in Food from Selected African Countries - A Meta-Analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 249 (mai): 35-43.
- Pollard C., M. Miller, R. J. Woodman, R. Meng and Binns, C. 2009. Changes in knowledge, beliefs, and behaviors related to fruit and vegetable consumption among western Australian adults from 1995 to 2004. *American Journals of public health*, 99(2): 355-361.
- Schuh, V., J. Schuh, N. Fronza, F. B. Foralosso, S. Verruck, A. Vargas Junior and Silveira S. M.D. 2020. Evaluation of the Microbiological Quality of Minimally Processed Vegetables. *Food Science and Technology*, 40 (2): 290-95.
- Soendjojo, E., 2012. Is Local Produce Safer? Microbiological Quality of Fresh Lettuce and Spinach from Grocery Stores and Farmers’ Markets. *The Journal of Purdue Undergraduate Research*, 2 (1): 54–63
- Toe E., A. Dadié, E. Dako, G. Loukou, M. D. Koffi and Blé, Y.C. (2018). Prevalence and potential virulence of *Escherichia coli* in ready-to-eat raw mixed vegetable salads in collective catering in Abidjan, Côte d’Ivoire. *British Food Journal*, 20(1).
- Valentin-Bon, I., A. Jacobson, S. R. Monday and Feng, P. C. H. 2008. Microbiological Quality of Bagged Cut Spinach and Lettuce Mixes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (4): 1240-42.
- Zhang, Q., G. Q. Shi, G. P. Tang, Z. T. Zou, G. H. Yao and Zeng, G. 2012. A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. *Western Pacific surveillance and response journal*, 3 (October): 39-43.

How to cite this article:

Djédoux Maxime Angaman, N’goran Parfait N’zi and Valérie Carole Gbonon. 2021. Kinetics of Microorganisms in Ready-To-Eat Salads Stored at 4°C Sold in Supermarkets in the City of Abidjan (Côte d’Ivoire). *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 10(03): 1984-1992.
doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1003.253>

Résumé

L'urbanisation dans les pays en développement a entraîné l'apparition de nouvelles habitudes alimentaires. Ainsi, la consommation des produits de la quatrième gamme a pris de l'ampleur et les salades prêtes à consommer sont les plus sollicitées. Cependant, les données sur la consommation et la sécurité sanitaire de ces aliments sont rares dans la table scientifique ivoirienne. Pourtant, les problèmes de sécurité de ces salades persistent à travers le monde et restent un défi pour le grand public surtout pour les pays en développement dont la Côte d'Ivoire. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'évaluer les niveaux de contaminations microbiologiques des salades prêtes à consommer vendues dans les grandes surfaces d'Abidjan afin de prévenir les risques d'expositions aux intoxications alimentaires des consommateurs. A cet effet, l'enquête réalisée auprès d'une frange de la population d'Abidjan a permis de connaître les niveaux de consommation des salades de 4^{ème} gamme dans la capitale économique (Abidjan). Il en ressort que le taux de consommation de ces salades est élevé et est lié à la commune, à la profession et au sexe mais pas aux niveaux d'études. De plus, la consommation de ces aliments serait associée à des cas d'infection dont la diarrhée est le symptôme prédominant. Aussi, la cinétique de la croissance des micro-organismes a révélé une qualité microbiologique insatisfaisante de la plupart des salades avec des risques probables pour le consommateur car les charges moyennes dépassaient les valeurs critiques (10^8 UFC/g pour les bactéries et 10^5 UFC/g pour la flore fongique). Cinq (5) salades (Epinard, Mâche, Roquette, 100 % Cœur de frisée, Carotte) ont prouvé le contraire. Le suivi de la croissance microbienne après ouverture des emballages stipule que les salades de Chênes Vertes, Meli Melo, Papaye et salades composées de Papaye et Mangue, sont plus propices à la croissance des microorganismes. Aussi, la recherche de pathogènes bactériens a permis la mise en évidence de certains pathogènes de portage (*S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp.) dont certains possèdent des gènes de virulence comme les gènes *stx2* (*E. coli*) et *sea* (*S. aureus*). Également, six (6) espèces pathogènes psychrotrophes ont été identifiées. Il s'agit notamment, de *L. monocytogenes*, *L. fusiformis*, *B. cereus*, *S. nepalensis*, *S. fleurettii* et *S. saprophyticus*. Aussi, les profils de résistance des pathogènes bactériens isolés dans les salades prêtes à consommer ont montré des niveaux de résistance élevés face aux antibiotiques. Par conséquent, pour relever le défi de la sécurité alimentaire en Côte d'Ivoire, il serait judicieux de former le personnel de ce secteur d'activité afin de minimiser les larges distributions des bactéries hautement pathogènes et la diffusion de la multirésistance à travers ces aliments.

Mots clés : Salades prêtes à consommer, hypermarché, contamination microbiologique, facteur de virulence, antibiorésistance

Abstract

Urbanisation in developing countries has led to new eating habits. Thus, the consumption of fourth range products has increased and ready-to-eat salads are the most popular. However, data on the consumption and safety of these foods are scarce in the Ivorian scientific table. However, the safety problems of these salads persist throughout the world and remain a challenge for the general public, especially in developing countries such as Côte d'Ivoire. Thus, the objective of this work was to evaluate the levels of microbiological contamination of ready-to-eat salads sold in Abidjan's supermarkets in order to prevent the risks of exposure to food poisoning for consumers. To this end, the survey carried out among a section of the population of Abidjan made it possible to determine the consumption levels of 4th range salads in the economic capital (Abidjan). It was found that the consumption rate of these salads is high and is related to the commune, profession and gender, but not to education levels. Moreover, the consumption of these foods was associated with cases of infection, with diarrhoea being the predominant symptom. Also, the kinetics of the growth of micro-organisms revealed an unsatisfactory microbiological quality of most of the salads with probable risks for the consumer because the average loads exceeded the critical values (108 CFU/g for bacteria and 105 CFU/g for fungi). Five (5) salads (Spinach, Lamb's lettuce, Rocket, 100% Curly heart, Carrot) proved the contrary. The monitoring of microbial growth after opening the packages stipulates that Green Oak, Meli Melo, Papaya and mixed salads with Papaya and Mango are more conducive to the growth of microorganisms. Also, the search for bacterial pathogens allowed the identification of certain pathogens (*S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* spp.), some of which have virulence genes such as *stx2* (*E. coli*) and *sea* (*S. aureus*). Also, six (6) psychrotrophic pathogenic species have been identified. These include *L. monocytogenes*, *L. fusiformis*, *B. cereus*, *S. nepalensis*, *S. fleurettii* and *S. saprophyticus*. Also, the resistance profiles of bacterial pathogens isolated from ready-to-eat salads have shown high levels of resistance to antibiotics. Therefore, in order to meet the challenge of food safety in Côte d'Ivoire, it would be wise to train the personnel of this sector of activity in order to minimise the wide distribution of highly pathogenic bacteria and the diffusion of multidrug resistance.

Key words: Ready-to-eat salads, supermarket, microbial contamination, virulence factor, antibioresistance