



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en biologie

Option : Biochimie appliquée

Thème :

**Etude de l'effet combiné de l'acide lactique
et du chitosane sur la croissance de
quelques bactéries et mycètes pathogènes**

Réalisé par

M^{elle} : **MALKI NASSIMA**

M^{elle} : **BENYACOUB HAYET**

Devant le jury :

Président : Mr Ouelhadj A.

Promoteur : Mr Amrouche T.

Examineur 1 : M^{me} Abdoune-Ouali

Examineur2 : Mr Ferdji A.

Promotion 2014 /2015

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier notre bon Dieu « Tous puissant » de nous avoir accordé la force, le courage et la patience afin de réaliser ce modeste travail.

Au terme de ce travail, nous voulons d'abord adresser à notre promoteur Dr AMROUCHE Tahar à qui on adresse nos sincères remerciements pour avoir dirigé ce mémoire et mis à notre disposition les moyens nécessaires pour le réaliser.

Nos remerciements s'adressent aussi à Dr KADDOUCHE Slimane qui nous a bien accueillis dans son laboratoire chimie de l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, et nous aidé à obtenir le chitosane.

Que toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail soient vivement remerciées.

On tient à remercier aussi Mr KADDOUCHE Slimane qui nous a aidés à suivre notre partie de stage pratique au niveau du laboratoire chimie de l'université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

*Je dédie ce travail à mes
parents qu'ils trouvent ici
toute ma gratitude pour leur
soutien tout le long de mes
études.*

*À tous ceux qui me sont
chers*

Hayet

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont été pour moi la force et le soutien dans tout mon cursus étudiant et qui ont forgé de moi la volonté et l'ambition je vous serais éternellement reconnaissante. Que dieu les protège et leurs donne une vie pleine de bonheur.

A mon cher mari RABAH d'être toujours à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par son amour et sa tendresse, j'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

A mes frères Amayes et Massinissa pour leur disponibilité, leur soutien moral, leur encouragement incessant.

A ma sœur Karima d'être coopératif et d'assumer à ma place certaine de mes responsabilités familiales.

A ma belle-famille pour leur soutien, gentillesse et sympathie.

A toute ma familles tantes et oncles et a tous mes cousins et cousines

A ma meilleur amie Lynda sans oublier mon binôme Hayet

.... NASSIMA



Introduction

Liste des figures

Figure 1: La vitesse de croissance de quelques microorganismes en fonction du pH
Figure 2: Développement des microorganismes en fonction d'activité d'eau
Figure 3: Les principales interactions aliment / microorganisme / consommateur
Figure 4: La formation de métabolites toxiques à partir de protéides
Figure 5: Formes optiques de l'acide lactique (SODERGARD et STOLT ,2002).
Figure 6: Les deux isomères de l'acide lactique (REZGUI <i>et al.</i> , 2008)
Figure7 : Structures chimique de la chitine et du chitosane
Figure 8: Le procédé d'obtention de la chitine et de chitosane (<i>ONSOYEN ET SKAUGRUD, 1990</i>)
Figure 9: Schéma d'une cellule de THOMAS
Figure10: Représentation schématique de la méthode des puits (ZAIKA, 1988)
Figure11 : Les zones d'inhibition des souches bactériennes
Figure 12 : Effet de l'acide lactique sur <i>E.coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>
Figure13 : Effet de l'acide lactique sur <i>B. subtilis</i> et <i>S. aureus</i>
Figure 14 : Effet de l'acide lactique sur <i>C. albicans</i>
Figure15 : Effet de l'acide lactique sur <i>A. niger</i>
Figure 16 : effet de chitosane sur <i>E.coli</i>
Figure 17 : Effet de chitosane sur <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>
Figure 18 : Effet de chitosane sur <i>C. albicans</i>
Figure 19 : Effet de chitosane sur <i>A. niger</i>
Figure 20 : Effet combiné de l'acide lactique et le chitosane sur les souches bacteriennes
Figure 21 : Effet combiné e l'acide lactique et le chitosane sur <i>C. albicans</i>
Figure 22 : le test de la CMB pour les bactéries et la levure traité avec l'acide lactique
Figure 23 : le test de la CMB pour les bactéries et la levure traité avec le chitosane

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des facteurs d'altération des aliments
Tableau II : pH minimum de croissance de quelques germes (Chene, 2002).
Tableau III : Les domaines d'application de l'acide lactique
Tableau IV : Sources potentielles de chitine (Mathur et Narang, 1990)
Tableau V : Activité antimicrobienne du chitosane de quelque microorganismes (Liu <i>et al.</i> , 2001)
Tableau VI : Les domaines d'application de la chitine et le chitosane (KEDDOU, 2008)
Tableau VII : Les échantillons du chitosane selon le temps de traitement avec NaOH
Tableau VIII : Effet de l'acide lactique sur les souches bactériennes (méthode des puits)
Tableau IX : Effets de l'acide lactique sur les souches microbiennes testées (Méthode des spots)
Tableau X : Effets du chitosane sur les souches bactériennes et fongiques
Tableau XI : Effet antimicrobien du mélange d'acide lactique et le chitosane sur les souches microbiennes testées
Tableau XII : Les valeurs de la CMI pour l'acide lactique et le chitosane

Liste des abréviations :

CDC	Centre américain de contrôle des maladies
CMB	Concentration Minimale bactéricide
CMF	Concentration Minimale fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COS	chitooligosaccharides
DD	degré de Désacétylation
DLC	Date Limite de Consommation
DLUO	Date Limite d'Utilisation Optimale
HPLC	High-performance liquid chromatography
MH	Mueller Hinton
OMS	Organisation mondiale de la santé
PPM	partie par million
TIA	toxi infection alimentaire

Table des matières

Sommaire

Liste des figures.....	1
Liste des tableaux.....	2
Liste des abréviations.....	3
Introduction générale.....	4

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Altération microbienne des aliments

I. Définition.....	8
II. Origine et nature de la flore microbienne des aliments.....	8
III. Les types d'altération microbienne.....	9
IV. Le mécanisme d'évaluation de la flore dans l'aliment.....	9
V. Les facteurs d'altération des aliments.....	11
V.1. Les facteurs intrinsèques.....	11
V.2. Les facteurs extrinsèques.....	14
VI. les conséquences.....	15
VI.1. incidence sanitaire de la présence de microorganismes.....	15
VI.2. les maladies alimentaires.....	15
VI.3. Les maladies microbiennes transmises par les aliments.....	16
VI.4. Principales flores et germes de contaminations des aliments.....	18

Chapitre II : Les agents antimicrobiens

I. Définition des agents antimicrobiens.....	19
II. Types d'agents antimicrobiens.....	19
II.1. les agents naturels.....	19
II.2. les agents synthétiques.....	20
II.3. les agents biologiques.....	21
II.4. autres agents.....	21
III. Association d'agents antimicrobiens.....	22
IV. Mode d'action des agents antimicrobiens.....	23
V. Les facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	23
VI. Détermination de la sensibilité/résistance des souches microbiennes aux agents antimicrobiens.....	24
VII. Détermination de la CMI (concentration minimal inhibitrice) des agents antimicrobiens.....	26
VIII. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	26
IX. Aromatogramme avec courbe de concordance.....	26

Chapitre III: Mode d'action des agents antimicrobiens naturels : acide lactique et chitosane

I. Généralités sur les agents antimicrobiens naturels	27
II. L'acide lactique	
II.1. Définition	27
II.2. Origine de l'acide lactique	28
II.3. La structure de l'acide lactique	29
II.4. Les caractéristiques de l'acide lactique	29
II.5. Les propriétés de l'acide lactique	29
II.6. Mécanisme d'action de l'acide lactique.....	31
II.7. Domaines d'utilisation de l'acide lactique.....	31
III. Le chitosane	
III.1. Historique	32
III.2. La Source du chitosane.....	32
III.3. La structure chimique de la chitine et de chitosane.....	33
III.4. Procédés d'obtention de chitine et de chitosane.....	34
III.5. Les caractéristiques du chitosane	35
III.6. Les propriétés du chitosane	36
III.7. Le mécanisme d'action du chitosane.....	37
III.8. Les applications du chitosane.....	38
La partie expérimentale	
A. Matériel et méthodes	39
II.1. Matériel	
II.1.1. acide lactique	39
II.1.2. le chitosane	39
II.1.2.1. Le protocole d'obtention du chitosane.....	39
II.1.3. Les microorganismes	40
II.1.3.1. Les bactéries	40
II.1.3.2. Levures	40
II.1.3.3. Moisissures	40
II.2. Méthodes	
II.2.1. Vérification des souches de référence	41
II.2.1.1. étude macroscopique.....	41
II.2.1.2. étude microscopique	41
II.2.2. Préparation de la suspension microbienne et des solutions des agents antimicrobiens.....	42
II.2.2.1. Préparation de la solution du chitosane	42
II.2.2.2. Préparation des solutions de l'acide lactique.....	43
II.2.2.3. Préparation de la suspension bactérienne et levure	43
II.2.2.4. Préparation de la suspension de spores.....	43

II.2.3. Méthodes utilisées pour détecter l'Effet antimicrobien de chitosane, de l'acide lactique et de leur combinaison	44
II.2.3.1. la méthode de l'antibiogramme	44
II.2.3.2. La méthode des puits	45
II.2.3.3. La méthode des spots	46
II.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	46
II.2. 5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)	47
B. Résultats et discussions	
I. La sélection des échantillons du chitosane	49
II. Evaluation de l'activité antimicrobienne	49
III. Effet antimicrobien de l'acide lactique sur les souches microbiennes	52
IV. Effet du chitosane sur les souches microbiennes.....	56
V. Effet combiné du chitosane et l'acide lactique sur les souches microbiennes	60
VI. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)	64
VII. Les concentrations minimales bactéricides (CMB).....	64
Conclusion générale	66
Références bibliographiques	

Résumé

Cette étude vise d'une part, à évaluer l'activité antimicrobienne de chitosane, principal dérivé de la chitine extraite de la carapace des produits de mer, et de la comparer à celle de l'acide lactique, d'autre part, à déterminer l'effet antimicrobien combiné de ces deux substances. L'activité antimicrobienne a été évaluée sur quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et deux souches fongiques : *Aspergillus niger* et *Candida albicans*; qui sont très impliquées dans les infections microbiennes et dans les phénomènes de résistance aux antibiotiques.

Après application de la méthode des spots, l'acide lactique a montré un effet inhibiteur vis-à-vis des souches fongiques (en particulier *C. albicans*) et un pouvoir antibactérien. Par contre, aucun effet inhibiteur n'a pas été observé dans le cas d'*Aspergillus niger*. Quant au chitosane, il s'est révélé potentiellement inhibiteur vis-à-vis de *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Ce composé inhibe la croissance de *C. albicans*, mais pas celle de *A. niger*. L'association de ces deux substances a permis de mettre en évidence un effet antimicrobien combiné sur les souches testées, l'effet combiné observé est d'autant plus intéressant que les concentrations subinhibitrices sont plus basses que celles obtenues avec chacune des deux substances testées individuellement. Nos résultats laissent suggérer la possibilité d'utilisation de ces combinaisons dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Mots clés:

Chitine, chitosane, acide lactique, activité antimicrobienne, combinaison.

ملخص

تهدف هذه الدراسة من جهة، إلى تقييم النشاط الضد الميكروبي للكيتوزان الذي يعتبر من أهم المواد المستمدة من الكيتين المستخرج من أصداف الحيوانات البحرية، ومقارنتها مع النشاط الضد الميكروبي لحمض اللبن، من ناحية أخرى، تحديد تأثير الجمع بين هاتين المادتين المضادتين الميكروبية. لقد تم تقييم هذا النشاط الضد الميكروبي على أربعة أنواع من البكتيريا و سلالتين من الفطريات التي تشارك في الالتهابات ذات المصدر الجرثومي والظواهر المقاومة للمضادات الحيوية.

بعد تطبيق طريقة البقع، حمض اللبن أظهر تأثير مثبط للسلاسل الفطرية (خاصة: *C. albicans*) ونشاط مضاد للبكتيريا. و لكن لم يلاحظ أي تأثير كايح في حالة *Aspergillus niger*. أما بالنسبة للكيتوزان، فقد اثبت أن له تأثير كايح للبكتيريا. هذا المركب يكبح نمو *C. albicans* ولا يكبح نمو *A. niger*. مزج هاتين المادتين ساعد على توضيح تأثير مجتمع مضاد للميكروبات على السلالات المختبرة أفضل من فعالية كلا المركبين عند استخدامهما بشكل منفصل. تشير نتائجنا إلى إمكانية استخدام هذه المزج في المواد الغذائية والأدوية ومستحضرات التجميل.

الكلمات المفتاح

الكيتين، الكيتوزان، حمض اللبن، البكتيريا و الفطريات، ونشاط مضاد للبكتيريا، مزج.

Abstract

This study aims both, has evaluate the antimicrobial activity of chitosan, main derived from chitin extracted of the carapace of seafood, and comparing to that lactic acid, on the other hand, to be determined the antimicrobial effect combined to these two substances. The antimicrobial activity was evaluated on four microbial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and two fungal strains: *Aspergillus niger* and *Candida albicans*; who are very involved in microbial infections and in antibiotic resistance phenomenons.

After application of the spotlights method, lactic acid has shown an inhibitory effect on the fungal strains (particular in *C. albicans*) and an antibacrerian effect. However, no inhitory effect in *Aspergillus niger*. As to chitosan, he revelated an inhibitory effect in *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. This compound inhibits the growth of *C. albicans*, but not the gowth of *A. niger*. The association of the two substances allowed to bring out the combined antimicrobial effect in the strains tested. The combined effect observed is all the more interesting that the subinhibitory concentrations are lower those obtained with each of the two substances individually tested. Our results suggests leaves the possibility of use of those combination in the food industry , pharmaceuticals, cosmetics.

Key words

Chitin, chitosan, lactic acid, antimicrobial activity, combination, bioconservation.



Introduction

Introduction

En dépit des efforts consentis pour améliorer l'innocuité des aliments par la mise au point de nouveaux procédés de conservation, les empoisonnements d'origine alimentaire n'ont pas significativement diminué au fil du temps (MAPAQ, 2013). En effet, pour 91,8% des intoxications alimentaires enregistrées en 2012, 93,9% étaient d'origine microbiologique et seulement 6,1% étaient d'origine chimique. Présentement, l'innocuité alimentaire représente un enjeu majeur dans le domaine bioalimentaire et celui de la santé publique puisque de 200 à 250 maladies sont transmises par l'intermédiaire d'aliments (CDC, 2000).

Les infections d'origine alimentaire sont causées par différents microorganismes, qui sont principalement des bactéries, des virus, des champignons ou des parasites présents dans certains aliments (fromage, yaourts....etc.).

Pour minimiser ces maladies, il est nécessaire d'ajouter des additifs alimentaires qui protègent les aliments non seulement de la contamination microbienne, mais également des phénomènes d'oxydation (des graisses par exemple). Ils assurent également la qualité du produit jusqu'au moment de sa consommation. Mais malheureusement, ces additifs possèdent plusieurs désavantages lors de leur utilisation dans un aliment puisqu'ils peuvent causer des réactions allergiques, des défauts de saveur et des problèmes pour la santé, exemple des nitrites ajoutés à certains aliments peuvent se transformer en nitrosamines suite à leur ingestion et ces composés peuvent être cancérigènes chez l'humain. Par conséquent, certains des agents antimicrobiens traditionnels présentent des risques pour la santé des consommateurs et leur utilisation est de plus en plus limitée et controversée. Pour cela, on a recours aux conservateurs alimentaires naturels ou bien des agents antimicrobiens et antifongiques naturels comme l'acide lactique et le chitosane, quelle que soit leur utilisation, seul ou bien combiné, ayant la capacité d'inhiber la croissance de ces pathogènes, sans affecter les qualités organoleptiques des aliments.

Les agents antimicrobiens ont un spectre d'action très large puisqu'ils inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique. Ils agissent en empêchant la multiplication des bactéries et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse (production de pseudomycelium) alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Actuellement, la fréquence des infections microbiennes a connu une augmentation considérable, ceci en raison de l'usage intensif des agents antibactériens et antifongiques d'origine chimique. D'un autre côté, le chitosane et certains métabolites microbiens commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives, de ce fait, elles font l'objet d'une panoplie d'études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses et pour l'augmentation de la durée de conservation des aliments sans nuire à la santé du consommateur.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail, il a pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne et antifongique de l'acide lactique et le chitosane testés individuellement et en combinaison (association). Dans la première partie nous apportons les données de la littérature sur l'altération microbienne des aliments, les agents antimicrobiens et le mécanisme d'action de ces agents antimicrobiens naturels : acide lactique et chitosane.

La seconde partie est consacrée à la réalisation expérimentale, elle consiste dans un premier temps en l'obtention du chitosane à partir de la chitine issue des crevettes et de l'acide lactique prêt à utiliser, trois méthodes ont été par la suite utilisées (méthode des disques, des puits et la méthode des spots) en vue de déterminer l'activité antimicrobienne des agents antimicrobiens utilisés (acide lactique - chitosane) seuls et combinés par appréciation des zones d'inhibition obtenues par chaque agent seul et combiné et pour chaque souche microbienne utilisée.

Partie bibliographique

An orange scroll banner with a light gradient and rounded corners, featuring a small scroll detail on the left side. The text is centered on the banner.

Chapitre I : Altération microbienne des aliments

I.1. Historique

L'espèce humaine a diminué sa dépendance à l'égard de la chasse et de la pêche dès qu'est apparue l'agriculture. Il est alors devenu impératif de trouver un moyen de conserver le surplus d'aliments. Dès 3000 ans av. J-C., le sel a été utilisé pour conserver la viande. La fumaison du poisson, la production de vin et l'utilisation de fromages et de lait caillé furent également introduites à cette époque. Malgré les efforts déployés pour empêcher que les aliments se détériorent, ce n'est qu'au 19^{em} siècle que l'altération microbienne fut étudiée. Ce fut Louis Pasteur, qui ouvrit l'ère moderne de la microbiologie alimentaire. En 1857, il démontra que c'était des microorganismes qui gâtaient le lait. D'autres travaux de Pasteur démontrèrent que la chaleur était un élément qui permettait de contrôler les microorganismes présents dans le vin et la bière (BECILA, 2009).

I.2. Définition

Une altération microbienne résulte d'une contamination "naturelle" suivie soit de la mort, de la survie ou de la prolifération des germes.

La charge microbienne "normale" de la plupart de nos aliments est de l'ordre de 10⁴/g. Il y a mort quand les microorganismes ne trouvent pas dans l'aliment les conditions nécessaires à leur croissance (nutriments, conditions d'entreposage, traitements antimicrobiens...). La survie des microorganismes est liée à des conditions n'engendrant pas la mort mais ne permettant pas la multiplication (composition, froid ...). Il y a prolifération quand les microorganismes trouvent les conditions nécessaires à leur croissance. Dans ce cas généralement défavorable il y a altération de la qualité marchande si les germes sont saprophytes et altération de la qualité sanitaire si les germes sont "pathogènes". Dans la nature, les proliférations microbiennes par succession de flores ont pour finalité de minéraliser complètement le produit (dans le cas de microorganismes hétérotrophes). La notion de charge microbienne en relation avec la qualité du produit, en fonction de la nature du produit et de la nature du germe présent (JEAN, 2007). .

II. Origine et nature de la flore microbienne des aliments :

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux (GUIRAUD *et al.*, 1998).

De ce fait, tous les produits alimentaires transformés ou non peuvent être contaminés par des microorganismes.

La contamination des denrées alimentaires peut avoir un effet plus ou moins grave sur la qualité du produit et sur la santé du consommateur. Elle peut être à l'origine d'une altération du produit, lui faisant perdre ses caractéristiques organoleptiques et/ ou commerciales et parfois la cause d'intoxications ou toxi-infections graves.

Les aliments sont d'origine végétale ou animale. La flore normalement associée aux plantes et aux animaux est donc potentiellement présente (GUIRAUD *et al.*, 1998). De plus, un apport microbien exogène est souvent inévitable (environnement, contact, manipulations, etc...).

III. Les différents types d'altération

Il existe en effet différents types d'altération (JOFFIN et JOFFIN, 2003) :

- **Altération physique** Ex : Chocs, blessures, changements d'état, variation de la teneur en eau, changement de couleur.
- **Altération chimique et biochimique** Ex : Oxydation (rancissement) Par les enzymes (Brunissement enzymatique, lyses, destruction des vitamines et de certains nutriments)
- **Altération microbienne** Est sans doute la forme la plus connue et la plus risquée. Ex : Fermentation

IV. L'évolution de la flore microbienne dans l'aliment :

Le comportement de la flore microbienne (GUIRAUD *et al.*, 1998) va dépendre de plusieurs types de facteurs :

- Le niveau de contamination initiale ;
- Les propriétés et exigences des micro-organismes ;
- La nature des aliments ;
- Les conditions de l'environnement ;
- Les traitements technologiques.

Les propriétés intrinsèques des aliments et les facteurs extrinsèques appliqués aux aliments influenceront les mécanismes d'altération microbiennes, chimiques, biochimiques et physiques des aliments qui résulteront en une perte de la qualité. Parlant de la qualité on distingue :

- La qualité marchande

Concerne essentiellement les caractéristiques organoleptiques (GUIRAUD *et al.*, 1998) et se traduit par un attrait ou une répugnance par les consommateurs. Ces incidences économiques sont déterminantes pour l'industrie alimentaire.

Les microorganismes les plus souvent rencontrés appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Clostridium sporogones* et *Flavobacterium* (ROUSSARY, 2010)

- Qualité hygiénique

L'innocuité d'un aliment correspond à une qualité seuil et la norme zéro défaut doit être atteinte pour certaines variétés d'aliments, en particulier à partir du moment où la présence du microorganisme dans le produit risque d'avoir une incidence défavorable et parfois très grave sur la santé du consommateur (ROUSSARY, 2010)

- Qualité physico-chimique

La nature de l'aliment et son environnement vont conditionner les possibilités de survie et de développement de divers constituants de la flore. Les conditions trouvées par un germe peuvent être favorables ou non (GUIRAUD *et al.*, 1998).

Lorsqu'un germe ne trouve pas dans un aliment les conditions favorables à son développement, il meurt (Guiraud *et al.*, 1998). Lorsque celles-ci existent, le développement intervient. Il peut être très rapide.

Ce développement se manifeste par une augmentation de la biomasse microbienne qui se traduit par un accroissement du nombre de germes et par les manifestations du métabolisme microbien : Dégradations et libération de métabolites (GUIRAUD *et al.*,1998).

- **A partir des glucides de l'aliment (et dérivés)**

- polymères (amidon, cellulose) hydrolyse : texture modifiée ;
- dimères et monomères (saccharose, maltose, lactose, glucose, fructose, etc.) : fermentations ;
- formation d'acides et de composés carbonylés par exemple : incidence sur le goût et l'arôme.

- **A partir des protides de l'aliment (et dérivés)**

- polymères (protéines) : hydrolyse : texture modifiée ;
- polymères (protéines) : hydrolyse : texture modifiée
- acides aminés : décarboxylation, désamination, désulfuration etc. : modifications du goût, de l'odeur, formation de catabolites toxiques.

- **A partir des lipides de l'aliment (et dérivés)**

- oxydation et lipolyse (goût).

Les aliments vivent, vieillissent et meurent selon des cycles biologiques naturels .On a inventé des termes (DLC et DLUO) pour indiquer les durées de conservations des produits (BECILA, 2009) :

- a) Durée de vie et dégradation alimentaire ;
- b) La dégradation microbienne.

a) Durée de vie et dégradation alimentaire

Le terme vie est assez souvent employé pour désigner la période pendant laquelle des denrées conservent les propriétés compatibles avec l'usage qui leur est destiné.

Ainsi en parlant de vie commerciale d'une denrée il est indiqué par là qu'à partir d'une certaine date elle n'offrira plus toutes les qualités requises pour être vendue. Parfois cette date d'ultime utilisation est indiquée sur le conditionnement. On peut parler aussi de durée d'utilisation (BECILA, 2009). Il s'agit de :

- DLC : Date Limite de Consommation : elle signifie qu'à partir du jour figurant sur son conditionnement l'aliment est inconsommable, qu'il ne peut plus être consommé car le niveau du risque pour le consommateur n'est plus négligeable ; Le danger est de nature microbienne.

- DLUO : Date Limite d'Utilisation Optimale : elle indique que l'aliment est altéré et ne présente plus forcément les caractères organoleptiques (couleur, texture, consistance, odeur, goût, saveur...) qui en composent la qualité recherchée.

Pour autant le produit n'est pas dangereux et peut être consommé sans crainte.

Certains produits s'améliorent avec le temps. Il en est ainsi de certaines salaisons, conserves, fromages: c'est une question de goût. D'autres peuvent s'altérer.

b) Dégradation microbienne

Les microorganismes ne se contentent pas de décolorer la nourriture, de la dégrader ou de la rendre très désagréable à sentir et à manger ; ils peuvent également représenter de sérieux dangers pour la santé publique (BECILA, 2009).

Les micro-organismes présents dans un produit alimentaire proviennent soit des matériaux crus, des ingrédients utilisés, sinon d'une contamination (DEBRAIN, 2006).

Les moyens par lesquels ces micro-organismes contaminent les aliments sont variés et dépendent à la fois des organismes présents et du produit alimentaire qui leur sert de support.

La capacité de ces microorganismes à se développer et à causer des dommages dépend des propriétés intrinsèques de la nourriture et de facteurs extrinsèques appliqués à la nourriture. Les dégradations visibles d'origine microbienne peuvent prendre différentes formes parmi lesquelles la décoloration, la dépigmentation, l'épaississement de la surface, un aspect trouble ou la décomposition (DEBRAIN, 2006).

V. Les facteurs d'altération des aliments :

On peut classer les facteurs d'altération des aliments selon leur caractère intrinsèque ou extrinsèque (BECILA, 2009). La classification des facteurs d'altération des aliments est illustrée dans le Tableau I:

Tableau I: Classification des facteurs d'altération des aliments (BECILA, 2009).

Facteurs intrinsèques	Facteurs extrinsèques
- pH	- température
- humidité, activité ou disponibilité de l'eau	- humidité relative
- potentiel d'oxydo- réduction	- gaz présents (CO ₂ , O ₂)
- structure physique de l'aliment	- types et quantités de microorganismes
- présence d'agents antimicrobiens naturels	ajoutés

V.1. Facteurs intrinsèques

V.1.1. Le pH

Le pH est un facteur très important. A un pH faible, le développement des levures et des moisissures est favorisé. A un pH neutre ou alcalin, ce sont les bactéries qui prédominent au cours du processus de pourrissement ou de putréfaction

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

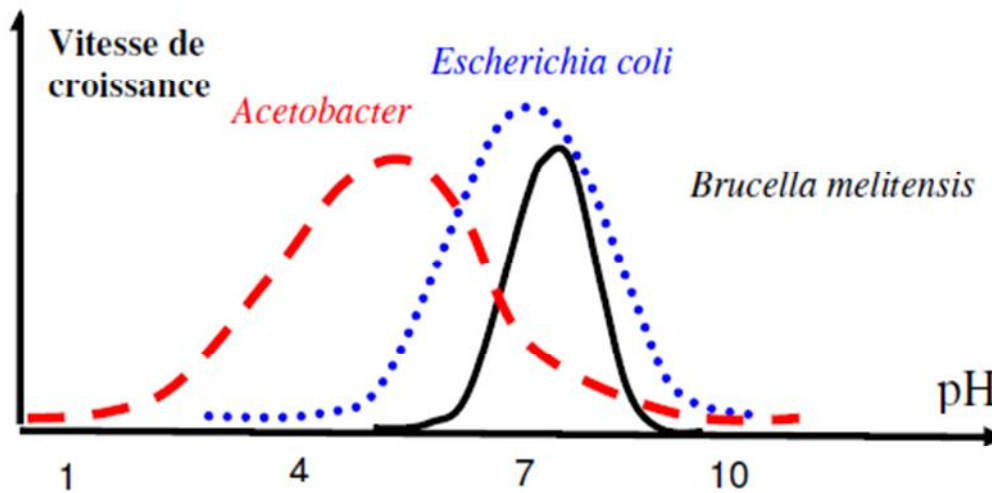


Figure 1: La vitesse de croissance de quelques microorganismes en fonction du pH (LOUIS, 2007).

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

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

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

Dans les aliments dont le pH est compris entre 4,5 et 9,5, de nombreuses altérations sont susceptibles de se produire et la plupart des bactéries pathogènes cultivent dans ces conditions. Le pH de l'aliment favorisera d'autant mieux la prolifération qu'il sera voisin du pH optimum de croissance (LOUIS, 2007).

V.1.2. L'activité de l'eau

La disponibilité de l'eau a un effet sur la capacité des microorganismes à se multiplier. Plus l'eau est disponible en grande quantité, plus il sera facile de coloniser un aliment (BAZINET et CASTAIGNE, 2014). C'est pourquoi on limite cette eau disponible en séchant les aliments par le séchage, la lyophilisation et la déshydratation. Il y a aussi une autre façon de réduire l'eau disponible tout en ne diminuant pas la quantité totale d'eau. Il s'agit d'ajouter des solutés comme du sel ou du sucre que l'on appelle des agents humectants. De cette façon, l'eau se lie à ces solutés et n'est donc plus disponible pour les microorganismes. C'est entre autres pour cette raison qu'on ajoute de grandes quantités de sucres aux confitures et beaucoup de sel aux marinades et poissons (BAZINET et CASTAIGNE, 2014).

Le développement des microorganismes dépend, comme le montre la Figure 2, de l'activité de l'eau dans l'aliment.

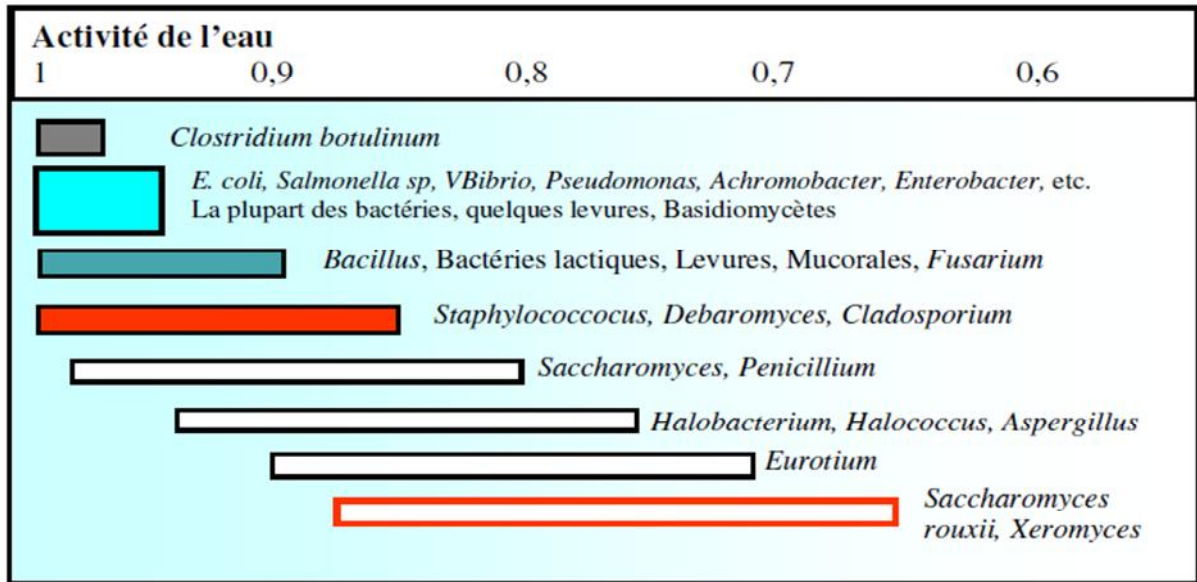


Figure 2: Développement des microorganismes en fonction d'activité d'eau (LOUIS, 2007).

Le très fort pourcentage de mortalité microbienne observé au cours de la déshydratation, du salage, de l'addition de sucres ou de la congélation est dû, en grande partie, à la diminution d'activité de l'eau (LOUIS, 2007).

V.1.3. Le potentiel d'oxydo-réduction

Un faible potentiel d'oxydo-réduction favorise le développement de microorganismes. Par exemple, les produits carnés, comme les bouillons, contiennent beaucoup de molécules qui sont directement disponibles pour les microorganismes, puisque leur potentiel d'oxydo-réduction est faible (LOUIS, 2007).

V.1.4. Composition chimique de l'aliment

Pour proliférer, les microorganismes doivent trouver dans l'aliment des substances nutritives. Rappelons que les microorganismes dangereux sont pour la plupart hétérotrophes chimio-organotrophes et doivent donc trouver leur énergie dans les composants de l'aliment. Ils doivent aussi y trouver de l'eau, une source d'azote, des minéraux et pour certains des vitamines et des facteurs de croissance (GILLESPIE *et al.*, 2011).

Plus la diversité de composition d'un aliment est grande (produits animaux tels que les viandes et dérivés, le lait ...) et plus sa susceptibilité à servir de milieu de culture est grande. (LOUIS, 2007)

V.1.5. La structure physique :

Cette caractéristique a un grand rôle à jouer dans la multiplication des microorganismes. Le broyage ou le hachage des aliments augmente la surface de la nourriture et brise les cellules. De cette façon, les germes contaminants peuvent se retrouver partout dans les aliments et rendre le produit insalubre. Si on compare un steak à une boulette de boeuf haché, la dernière est beaucoup plus susceptible d'être contaminée rapidement. De plus, la présence de pelures pour les fruits et légumes agit un peu comme une barrière contre les microorganismes (KENNY et ROLLINS, 2007)

V.1.6. La présence d'agents antimicrobiens naturels

On trouve des agents antimicrobiens naturels dans plusieurs aliments. Ceux-ci inhibent la croissance de certains microorganismes. Par exemple, les épices contiennent souvent ce genre d'agent. La sauge et le romarin sont les deux épices les plus antimicrobiennes. Dans la cannelle, la moutarde et l'origan, il y a d'autres inhibiteurs chimiques. L'ail contient de l'allicine et le clou de girofle de l'eugénol (c'est la molécule organique donnant l'odeur caractéristique du clou de girofle). Ces deux produits sont aussi des antimicrobiens. La coumarine, une enzyme présente dans les fruits et légumes, agit aussi comme un antimicrobien (DION, 2000).

Le lait frais contient des lacténines et des facteurs anti-coliformes à activité limitée dans le temps. L'œuf contient du lysozyme actif sur des germes à Gram positif. Les airelles contiennent de l'acide benzoïque actif sur les levures et moisissures ; des composés comme le thymol (thym) ou l'aldéhyde cinnamique (cannelle) ont des activités antimicrobiennes. (LOUIS, 2007)

Cependant, le fait d'avoir ces inhibiteurs en eux ne protège pas les aliments de l'attaque de tous les microorganismes. Les antimicrobiens naturels protègent contre des microorganismes précis, mais d'autres pourront tout de même survivre dans le milieu (DION, 2000).

V.2. Les facteurs extrinsèques

V.2.1. La température et l'humidité relative du milieu

Ce sont les deux facteurs les plus importants lorsque l'on parle de l'avarie d'un aliment. Une humidité relative élevée est favorable aux microorganismes, même si la température est basse. Si les réfrigérateurs n'ont pas de dégivrage, le milieu devient très humide et permet alors la multiplication des germes microbiens. De plus, si on place un aliment très sec dans un milieu humide, l'aliment aura tendance à absorber très rapidement l'humidité et à offrir aux microorganismes un environnement favorable à leur croissance (BRUNETON, 1999).

L'humidité relative du lieu d'entreposage influe à la fois sur l'activité de l'eau de l'aliment (équilibre dynamique) et sur la croissance des microorganismes à la surface de cet aliment. Par exemple quand un aliment a une activité d'eau de 0,6 il faut éviter que les conditions d'humidité relative de l'atmosphère environnante ne conduisent à une augmentation de l'activité d'eau en surface jusqu'à une valeur compatible avec une croissance microbienne (BORGES, 2014).

V.2.2. La présence de gaz

Si on emballe des aliments dans une pellicule plastique, cela favorise la diffusion de l'oxygène. Ceci permet donc la croissance de contaminants microbiens superficiels. Pour ce qui est du gaz carbonique (CO₂), sa présence nuit à plusieurs microorganismes. Un excès de ce gaz permet d'abaisser le pH et ainsi de limiter la croissance des agents microbiens. Par contre, d'autres organismes vont très bien croître, même en présence de gaz carbonique (BORGES, 2014).

Par exemple une augmentation de la teneur en anhydride carbonique (jusqu'à 10 %) et une diminution de la teneur en oxygène permettent une meilleure conservation des fruits et légumes en retardant le développement de certains microorganismes et plus particulièrement des moisissures (LOUIS, 2007).

V.2.3. Les produits antimicrobiens au cours de la fabrication del'aliment

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

L'addition de composés antimicrobiens aux produits alimentaires (additifs) ou l'utilisation d'agents antimicrobiens divers dans l'environnement de production des aliments (agents de désinfection, de nettoyage, etc.) est réglementée(LESAGE, 2013).

VI. Les conséquences

VI.1. Incidences sanitaires de la présence de micro-organismes

La prolifération non contrôlée de micro-organismes dans un aliment peut poser des problèmes au niveau industriel, mais aussi au niveau sanitaire. Les risques encourus varient en fonction de nombreux paramètres(ROUSSARY, 2010) :

- Nature du micro-organisme ;
- Niveau de contamination (dose infectante) ;
- Nature de l'aliment ;
- L'état physiologique du consommateur.

VI.2. Maladies alimentaires

Des germes dangereux dits pathogènes (GUIRAUD *et al.*, 1998) se développent dans les aliments entraînant deux types de maladies alimentaires :

- Les toxi-infections ou intoxications ;
- Les maladies à infection alimentaire.

Les infections alimentaires sont des maladies d'origine alimentaire qui surviennent lors de l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminés par des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, parasites). Ceux-ci prolifèrent dans l'organisme, s'y multiplient et produisent

des troubles. il s'agit d'une infection, en général de nature infectieuse ou toxique (LESAGE, 2013).

VI.3. Les maladies microbiennes transmises par les aliments

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

Chaque système aliment / microorganisme / consommateur est particulier. Néanmoins il est possible de schématiser (Figure 3) les principales interactions susceptibles de se produire de la façon suivante (LOUIS, 2007) :

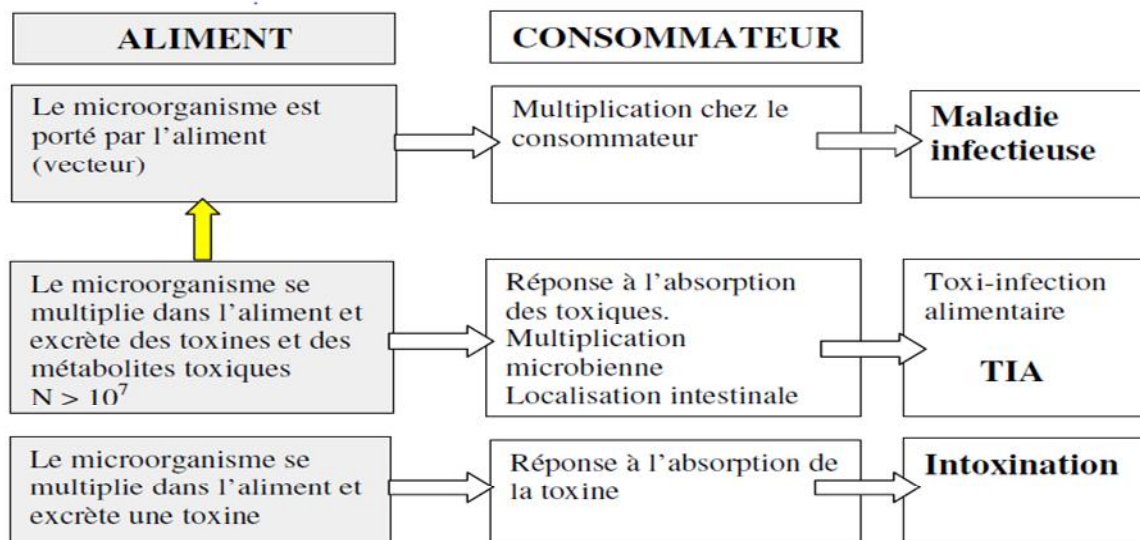


Figure 3: Les principales interactions aliment / microorganisme / consommateur (LESAGE, 2013).

VI.3.1. Les maladies infectieuses

Parmi les maladies infectieuses d'origine alimentaire, les plus fréquemment rencontrées résultent de l'ingestion des microorganismes appartenant aux genres *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Yersinia*, *Vibrio* et de l'ingestion de virus (BOUZA, 2009)

Ces microorganismes se comportent vis-à-vis de l'organisme comme des parasites et se multiplient en utilisant des composants de l'organisme comme nutriments. Ils sont invasifs, souvent toxigènes, et provoquent alors des lésions au niveau du tractus digestif mais aussi au niveau d'autres tissus (septicémie).

Il existe des microorganismes qui libèrent leur toxine dans l'organisme hôte tels que *Clostridium perfringens* (toxines A, B, C, D ou E), *Shigella*, *Escherichia coli* entérotoxigènes (toxines thermostable et thermolabile) (VAILLANT *et al.*, 2011)

La présence d'aucun de ces microorganismes n'est acceptable dans les aliments en raison du risque qu'ils font courir au consommateur. En conséquence leur recherche se fait par la méthode présence / absence (ou tout ou rien) et la norme est "absence dans.." (LOUIS, 2007).

VI.3.2. Les toxi-infections

Les toxi-infections sont produites par de très nombreux germes et correspondent à l'ingestion d'un produit alimentaire dans lequel la prolifération des microorganismes atteint 10^6 à 10^7 par gramme. La formation de métabolites toxiques à partir de protéides est fréquente (RAMSAY, 2011)

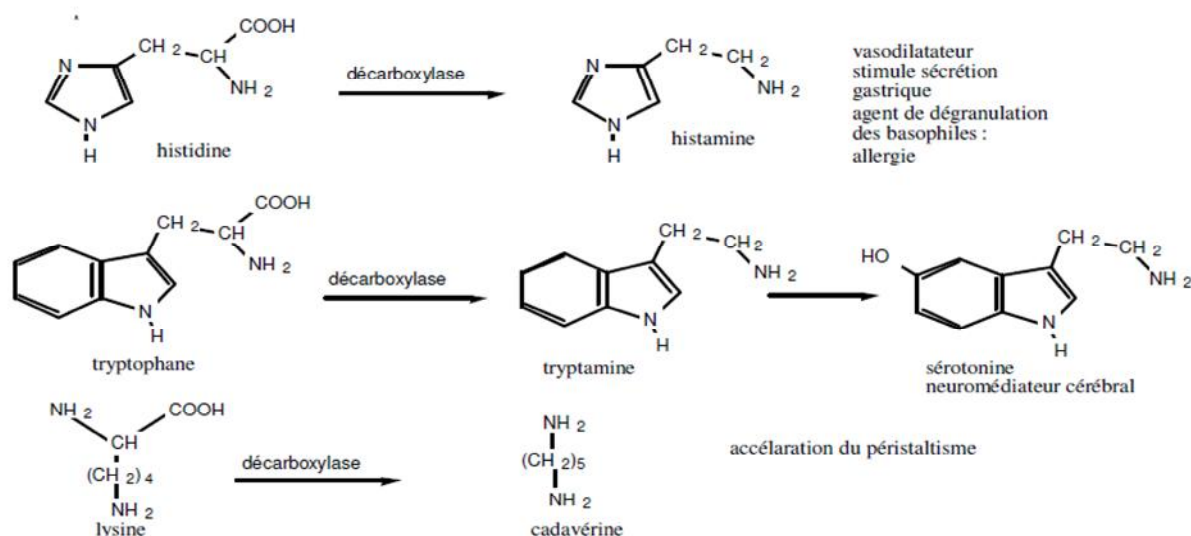


Figure 4: La formation de métabolites toxiques à partir de protéides (RAMSAY, 2011)

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

La prolifération des microorganismes reste le plus souvent localisée au niveau du tractus digestif et se traduit par des syndromes variables selon les microorganismes : crampes abdominales, une diarrhée, des vomissements, la présence de sang dans les selles, de la fièvre, des céphalées (PANISSET *et al.*, 2003)

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

Les risques encourus par le consommateur ne deviennent significatifs qu'à partir d'un niveau de contamination relativement élevé (10^6 /g par exemple) ce qui implique que la norme qualité hygiénique des produits alimentaires contaminés par ces microorganismes est voisine d'une centaine de germes /g ou/ ml. Elle dépend évidemment du type de consommateur, de la nature et des conditions de fabrication et de conservation de l'aliment et de l'espèce microbienne. Une numération est alors réalisée pour évaluer la qualité hygiénique du produit (LOUIS, 2007).

VI.3.3. Les intoxications

Les intoxications résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*.

Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*C. botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*) (LESAGE, 2013).

Dans le cas de l'intoxication botulique, le risque pour la santé du consommateur étant extrêmement grand, aucune norme ne peut permettre de contrôler l'inocuité du produit.

Dans ce cas, il faut donc adopter des conditions de fabrication - conservation qui garantissent de façon absolue la qualité sanitaire du produit.

Chaque système microorganisme - aliment - consommateur permet donc de définir la qualité hygiénique et une normalisation évidente en résulte. Plus le risque est grand et plus le niveau de tolérance dans l'aliment sera faible (ROUSSARY, 2010).

VI.4. Principales flores et germes de contaminations des aliments

Les aliments sont rarement stériles en profondeur et jamais en surface, souvent contaminés de façon primaire, ils le sont systématiquement de façon secondaire lors des diverses manipulations auxquelles ils sont soumis (BECILA, 2009).

Certains contaminants (bactéries, champignons, levures) ne présentent aucun inconvénient, ni pour le produit ni pour ceux qui le consommeront.

En revanche, d'autres sont susceptibles de nuire gravement à la santé humaine (flore pathogène) ou de mettre en péril la vie commerciale de la denrée (flore d'altération) (BECILA, 2009).

VI.4.1. Flore d'altération

Les germes d'altération sont responsables de modifications d'aspect, de texture, de consistance ou de saveur de la denrée alimentaire ainsi que d'une diminution de la durée de conservation (BECILA, 2009).

Parmi ces germes, nous retiendrons particulièrement les Entérobactéries, *les levures* et *Moisissures* et *Pseudomonas* car ils sont en plus des indicateurs spécifiques d'aspects défectueux du processus de fabrication (JEQUEL, 2013)

VI.4.2. Flore pathogène

Le terme pathogène signifie naissance de la douleur c.-à-d qui entraîne une maladie. Les germes pathogènes ou les bactéries pathogènes sont responsables de maladies. Le pouvoir pathogène ou pathogénicité d'une bactérie est donc sa capacité à provoquer des troubles chez un hôte. Il dépend de son pouvoir invasif (capacité à se reproduire dans les tissus et à y établir des foyers infectieux), et de son pouvoir toxigènes (capacité à produire des toxines) (BOUZA, 2009). On distingue deux catégories de bactéries pathogènes :

- **Strictes ou spécifiques** : Ces bactéries provoquent des troubles quel que soit le patient, sauf dans le cas des porteurs sains.
- **Opportunistes** : Ces bactéries provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies (BECILA, 2009).

Chapitre II : Les agents antimicrobiens

I. Définition des agents antimicrobiens

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (ASADA *et al.*, 1998). Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus forts que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (PERRY *et al.*, 2002).

En d'autres termes, agent antimicrobien est toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (CE, 2001).

II. Types d'agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action (EUZEBY, 2005).

Les Agents antimicrobiens peuvent être des substances naturelles (chitosane, acide lactique...), semi-synthétiques ou synthétiques (alcools, aldéhydes...) qui, aux concentrations observées *in vivo*, possède une activité antimicrobienne (c'est-à-dire qu'elle tue ou inhibe la croissance des micro-organismes).

On distingue trois types d'agents antimicrobiens selon leur nature : agents naturels, agents synthétiques (chimiques) et agents biologiques (GUIRAUD, 2003).

II.1. Les agents naturels

II.1.1. Le chitosane

Le chitosane est un produit naturel obtenu par désacétylation de la chitine à partir de la carapace des crustacés (crabes, crevettes) par des processus chimiques ou microbiologiques. Il peut aussi être produit par certaines moisissures (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*). Ce polymère est utilisé comme agent antimicrobien et antifongique (BENABBOU, 2009) et antitumoral (TOKORO *et al.*, 1988; JEON et KIM, 2002)

II.1.2. Acide lactique

L'acide lactique est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants, et représente l'un des acides organiques les plus importants (GIVRY, 2006). Ces acides organiques sont des agents classiques de préservation des aliments (BRUL *et al.*, 1999) et sont reconnus comme des additifs alimentaires et des agents antimicrobiens.

II.1.3. Les huiles essentielles :

Elles ont reçu le nom d' « huiles essentielles » en raison de leur aspect huileux et du parfum, souvent agréable, qu'elles dégagent. Elles sont dites pures et naturelles lorsqu'elles ne contiennent aucun corps gras, et qu'elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (BACHELOT *et al.*, 2006).

L'huile essentielle peut avoir des propriétés différentes suivant la partie de la plante dont elle est extraite, par exemple, l'huile essentielle de coriandre, issue des fruits mûrs et secs, est tonique, euphorisante et anti-infectieuse. Tandis que tirée de la feuille, elle se révèle sédative et anti-inflammatoire (GIRARD, 2010).

Selon GIRARD (2010), dans la mesure où les huiles essentielles sont lipophiles, elles passent facilement les parois cellulaires et cytoplasmiques en provoquant des dommages irréversibles pour ces parois. C'est ce qui leur confère une grande cytotoxicité. Elles augmentent notamment la perméabilité de ces parois ce qui leur confère le pouvoir antiseptique, antibactérien, antiviral, antifongique, et le pouvoir antiparasitaire.

II.2. Les agents synthétiques (agents chimiques)

Sont des antiseptiques et désinfectants dont le choix dépendra de l'usage que l'on veut en faire, de leur activité, de leur toxicité et de leur stabilité, parmi ces agents chimiques on distingue :

II.2.1. Les alcools

Les alcools sont les désinfectants et les antiseptiques les plus largement utilisés, ils sont bactéricides et fongicides mais non sporicides ; certains virus contenant des lipides sont également détruits, les deux alcools germicides les plus populaires sont l'éthanol et l'isopropanol, habituellement utilisés à une concentration variant de 70 à 80%.

Ils agissent en dénaturant les protéines et peut-être en dissolvant les lipides membranaires (PRESCOTT *et al.*, 2007).

II.2.2. Les phénols

Les composés phénoliques jouissent de propriétés bactériostatiques ou bactéricides marquées grâce à leur fonction phénol mais ils sont peu actifs sur les spores bactériennes (LECLERC, 1995). Ces substances agissent par dénaturation des protéines et par altération des membranes cellulaires (PRESCOTT *et al.*, 2007).

II.2.3. Les aldéhydes

Ce sont de puissants agents antimicrobiens, les deux aldéhydes les plus couramment utilisés, le formaldéhyde et le glutaraldéhyde qui sont des molécules très actives qui se combinent aux acides nucléiques et aux protéines, ils les inactivent par pontage et alkylation, ils sont sporicides et peuvent être employés comme stérilisants chimiques (PRESCOTT *et al.*, 2007).

Parlant des agents synthétiques on peut citer également des additifs alimentaires qui sont des conservateurs chimiques (E200 à E 297), qui sont utilisés dans le but de prolonger la durée de conservation des aliments (NAFTI, 2011).ceux ci ont divers origines : animale, végétal et microbien.

Les conservateurs chimiques n'ont pas la capacité de rendre sain un produit qui ne l'était pas avant son traitement, ni d'améliorer la qualité d'un mauvais produit ; ils peuvent seulement conserver au produit ses caractéristiques initiales plus longtemps qu'à l'ordinaire.

On cite : peroxyde d'hydrogène, sels de sodium, potassium ou calcium...etc (NAFTI, 2011).

II.3. Agents biologiques :

L'activité spontanée ou induite de microorganismes peut stabiliser un milieu ou éviter tout danger d'ordre sanitaire. Ces propriétés peuvent résulter de la production de métabolites comme des acides ou des composés à activité antimicrobienne, comme des nitrites à partir de nitrates, les antibiotiques, mais aussi de la destruction de substrats qui pourraient servir à des germes pathogènes,... etc.

Certains microorganismes sont des prédateurs pour d'autres microorganismes (protozoaire, bactériophages,) (GUIRAUD, 2003).

II.4. Autres agents

La plupart des agents physiques antimicrobiens sont efficace sur l'ensemble des microorganismes (GUIRAUD, 2003). Les agents les plus fréquemment utilisés sont :

II.4.1. La chaleur

La chaleur est l'un des moyens le plus courant de destruction des microorganismes, il faut distinguer deux grands types d'applications : la chaleur humide (vapeur saturée) et la chaleur sèche (circulation d'air) (PRESCOTT *et al.*, 2007).

Selon l'intensité de la chaleur et la durée d'exposition (température /temps) ; plusieurs techniques sont utilisées, stérilisation, pasteurisation et leurs variantes. On trouve également la déshydratation qui est une technique physique de conservation des aliments qui consiste à éliminer, partiellement ou totalement, l'eau contenue dans l'aliment (EMILIE, 2012).

II.4.2. Le froid

Le froid entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes.

La réfrigération qui utilise une température proche de 0°C à 4°C empêche la multiplication de nombreux germes mais pas celle des germes psychrophiles.

La congélation à -18°C et la surgélation (-40°C et même -80°C) permettent une stabilisation totale vis-à-vis des microorganismes et entraînent une mortalité plus au moins importante selon la nature des germes et la vitesse de refroidissement (GUIRAUD, 2003).

II.4.3. Les radiations

Certaines radiations électromagnétiques détruisent les microorganismes, leur efficacité est liée à la puissance énergétique qui est fonction de la longueur d'onde : plus celle-ci est faible et plus la radiation est énergétique et donc efficace.

Des effets directs se manifestent à partir des longueurs d'onde inférieures à 300 nm. Une irradiation ionisante est liée à la formation d'ions par perte d'électrons, ceci entraîne des dénaturations et donc un effet létal pour les microorganismes (GUIRAUD, 2003).

III. Association d'agents antimicrobiens

D'après PIBIRI (2005), les effets antimicrobiens des combinaisons d'agents antimicrobiens, sont définis selon quatre interactions possibles :

- **Indifférence** : l'activité d'un agent antimicrobien n'est pas affectée par d'autres agents antimicrobiens.
- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque agent antimicrobien étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque agent antimicrobien étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des agents antimicrobiens. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque agent antimicrobien pris séparément.

IV. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

IV.1. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-champignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti-protozoaires)(BOUSSEBOUA, 2006).

IV.2. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer(bactérie ou champignon) (BOUSSEBOUA, 2006). Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue (GUIRAUD, 1998)

V. Les facteurs influençant l'activité antimicrobienne

La destruction des microorganismes ou l'inhibition de leur développement n'est pas simple car l'efficacité d'un agent antimicrobien dépend d'au moins six facteurs :

V.1.Taille de la population microbienne

Plus la population microbienne est initialement importante, plus il faudra de temps pour la réduire fortement et aller jusqu'à la destruction.

V.2. Composition de la population

L'efficacité d'un agent varie fortement avec le type de microorganismes traité car tous n'ont pas la même sensibilité exemple ; les spores bactériennes sont en général plus résistantes à la plus part des traitements que les formes végétatives, des cellules jeunes sont en général plus sensibles que des cellules issues d'une culture plus vieilles. Au sein d'un même microorganisme, certaines espèces sont plus résistantes que d'autres comme la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (responsable de la tuberculose).

V.3. Concentration ou intensité de l'agent antimicrobien

Souvent plus un agent chimique est concentré ou plus un agent physique est intense, plus les microorganismes sont détruits rapidement. En général, l'efficacité d'un agent chimique augmente de façon exponentielle avec une augmentation de la concentration. Ceci est vrai dans une certaine gamme de concentration mais passer une certaine valeur, une grande augmentation de la concentration entraîne une faible augmentation de l'efficacité, dans certains cas, un agent sera plus efficace à faible concentration : en effet, l'éthanol est plus efficace à 70% qu'à 95%.

V.4. La durée d'exposition

Plus le traitement est long, plus le nombre de microorganismes tués sera grand. Pour réussir une stérilisation il faut un temps de traitement suffisant.

V.5. La température

Un accroissement de la température auquel une substance chimique agit augmente souvent son activité.

V.6. L'environnement local

Les microorganismes que l'on souhaite détruire ou dont on veut inhiber la croissance ne sont pas isolés. Ceci est effectué dans un environnement qui va soit offrir une protection (la matière organique peut protéger les microorganismes contre la chaleur et les désinfectants chimiques de ce fait il est préférable de nettoyer les objets avant de les désinfecter ou de les stériliser), soit favoriser leur destruction (la chaleur tue plus facilement à pH acide de cette façon les boissons type jus de fruits seront plus facilement pasteurisés que les boissons neutres comme le lait) (KECHKAR, 2008).

VI. Détermination de la sensibilité/résistance des souches microbiennes aux agents antimicrobiens

Il existe diverses méthodes spécifiques pour la détermination de la sensibilité (absence de croissance) ou de la résistance (croissance) des souches microbiennes aux agents antimicrobiens, on cite alors :

- Méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques)
- Méthode des puits de diffusion
- Méthode en double couche (MH solide) = méthode des spots
- Méthode en milieu liquides (MH liquide)

VI.1. méthode de diffusion en milieux solide (méthode de Vincent)

La méthode de Vincent est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des agents antimicrobiens sur la croissance des micro-organismes, par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné agent antimicrobien (BEKHECHI *et al.*, 2008).

Une suspension de chaque germe est préparée dans une eau physiologique stérile et ajustée à 10^6 bactéries/ml, chaque suspension est étalée sur une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre. Des disques de papier buvard stériles de 6 mm de diamètre sont ensuite déposés sur les géloses (un disque par boîte). Ils sont imprégnés de l'agent antimicrobien à tester. La lecture des diamètres d'inhibition se fait après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37 °C pour les bactéries et 48 heures à l'étuve à 22°C pour les levures.

VI.2.Méthode des puits de diffusion

Cette méthode, telle que décrite par BERGHE et VLIETINCK (1991), consiste à inoculer, par inondation avec une dilution adéquate de bactéries, un milieu coulé dans une boîte de pétri sur une épaisseur de 8 mm, ensuite à réaliser des puits de 6 mm de diamètre de manière concentrique et qui seront remplis de l'agent antimicrobien à tester.

Après une pré-diffusion de 45 mn à température ambiante sous la hotte stérile, les souches sont incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 22°C pendant 48 heures pour les levures, au terme desquelles les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (KUETE *et al.*, 2004).

VI.3. Méthode de spots

En milieu solide, l'agent antimicrobien est incorporé dans la deuxième couche d'un milieu gélosé coulé dans les boîtes de Pétri après avoir coulé la première couche. Les souches à étudier sont déposés à la surface de la gélose sous forme de spots. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration de l'agent antimicrobien (EUZEBY, 2006).

VI.4. Méthode en milieux liquides

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro-dilution) ou de cupules (méthode de micro-dilution) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration de l'agent antimicrobien où aucune croissance n'est visible (OUSSOU *et al.*, 2004).

VII. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des agents antimicrobiens

La CMI est la plus petite concentration de l'agent antimicrobien qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 à 24 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique de l'agent antimicrobien (ARCHAMBAUD, 2009).

VIII. Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire finale. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par CANTON *et al.*, (2003).

Après la détermination de la CMI, les boîtes contenant les concentrations en substance antifongique strictement supérieures à la CMI serviront pour la détermination de la CMF. (KHOBZAOUI,2014)

Pour ce faire, gratter les puits de chaque puits vont être transférés dans d'autres boîtes de Pétri contenant du milieu MH ou bien sabouraud . Les boîtes sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 24h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonie inférieure à 3 (MAJOROS *et al.*,2005).

IX. Aromatogramme avec courbe de concordance

Il faut réaliser, d'abord, un aromatogramme. Après une incubation de 24h, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre permet de mesurer la CMI. Le système disque-milieu de culture est étalonné au préalable avec un grand nombre de souches de références de CMI connues, déterminées par les méthodes de référence; on trace ainsi la droite de régression ou "courbe de concordance", donnant la correspondance entre les CMI et les diamètres des zones d'inhibition pour les disques et le milieu de culture considérés. Après, on mesure les diamètres des zones d'inhibition, puis on les reporte sur le graphique pour déduire les CMI (KAMAGATE *et al.*, 2001).

**Chapitre III : le mécanisme d'action des
agents antimicrobiens naturels :**

Acide lactique- chitosane

I. Généralités :

Les agents antimicrobiens naturels sont des substances naturelles utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens naturels (acide lactique et chitosane...), antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (CE, 2001).

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action (EUZEBY, 2005).

Par définition l'antibiotique a été restreint à toute substance d'origine naturelle produite par un microorganisme (habituellement une bactérie ou une moisissure) capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres microorganismes. Depuis, de nombreuses molécules antibiotiques ont été synthétisées ou modifiées en laboratoire. Quelle qu'en soit l'origine, deux caractéristiques importantes sont nécessaires pour qu'une substance soit qualifiée d'antibiotique (YALA *et al.*, 2001):

- être efficace à faible dose.
- avoir une toxicité spécifiquement dirigée envers un groupe de microorganismes (donc, être non toxique pour les cellules de l'hôte). (YALA *et al.*, 2001).

Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (YALA *et al.*, 2001). La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue.

II. Acide lactique

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques qui ont des effets bénéfiques pour la santé, pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale (SCHAAFSSMA, 1996).

II.1. Définition

L'acide lactique est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants allant des procaryotes anaérobies à l'homme, et représente l'un des acides organiques les plus importants (GIVRY, 2006).

L'acide lactique est un acide organique naturel, non toxique, trouvant diverses applications dans les industries chimique, alimentaire et pharmaceutique. Il est notamment

utilisé dans la production de polymères biodégradables (BOUDJELAL *et al.*, 2001; DJIDEL, 2007).

II.2. Origine de l'acide lactique

L'acide lactique est le principal produit de la fermentation par les bactéries lactiques. c'est un produit majoritaire issu de la fermentation, mais d'autres acides organiques principalement acétique, formique, propionique, ou encore, caproïque et benzoïque sont également produits (KUWAKI *et al.*, 2002)

I.2.1. Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène constitué de cocci et de bacilli (BADIS *et al.*, 2005). Ce sont des bactéries à Gram positif dont la teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieure à 50%. Elles sont capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4.0 à 4.5. Ces bactéries sont généralement immobiles et se caractérisent par la production d'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Leur division se déroule sur un seul plan à l'exception des genres : *Pediococcus*, *Aerococcus*, et *Tetragenococcus*. (SALMINEN *et al.*, 2004; KÖNIG et FRÖHLICH, 2009 ; PRINGSULAKA *et al.*, 2011).

En plus de l'acide lactique et des autres acides organiques qui empêchent le développement des microorganismes indésirables par diminution du pH du milieu, les bactéries lactiques produisent d'autres métabolites ayant des propriétés antimicrobiennes tels que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, la reutérine, le dioxyde de carbone et les bactériocines (DORTU et THONART, 2009), qui influencent sur la texture, le goût et la qualité microbiologique des aliments (SINGH *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques colonisent les habitats riches en nutriments, tels les plantes, les fruits, les produits laitiers, les eaux et les eaux usées, les jus, ainsi que les cavités buccales, vaginales et intestinales de l'homme, sans pour autant lui provoquer des maladies, à l'exception de quelques cas causés par les streptococci et certains lactobacilli (KÖNIG et FRÖHLICH, 2009).

Les bactéries lactiques sont, de loin, la catégorie de microorganismes la plus utilisée dans la production de produits alimentaires contribuant ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer ainsi une bonne conservation des aliments (POT, 2008).

II.3. La structure de l'acide lactique

L'acide lactique, de son vrai nom acide 2-hydroxypropanoïque ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$), est un acide carboxylique (fonction $-\text{COOH}$), porteur sur le carbone numéro 2 d'une fonction alcool ($-\text{OH}$) (SODERGARD et STOLT, 2002). Il existe deux formes optiques d'acide lactique le D- et le L-acide lactique, Se sont des énantiomères (du grec enantios: opposé) (SODERGARD et STOLT, 2002).

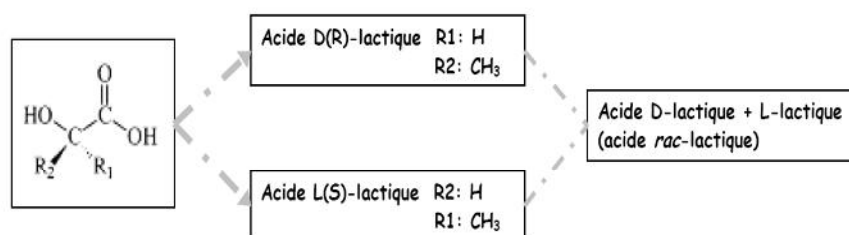


Figure 5: Formes optiques de l'acide lactique (SODERGARD et STOLT, 2002).

II.4. Les caractéristiques de l'acide lactique

L'acide lactique ou l'additif E270 est un liquide à l'aspect sirupeux et jaunâtre, odorant, n'est pas volatile, possède un goût acide moyen et est catalogué comme G.R.A.S, il possède un potentiel chimique important, c'est pourquoi il est largement utilisé en industrie (ATKINSON et MAVITUNA, 1991).

II.5. Les propriétés de l'acide lactique

II.5.1. Les propriétés physicochimiques

L'acide lactique (E270) se présente sous une forme liquide soluble dans l'eau, l'alcool, l'éther et insoluble dans le chloroforme. Ses sels de sodium (E325), de potassium (E326) et de calcium (E327) se présentent quant à eux sous forme de poudre et sont également solubles dans l'eau, il est de saveur nettement acide à goût légèrement lacté.

Les deux isomères actifs de cet acide sont les formes L (+) et les formes D (-). Dans l'organisme, la forme L (+) est la plus rapidement métabolisée que la forme D (-), aussi il est souvent attribué à l'acide L (+) des qualités nutritionnelles supérieures (CHENE, 2002; COEI, 2004; DJIDEL, 2007).

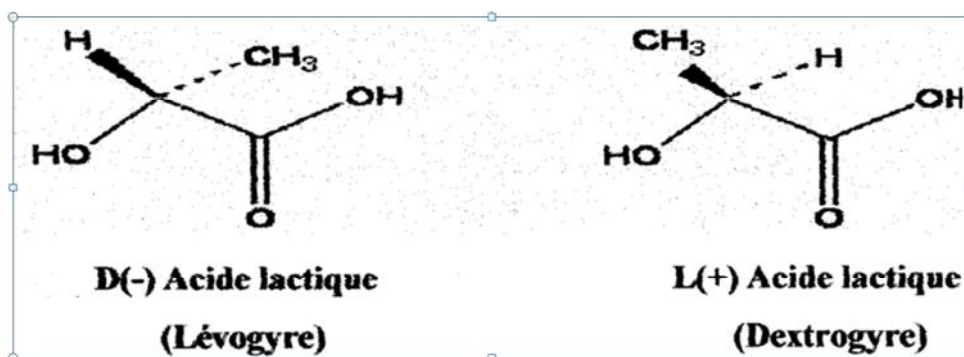


Figure 6: Les deux isomères de l'acide lactique (REZGUI *et al.*, 2008)

II.5.2. Les propriétés antimicrobiennes :

L'acide lactique agit comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes (*Salmonelles*, *Listeria*, etc.).

L'ajout d'acide provoque une diminution du pH externe qui va entraîner une baisse du pH interne des micro-organismes et ainsi inhiber leur développement. Mais, tous les microorganismes n'ont pas la même sensibilité au pH. Chaque micro-organisme est caractérisé par un seuil de pH en dessous duquel il ne se développe pas.

Quelques exemples de pH minimum de micro-organismes sont indiqués dans le tableau II (CHENE, 2002).

Tableau II: pH minimum de croissance de quelques germes (CHENE, 2002).

Micro-organismes	pH minimum
<i>Pseudomonas sp.</i>	5,6
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9
<i>Salmonella sp.</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	4,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,4
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2
<i>Clostridium perfringens</i>	5
<i>Lactobacillus</i>	3,8
<i>Listeria sp.</i>	4,3
Levures en général	2,4
Moisissures en général	2

II.6. Mécanisme d'action de l'acide lactique :

Le mécanisme d'action de l'acide lactique dépend du pH et de la constante acide de dissociation (pKa), qui détermine la forme dissociée ou non dissociée à un pH donné. Lorsque le pH est inférieur ou égal à son pKa, l'acide est sous sa forme non dissociée (GEREZ *et al.*, 2010 ;BLAGOJEV *et al.*, 2012). La forme non dissociée de ces molécules lipophile, leur permettent de diffuser à travers la membrane plasmique et de pénétrer la cellule, dans laquelle le pH plus basique, favorise la dissociation de ces acides. Les protons accumulés dans le cytosol diminueront le pH de ce dernier et permettent ainsi d'inhiber les principales activités métaboliques de la glycolyse (MOLLAPOUR et PIPER, 2008; BLAGOJEV *et al.*, 2012).

II.7. Domaines d'utilisation de l'acide lactique

L'acide lactique est utilisé dans divers domaines comme l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, etc. (Tableau III)

Tableau III. Domaines d'utilisation de l'acide lactique

Domaines	Les utilisations	
Domaine alimentaire	-comme régulateur de l'acidité, produire des agents émulsifiants (boulangerie), comme acidulant, agent de saveur et de texture (yaourts, légumes (olives), alcool (bière), charcuteries(jambon), pains au levain ...etc) (HAHN-HAGERDA, 2000). -utiliser pour améliorer la conservation comme pour les bonbons, les produits de boulangeries, la mayonnaise....etc - Il est aussi utilisé afin d'ajuster le pH des bains permettant le durcissement du cellophane, pour le conditionnement des aliments .	
Domaine non alimentaire	industrie du textile	-utilisé dans les étapes de finition du textile
	cosmétique	-l'éthyl lactate est la substance active dans les solutions anti-acné et est employé comme agent hydratant
	pharmaceutique	-le sel d'acide lactique, réalisé avec le calcium, est employé dans la thérapie des insuffisances en calcium et comme agent contre les caries
	Industrie du cuir	comme acidulant pour le chaulage et le tannage

Industrie chimique	<p>-désinfectant et détergent dans la désinfection des carcasses, de la volaille et des poissons, aussi en tant que détergents dans les constructions (TIMBUNTAM <i>et al.</i>, 2006).</p> <p>- Ils sont également employés lors de la production de produits chimiques de base comme l'ester de lactate, l'acétaldéhyde, l'acide acrylique, l'acide propanoïque,... dans les industries chimiques ou pour être polymérisés en acide polylactique biodégradable (HOFVENDAHL et HAHN-HAGERDAL, 2000).</p>
---------------------------	---

III. Chitosane

La chitine et le chitosane ont été découverts en 18^{ème} siècle, mais ce n'est que dans les années 1970 que leur mise en valeur avait commencé (MUZZARELLI 1985 ; ROBERTS 1992). Ces deux polymères sont obtenus par les transformations successives des exosquelettes (carapaces) de crustacés provenant des déchets de l'industrie agro-alimentaire. Cependant, la proportion de chitine dans ces déchets peut varier de 15 à 30% en masse sèche pour certaines carcasses de crabes et de 30 à 40% pour les crevettes grises (MATHUR et NARANG, 1990). Décalcifiées, les cuticules sont constituées de 55 à 85% de chitine (KURITA, 2006).

III.1. La Source du chitosane

La faible teneur de la chitine dans les autres corps tels que les insectes et les champignons laisse à suggérer que les crustacés sont les principales sources fournissant de cette matière première (la chitine) (BLACKWELL, 1973 ;MUZZARELLI, 1985). Elle est le polysaccharide le plus abondant sur terre après la cellulose son hydrolyse en milieu fortement alcalin conduit à l'obtention de son dérivé principal qui est le chitosane caractérisé par son degré d'acétylation (DA) ou selon certains auteurs par son degré désacétylation (DD).

Le chitosane est une substance peu répandue dans la nature. Il est présent uniquement dans les parois cellulaires de certains micro-organismes fongiques (champignons zygomycètes) et dans le mycélium, il n'est signalé que dans les exosquelettes de certains insectes (par exemple la paroi abdominale des reines de termites). Ce qui explique qu'il n'y a pas de sources primaires exploitables. Sa production sera systématiquement assurée à partir de la transformation de la chitine en chitosane.

Les publications récentes dans le domaine montrant les teneurs de la chitine de nombreux crustacés et champignons sont illustrées dans le Tableau IV

Tableau IV : Sources potentielles de chitine (MATHUR et NARANG, 1990)

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Le crabe comestible	70
Crabe araignée (<i>Maia squinata</i>)	16
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>)	32
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	44
Seiche (<i>Sepia officinalis</i>)	20
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	40
Champignons	
(<i>Mucor rouxili</i>)	9,4
(<i>Aspergillus niger</i>)	42
(<i>Aspergillus phoenisis</i>)	23,7

III.2. La structure chimique de la chitine et de chitosane

La chitine est un polysaccharide constitué d'unités de poly N-acétyl-D- glucosamine liées par des liaisons de type $\beta(1\rightarrow4)$ tandis que le chitosane est constitué de poly D-glucosamine liée par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ (BLACHWELLI, 1973 ; ROBERTS, 1992). Les structures chimiques de la chitine et du chitosane sont caractérisées par la présence de groupement amine et de groupement acétamide et la présence de nombreuses fonctions hydroxyle qui confèrent un fort caractère hydrophile notamment au chitosane. Ces deux biopolymères sont également caractérisés par la longueur de leurs chaînes moléculaires ou leurs masses moléculaires.

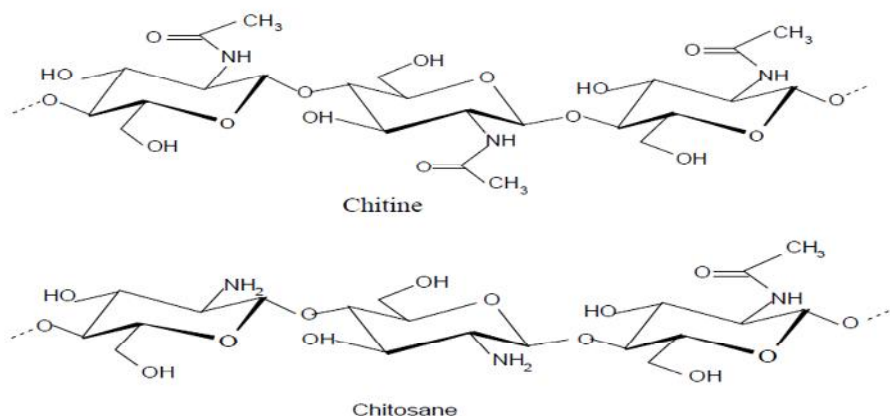


Figure 7 : Structures chimique de la chitine et du chitosane

III.3. Procédés d'obtention de chitine et de chitosane

Les étapes d'obtention de la chitine et de chitosane sont représentées dans la Figure 8.

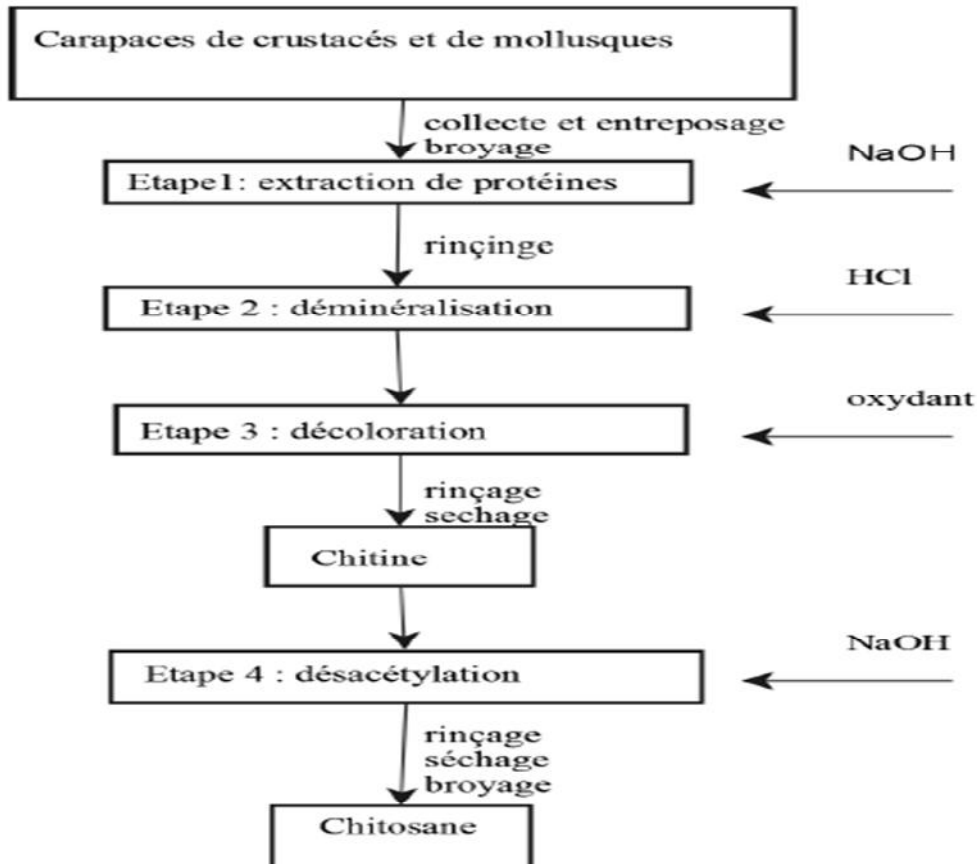


Figure 8: Le procédé d'obtention de la chitine et de chitosane (ONSOYEN *et* SKAUGRUD, 1990).

Une fois que les carapaces sont lavées, imputées de leurs pattes puis séchées et broyées, la masse obtenue pourra être utilisée pour l'obtention de chitosane en respectant les étapes suivantes :

- **Déminéralisation** : c'est une étape qui consiste à éliminer la matière minérale liée à la chitine. Elle se fait par hydrolyse acide utilisant l'acide chlorhydrique.
- **Déprotéinisation** : c'est une étape qui consiste à éliminer les protéines liées à la chitine. Elle se fait par hydrolyse basique utilisant la soude ou la potasse.
- **Décoloration ou blanchissement** : c'est une étape qui comporte à éliminer les pigments qui sont liés à la chitine utilisant des agents oxydants. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible donc d'obtenir différents chitosane. Cela est montré dans la figure 9.

Ces trois étapes de traitement des carapaces débarrassent la chitine de ces impuretés et en fin la masse obtenue peut être utilisée comme matière première pour l'obtention de chitosane. Une fois que la désacétylation des groupements amines a atteint plus de 70%, on peut dire qu'on a obtenu le chitosane qui pourra être soluble. En conséquence, nous appellerons chitosane tout échantillon ayant un degré d'acétylation résiduel (DA) \geq 30% (SENG, 1988).

La présence des groupes amines et hydroxyles dans l'unité du chitosane permettent des modifications chimiques du chitosane qui incluent : l'acylation, l'alkylation, la formation de base de Schiff, l'alkylation réductrice, la carboxyméthylation, la carboxyalkylation (KRAJEWSKA, 2005).

III.4. Les caractéristiques du chitosane

III.4.1. La cristallinité :

La cristallinité de la chitine et du chitosane est un paramètre important. Elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité aux sites internes dans la chaîne macromoléculaire, les propriétés de gonflement dans l'eau et les propriétés diffusionnelles (KURITA, 2006 ; RINAUDO, 2006). Les chaînes de polymères peuvent être agencées de différentes manières suivant l'origine du matériau.(MUZZARELI, 1985).

Le chitosane est caractérisé également par son degré de désacétylation, sa viscosité et son poids moléculaire.

III.4.2. Le degré de Désacétylation (DD)

C'est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, ...) du chitosane et apparaît donc comme le plus important. La détermination du DD est l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. Plusieurs méthodes sont proposées à savoir, le titrage potentiométrique (ou volumétrique), la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-VIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (ONESIPPE, 2005).

III.4.3. La viscosité

La viscosité du chitosane dépend de son degré d'acétylation, plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante; de sa concentration, de la température, et le pH.

III.4.4. Le poids moléculaire

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par HPLC. Toute fois, le viscosimètre demeure une méthode simple et rapide pour connaître le poids moléculaire en utilisant la formule de Marc-Houwink et Sakurada (ZEMMOURI, 2008). .

III.5. Les propriétés du chitosane

Le chitosane possède divers propriété importantes parmi lesquelles on cite :

III.5.1. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

Le chitosane se présente sous la forme d'un solide amorphe. C'est l'un des rares polyelectrolytes naturels cationiques existant dans la nature. En solution dans un acide dilué, le chitosane se comporte comme un polycationique de forte densité de charge, en raison de la protonation des groupements $-NH_2$. Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les microorganismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Il ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogénique et hémostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. Le chitosane a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus des propriétés immunologiques, antitumorales, antibactériennes et antifongiques (ZEMMOURI, 2008). .

III.5.2. Activité antimicrobienne du chitosane

Le chitosane ainsi que ses dérivés ont suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs pour leurs propriétés biologiques et antimicrobienne intéressantes.

Son potentiel d'application dans les industries agro-alimentaires comme additif stabilisateur de couleur, émulsifiant, antioxydant et gélifiant (AGULLOET AL., 2003).

Plus récemment, la possibilité d'utiliser le chitosane pour ses propriétés antimicrobienne et antifongique a été démontrée (LIUet al., 2001; AGULLOet al., 2003; LIUet al., 2004; RINAUDO, 2006).

L'activité antimicrobienne du chitosane dépend de plusieurs facteurs tels le poids moléculaire, le degré de désacétylation, le pH et la température (RABEA et al., 2003). Des

exemples d'activité antimicrobienne du chitosane ainsi que les concentrations minimales inhibitrices contre différents microorganismes sont présentés dans Tableau V.

Tableau V: Activité antimicrobienne du chitosane (LIU *et al.*, 2001)

Bactéries	CMI ^a (ppm)	Moisissures	CMI ^a (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100	<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Bacillus cereus</i>	1000	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Corynebacterium michiganence</i>	10	<i>Drechetera sorokiana</i>	10
<i>Erwinia sp.</i>	500	<i>Micronectriella nivalis</i>	10
<i>Erwinia corotovora subsp.</i>	200	<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Escherichia coli</i>	20	<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700	<i>Trichyphyton equinum</i>	2500
<i>Micrococcus luteus</i>	20		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500		
<i>Staphylococcus aureus</i>	20		
<i>Xanthomonas campestris</i>	500		
<i>Xanthomonas campestris</i>	500		

III.6. Le mécanisme d'action du chitosane

Le mécanisme d'action antimicrobien du chitosane n'est pas encore bien connu mais différentes hypothèses ont été proposées (SUDARSHAN *et al.*, 1992; CHENE *et al.*, 1998; RABEA *et al.*, 2003):

- Les charges positives du chitosane peuvent interagir avec la charge négative des membranes de la cellule microbienne, ce qui induit la libération du matériel protéique et les autres constituants intracellulaires.
- À de faibles concentrations le chitosane polycationique se lie probablement à la surface des cellules chargées négativement causant ainsi leur agglomération, par contre à des concentrations élevées, le grand nombre de charges positives va donner une charge positive nette à la surface des bactéries pour les garder en suspension.
- Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments.

III.7. Les applications du chitosane

Compte tenu de sa structure chimique, et en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines. Les domaines d'application de la chitine et le chitosane sont indiqués dans le Tableau VI.

Tableau VI: Les domaines d'application de la chitine et le chitosane (KEDDOU, 2008)

Domaine	Applications
Agriculture	Protection des plantes, augmentation des rendements de récolte (réduction de la croissance des mycètes phytopathologique) ; enduit de graine et d'engrais ; traitement du sol.
La technologie biomédicale	Activités biologique (antifongique, antimicrobien, anti-infectieux) ; agent anti-tumoral ; effet hémostatique ; augmentation de la coagulation du sang ; favorisation de la croissance du tissu ; stimulation de la prolifération des cellules, peau artificielle ; effets hypocholestérolémiants.
La biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes ; matériaux stimulants de cellules, matrice pour l'affinité ou les membranes.
La chimie industrielle	Purification d'eau (chélation des métaux) ; technologie de l'eau (floculation, absorption) ; traitement des boues ; membranes d'osmose inverse, membranes de filtration ; séparation des gaz ; production de fils d'emballage biodégradables ; la catalyse.
Cosmétique	Crème pour le Corps, et les mains ; shampooing ; crèmes hydratantes.
L'industrie alimentaire	Régime alimentaire et fibre diététique ; activité hypocholestérolémie (liaison cholestérol, acides gras et mono glycérides) ; la conservation des nourritures de la détérioration microbienne ; la bio-conservation pour la production de produits alimentaires à valeurs additionnée ; rétablissement des déchets de la transformation des produits alimentaires ; clarification et désacidification des jus de fruits et des boissons ; agent émulsionnant ; stabilisant de couleur ; additifs alimentaires des animaux.
Pharmaceutique	Commandés de micro capsules (formant des gels et des capsules avec des polymères anionique) ; transporteur des médicaments à libération contrôlée ; produits dermatologique (traitement de l'acné).
Autres	Textile (propriétés anti-bactériennes) ; pulpe et papier ; résistance au mouillage) ; œnologie (clarification, désacidification) ; dentisterie (implants dentaires) ; photographie (papier).

La partie expérimentale

An orange scroll graphic with a white border and a slight shadow, containing the text 'Matériel & méthode'.

Matériel & méthode

A. Matériel et méthodes

Le présent travail a été effectué au sein du laboratoire de Microbiologie du département des sciences agronomiques, faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU.

II.1. Matériel :

II.1.1. L'acide lactique

L'acide lactique utilisé est commercialisé par la société de chimie cosmétique et de parapharmacie, ses caractéristiques, présentées sur la fiche technique sont comme suit :

- Odeur : agréable
- Aspect, liquide visqueux miscible avec l'eau et solvants organiques.
- Couleur : transparent a jaune.
- Assay : 79,5 – 80,5%
- Date de fabrication: Déc. 2013
- Date de péremption : Déc. 2015

II.1.2. Le chitosane

Le chitosane testé durant notre étude est obtenu à partir de la chitine issue de la carapace des crevettes préalablement préparée par l'équipe du D^r KADOUCHE Slimane du département de chimie, faculté des sciences, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, selon le protocole d'obtention de la chitine et de chitosane.

II.1.2.1. Le protocole d'obtention du chitosane

Le chitosane peut être préparé suivant des protocoles différents selon les auteurs :

Selon la méthode de KOŁODZIEJSKA, WOJTASZ - PAJAK, (2000) le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine extraite par une solution de soude, selon le mode opératoire suivant : La chitine a été traitée avec une solution de soude à 50%, dont la proportion masse/volume est 1/10, la solution est agitée pendant 60 minutes à 140°C.

Selon la méthode de MIRZADEH *et al.*, (2002) le chitosane a été préparé par diverses étapes :

La chitine est traitée avec une solution de soude à 50%, avec une proportion d'un gramme pour 50ml, la solution est agitée pendant 3 heures à 90°C. Au terme de la réaction, la solution est filtrée sur un tamis, le chitosane retenu est lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité. Le chitosane est rincé avec l'eau distillée puis séché à l'étuve à 80°C.

Nous avons obtenu le chitosane en suivant le protocole expérimental suivant selon notre objectif de recherche:

La chitine est traitée avec une solution de soude à 40% préparé avec une proportion de 572g de Na OH pour 1000ml d'eau distillé (solution : 250ml de NaOH +5g de chitine), la solution est agitée sous une plaque chauffante réglée à 120°C pendant des périodes différentes sur quatre échantillons (Tableau VII), les échantillons obtenus ont la caractéristique d'être différent par leur degré de désacétylation.

Les chitosanes retenus sont lavés en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité. Les chitosanes sont rincés avec l'eau distillée puis séché à l'étuve à 40°C pendant 24h.

Tableau VII: Les échantillons du chitosane selon le temps de traitement avec NaOH.

Echantillons	Le temps de traitement avec la NaOH
Echantillon 1	Une heure et 30 minutes
Echantillon 2	Deux heures
Echantillon 3	Deux heures et 30 minutes
Echantillon 4	Trois heures

Ces échantillons seront ensuite testés sur des microorganismes dans le but de savoir lequel d'entre eux possède l'effet antimicrobien le plus important.

II.1.4. Les microorganismes

Quatre souches microbiennes de référence ont été sélectionnées pour tester l'activité antimicrobienne des deux substances, il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*. Ces souches sont choisies en fonction de leur pathogénéicité et leur résistance aux antibiotiques et leur implication dans

les intoxications alimentaires. Toutes ont été aimablement fournies par le laboratoire de microbiologie de la société pharmaceutique (Aldaph-Novonordisk) sise à la zone industrielle Oued-Aissi de Tizi Ouzou. . Quant à la levure *Candida albicans*, elle a été procurée au CHU Nedir Mohamed.

II.2. Méthodes

II.2.1. Vérification des souches de référence

Afin de vérifier la pureté de la souche utilisée nous avons effectué des examens microscopiques et macroscopiques en faisant un état frais, une coloration de Gram à partir de chaque boîte.

II.2.1.1. Examen macroscopique (Observation macroscopique à l'œil nu)

Cette observation repose sur des critères morphologiques tels que l'aspect des colonies.

II.2.1.2. Examen microscopique

a. Etat frais

L'observation microscopique de l'état frais permet d'observer la morphologie, le regroupement et la mobilité des cellules vivantes.

- **Mode opératoire**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile
- Prélever une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau.
- Recouvrir d'une lamelle sans enfermer de bulles d'air et sans faire déborder la suspension.
- Observer à l'objectif (G10x40)

- **Critère d'acceptation**

Observation de la mobilité : une bactérie est mobile si à l'état frais on observe un déplacement dans le sens inverse du courant de la suspension.

Observation de forme de la bactérie : il existe 02 formes différentes de bactéries cocci ou bacille.

b. Coloration de Gram

En plus de la morphologie et du mode de regroupement des cellules bactériennes, la coloration de Gram, permet de différencier entre les deux types de bactéries (Gram+ et

Gram-) selon la capacité des différentes structures de la paroi bactérienne à retenir ou non la coloration violette du violet de gentiane.

La technique de la coloration de Gram est réalisée selon les étapes suivantes :

➤ **préparation des frottis**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile
- Prélever stérilement une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau pour obtenir une suspension homogène.
- Sécher et fixer le frottis à la chaleur au-dessus de la flamme du bec bunsen.

➤ **Coloration**

- Recouvrir la lame de violet de Gentiane. Laisser agir 01 minute et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Recouvrir la lame d'une solution de lugol. Laisser agir 1 minute et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Décolorer la lame à l'aide d'Ethanol à 95° pendant 5 à 10 secondes et rincer aussitôt à la pissette d'eau déminéralisée.
- Recouvrir la lame de la fuschine diluée à 1/10. Laisser agir 30 secondes et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Sécher la lame et observer à l'immersion, objectif x100.
- La coloration permet de séparer les bactéries en 02 groupes :
- Une coloration en « rose » indique des bactéries « Gram négatives ».
- Une coloration en « violet » indique des bactéries « Gram positives ».

L'Observation microscopique du champignon *Aspergillus niger* repose sur l'analyse des paramètres microscopiques tels que l'aspect du mycélium, des spores, etc. (GUIRAUD *et al.*, 2004).

II.2.2. Préparation de la suspension microbienne et des solutions des agents antimicrobiens

II.2.2.1. Préparation de la solution du chitosane

La solution du chitosane est obtenue en pesant 2g du chitosane stérile (utilisant la balance de précision) qui est ensuite introduit dans 1 litre d'acide acétique, qui constitue le volume nécessaire pour que le chitosane atteigne la saturation maximal en terme de solubilité dépendante du degré de désacétylation (POIRIER, 2000), au-delà de ce volume d'acide acétique pour 2g du chitosane, la solution commence à devenir visqueuse.

Notre solution du chitosane a été préparée à partir d'un volume de 10ml de l'acide acétique et une quantité de 0,02g de chitosane stérile avec une agitation modérée, la solution est ensuite autoclavée.

II.2.2.2. Préparation des solutions d'acide lactique

Préparer des dilutions de l'acide lactique à différentes concentrations dans de l'eau distillée stérile: 2%, 4% et 6% puis autoclaver pour éviter toute contamination.

II.2.2.3. Préparation de la suspension bactérienne et de levure

Pour la réalisation de cette étape, nous avons suivi la méthode de standardisation suivante :

D'abord, les souches conservées à 4°C sont repiquées sur le milieu MH, puis incubées à 37 °C pendant 24h pour les bactéries et sur le milieu Sabouraud à 22°C pendant 48h pour les levures et moisissures.

Une à deux colonies bien isolées sont prélevées dans 1ml de l'eau physiologique, après agitation au vortex la standardisation de la suspension à 10^7 UFC / ml est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

Nous admettons qu'une densité de 0,5 à 0,6 qui correspond à 10^7 UFC / ml.

II.2.2.4. Préparation de la suspension de spores

Les spores des jeunes cultures (cultures de 3 jours) sont récupérées par un grattage soigneusement effectué en surface du milieu de culture (boîtes de Pétri préalablement incubées), et mise en suspension des spores dans un volume de 5 ml d'eau physiologique stérile, la suspension ainsi obtenue, est considérée comme suspension mère, elle était utilisée pour préparer les différentes dilutions dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.

Après une bonne agitation du tube, pour avoir une répartition homogène des spores dans l'eau physiologique, nous avons procédé au comptage des spores à l'aide d'une cellule THOMAS et le microscope photonique. L'évaluation de la densité optique (DO) de la suspension fongique a été également effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm dans le but de standardiser la suspension de spores à 10^7 spores/ml. Une DO de 0,04 correspond à une concentration de 10^7 spores/ml (NABET, 2009).

a. Principe de dénombrement avec la cellule THOMAS

La cellule THOMAS est une lame spéciale quadrillée (Figure 9) qui permet le comptage de différents types de cellules. Elle a été utilisée dans notre travail pour déterminer la concentration en spores d'une solution (nombre de spores par ml). La lamelle est placée à une certaine distance du quadrillage délimitant un volume de 10^{-3} ml.

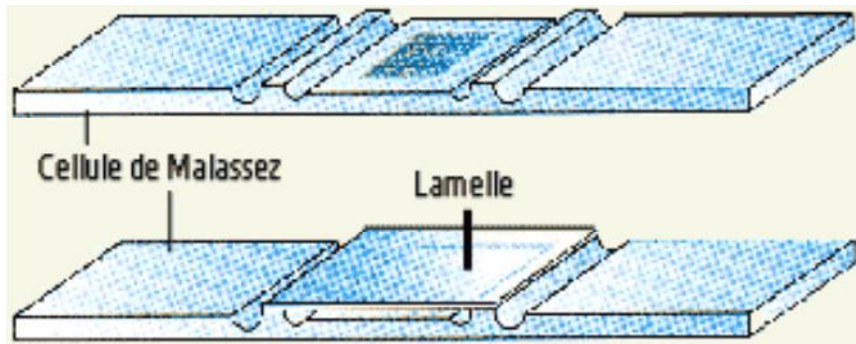


Figure 9: Schéma d'une cellule de THOMAS

A l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes de la solution de spores ont été prélevées puis déposées sur la cellule THOMAS. Ensuite une lamelle est placée par-dessus et un comptage est effectué par observation (G10x40). Des dilutions sont réalisées pour obtenir une suspension de l'ordre de 10^7 spores /ml.

II.2.3. Méthodes utilisées pour détecter l'effet antimicrobien de chitosane, de l'acide lactique et de leur combinaison

La sensibilité des six souches microbiennes au chitosane, à l'acide lactique et à leur combinaison a été évaluée par :

- la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques) ;
- la méthode des puits ;
- la méthode des spots.

II.2.3.1. La méthode de l'antibiogramme

Selon les recommandations du Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2009), les disques d'antibiotique sont remplacés par des disques imprégnés avec l'un des deux agents ou de leur combinaison.

Selon la méthode décrite par FALLEH et ses collaborateurs (2008), la gélose Muller Hinton, coulée dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre, est ensemencée par écouvillonnage, avec la souche test à partir d'une suspension à 10^7 UFC/ml.

Des disques de 6 mm de diamètre, obtenus par découpage du papier wattman N⁰ 4, ont été préalablement stérilisés et déposés au centre de chaque boîte de Pétri. Les disques sont imprégnés individuellement de 5 μ l d'agent antimicrobien pur. Un témoin négatif est aussi réalisé afin d'écarter son effet.

Les boîtes sont laissées 15mn à température ambiante avant d'être incubées à 37°C pendant 24h pour les quatre souches bactériennes et à 22°C pendant 48h pour les levures et moisissures. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré et les résultats sont exprimés en (mm).

II.2.3.2. La méthode des puits

Elle consiste à déposer à l'intérieur d'un puits creusé dans une gélose inoculée dans la masse (Figure 10) par une souche bactérienne cible : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, une quantité de substance antimicrobienne (acide lactique, chitosane seuls ou combinés) à évaluer puis voir s'il y'aura formation ou non de la zone d'inhibition.

Après la dilution de l'acide lactique dans l'eau distillé stérile, nous avons préparé des gammes de concentration différentes à commencer du pur à celui de : 6% ; 4% et 2%.

Dans chaque boîte Pétri nous avons déposé 500µl de la culture bactérienne de 17à 18 heures, une pré-culture d'une durée nécessaire pour atteindre la phase de croissance exponentielle. Puis, nous avons mélangé avec le milieu de culture (Mueller Hinton) pour les bactéries et milieu Sabouraud pour les levures et les moisissures. Après la solidification de la gélose, nous avons formé les puits et déposée à l'intérieur 60µl de l'agent antimicrobien (acide lactique) à différentes concentrations pour chaque bactérie.

Après dépôt, toutes les séries de boîtes ont été incubées à l'étuve réglée à 37°C pour les bactéries et à 22-30°C pour les levures et moisissures.

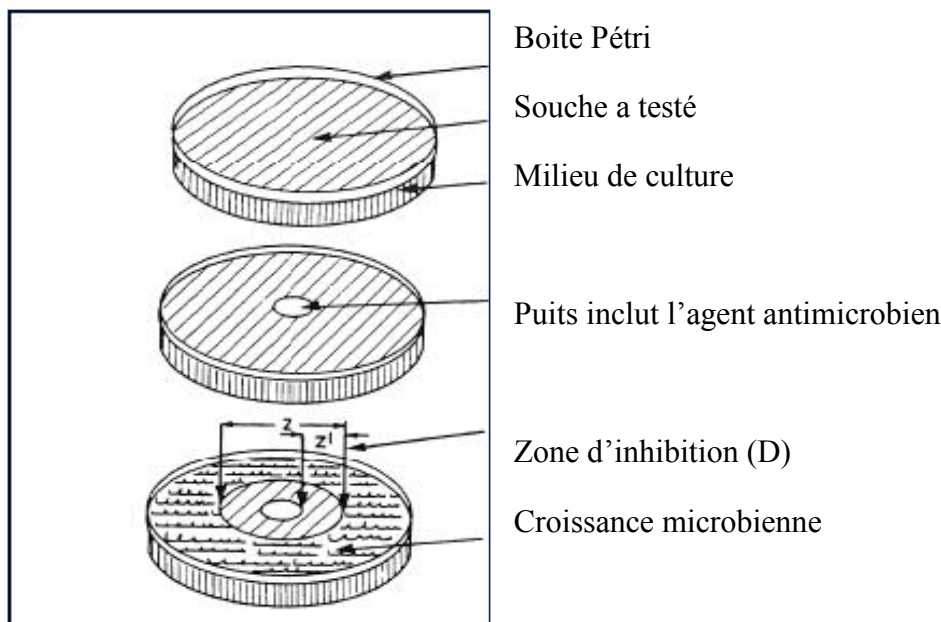


Figure 10: Représentation schématique de la méthode des puits (ZAIKA, 1988)

II.2.3.3. La méthode des spots

Dans la boîte de Pétri, verser 15ml de la gélose (MH pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et moisissures), après solidification rajouter la deuxième couche qui contient 3ml du milieu mélangés à différents volumes de l'agent antimicrobien. Après solidification, des spots de 5 μ l ont été déposés à l'aide d'une micropipette selon le germe à tester. (JEAN-LUC, 2014).

II.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus petite concentration de la substance antimicrobienne pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 24h pour les bactéries et après 48h pour les levures et moisissures (KHOBZAOUI, 2014).

Nous avons procédé à la détermination de la CMI par la méthode de dilution en milieu solide décrite dans la pharmacopée européenne (OIE, 2008).

Le principe de la méthode consiste à diluer directement l'agent antimicrobien à tester dans le milieu de culture gélosée solide et à inoculer ce milieu avec les microorganismes par la suite.

En diluant différentes concentrations de l'agent antimicrobien, on peut définir la valeur la plus faible à laquelle on n'observe pas de croissance de microorganisme et donc une inhibition de la croissance.

- **Protocole expérimental**

A. Préparation de la gamme de dilution des agents antimicrobiens

- Liquéfier les milieux (MH) et (SAB) à 95°C au bain marie.
- Préparer des dilutions de 2%, 4% et 6% de l'acide lactique et des différents volumes de chitosane et on procède pour chaque microorganisme comme suit :
- préparer une série de boîtes pétri contenant 15ml de gélose, laisser solidifier puis ajouter la deuxième couche contenant 3ml du milieu MH ou SABOURAUD et des volumes différents de l'agent antimicrobien utilisé ; chitosane ou acide lactique puis homogénéiser ;
- Laisser les boîtes de Pétri sur la paille pour la solidification du milieu.

B-Inoculation des souches microbiennes

A partir de chaque suspension microbienne à 10⁷UFC/ml, à l'aide d'une micropipette, déposer en spot chacune des six souches microbiennes (WIEGAND, HILPERT and HANCOCK, 2008).

La première série de boîtes est inoculée avec quatre souches bactériennes puis incubées à 37°C pendant 24h, tandis que la seconde série de boîtes est inoculée avec les deux souches de levures et moisissures puis incubée à 22°C pendant 48h.

II.2. 5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La CMB est définie comme la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI, les boîtes contenant les concentrations en substance d'agent antimicrobien strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. (KHOBZAOUI, 2014).

Pour ce faire, les boîtes qui ne présentent pas de croissance vont être transférés faisant un grattage dans d'autres boîtes de Pétri contenant de la gélose (MH ou bien Sabouraud).

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 22-30°C pendant 48h pour les levures et moisissures. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de la CMB renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (PRESCOTT et *al.*, 1995).

Résultats & discussion

Les observations microscopique et macroscopique ont permis de confirmer l'identité des souches microbiennes utilisées, ainsi que leur pureté.

I. La sélection des échantillons du chitosane

Après avoir effectué un teste d'activité antimicrobienne de façon comparative sur les échantillons de chitosane, nous avons observé que l'échantillon n°3 obtenu avec un traitement de deux heurs 30 minutes dans la solution de NaOH, possède un effet antimicrobien important par rapport aux autres échantillons. En effet, il en ressort que l'effet inhibiteur du chitosane sur la croissance de *E.coli* augmentait en fonction du degré de désacétylation (concentration optimale). Cette différence observée dans l'activité antimicrobienne pourrait s'expliquer par le degré de désacétylation qui diminue au fur et à mesure que le temps de traitement avec NaOH augmente.

Nos observations sont similaires à celles de LIU *et al.* (2001) et de PARK *et al.*(2004) qui ont rapporté que le chitosane ayant un degré de désacétylation de 75% (concentration optimale) présente une meilleure activité antimicrobienne contre des bactéries Gram-positives et des bactéries Gram-négatives comparativement aux chitosanes avec un degré de désacétylation de 90% et 50%.

La majorité des études rapportées dans la littérature sur l'activité antimicrobienne du chitosane porte sur l'effet du poids moléculaire du chitosane ou sur l'effet de son degré de désacétylation. Cependant, peu d'études ont été consacrées à l'effet de la combinaison entre différents degrés de désacétylation et différents poids moléculaires du chitosane sur des Microorganismes pathogènes alimentaires.

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien du chitosane, de l'acide lactique, ainsi que leur combinaison sur six souches microbiennes : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* et *A. niger* a été évalué en utilisant la méthode de l'antibiogramme standard par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques).

Cette technique présente l'avantage d'être d'une grande souplesse et de s'appliquer sur un grand nombre d'espèces microbiennes.

L'action antimicrobienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné de l'agent antimicrobien étudié (chitosane et acide lactique dans notre cas). La lecture des résultats a été élaborée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques (diamètre du disque inclus).

Selon les intervalles des zones d'inhibition établis par DE BILLERBECK (2007), l'activité antimicrobienne des extraits ou des composés purs est classée selon le diamètre de la zone d'inhibition (\emptyset) comme suit :

- Souche résistante (6 mm qui est le diamètre du puit creusé) ;
- Souche intermédiaire ($\emptyset < 13$ mm) ;
- Souche sensible ($\emptyset > 13$ mm).

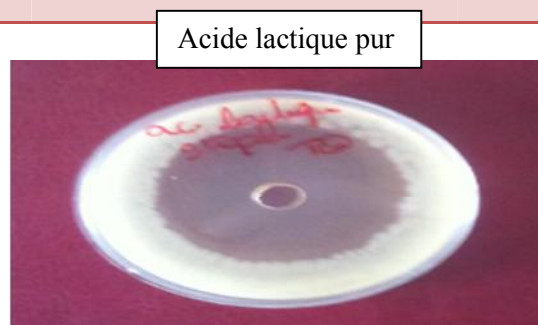
Malheureusement, les premiers tests effectués par cette technique n'ont pas produits des résultats satisfaisants, pour cela nous avons eu recours à une autre méthode qui est la méthode des puits.

Après avoir introduit 60 μ l de chaque dilution d'acide lactique dans chaque puits pour chaque microorganisme, une inhibition de croissance microbienne résultant de l'action de l'agent antimicrobien se traduit lors de l'incubation par la formation d'un halo (zone d'inhibition) dont le diamètre varie selon la concentration et la diffusion de l'agent antimicrobien. La diffusion du composé dans la gélose est dépendante de la diffusibilité du composé, de la durée de migration, de la distance de migration et de la concentration du composé (COOPER, 1955).

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les souches bactériennes utilisées dans ce test sont illustrés dans le Tableau VIII et Figure 11.

Tableau VIII: Effet de l'acide lactique sur les souches bactériennes (méthode des puits).

		Acide lactique			
		Pur	6%	4%	2%
Les bactéries	<i>E. coli</i>	32 mm	17mm	14mm	7mm
	<i>Bacillus subtilis</i>	28mm	15mm	10mm	9mm
	<i>Staphylocoque aureus</i>	30mm	16mm	12mm	9mm
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32mm	18mm	13mm	10mm



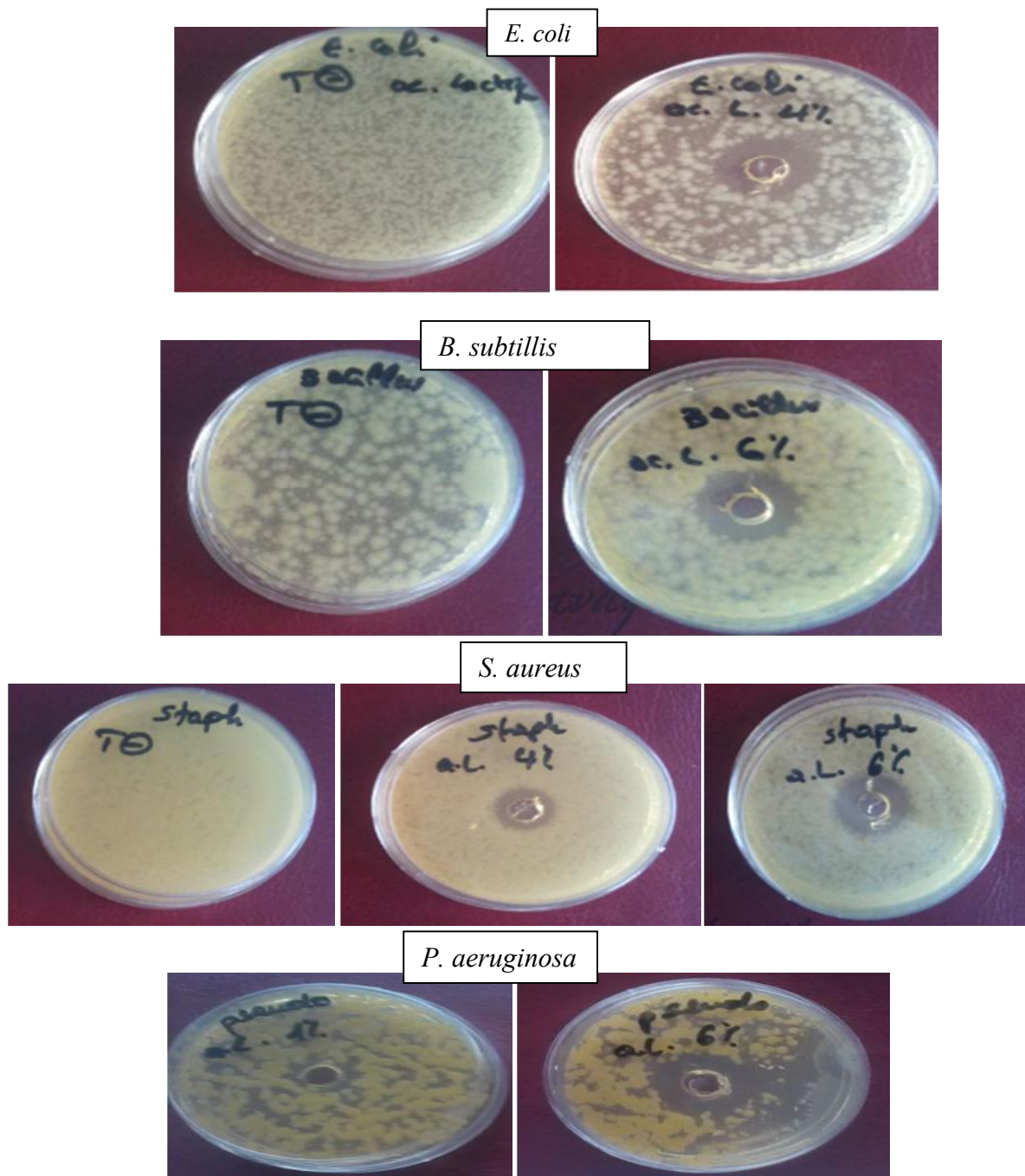


Figure11 : les zones d'inhibition des souches bactériennes traité avec de l'acide lactique utilisant la méthode des puits

L'inconvénient majeur rencontré avec cette technique est que nous avons obtenus des résultats négatifs en utilisant le chitosane, c-à-d qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée après incubation (développement d'un tapis bactérien sur toute la surface du milieu de culture) dans les boîtes contenant le chitosane suivant le même processus et les mêmes quantités que l'acide lactique. Pour cette raison, nous avons eu recours à une autre technique qui est la méthode des spots.

III. Effet de l'acide lactique sur les souches microbiennes (méthode des spots)

Après incubation, l'application des volumes de l'acide lactique dans 3ml du milieu (deuxième couche) a révélé que les effets inhibiteurs de l'acide lactique sur la croissance microbienne observé sont variables selon la souche considérée. Comme le montrent les Figures 12, 13 et 14, il y a une inhibition totale de *E. coli* et *P. aeruginosa* à partir de 50µl de solution d'acide lactique. Dans le cas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans* est obtenue à partir de 100µl. Par contre pour *A. niger* nous avons obtenu des résultats contradictoires, c-à-d. il y a croissance partout en utilisant des volumes différents (Figure 15).

Les résultats de l'effet antimicrobien de l'acide lactique sur les souches testées obtenus par la méthode des spots sont résumés dans le Tableau IX :

Tableau IX: effets de l'acide lactique sur les souches microbiennes testées (Méthode des spots).

Les concentrations (les volumes)

Les souches microbiennes		pur	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	100 µl
	<i>E.coli</i>	Pas de croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>B.subtilis</i>	Pas de croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Croissance	Pas de croissance
	<i>S.aureus</i>	Pas de croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Croissance	Pas de croissance
	<i>P.aeruginosa</i>	Pas de croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
		pure	50 µl	100 µl	150 µl	200 µl	250 µl	300 µl
	<i>C.albicans</i>	Pas de croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>A. niger</i>	croissance	croissance	croissance	croissance	Croissance	Croissance	Croissance

Les résultats expérimentaux présentés dans le tableau IX montrent l'effet antimicrobien très significatif de l'acide lactique sur toutes les souches sauf *A. niger* ;

Ceci confirme la sensibilité de toutes ces souches à l'acide lactique sauf *A. niger* qui montre une résistance à l'acide lactique (l'acidité favorise le développement des champignons). L'action antimicrobienne de l'acide lactique correspond à l'un des mécanismes d'action des

bactéries lactiques sécrétant un métabolite à effet inhibiteur de la flore microbienne (ROUSE *et al.*, 2008).

Selon les travaux rapportés dans la littérature scientifique, ces résultats s'expliquent par la différence dans la nature des souches microbiennes utilisées. Certains genres et espèces semblent plus actifs que d'autres, l'inhibition des levures généralement est difficile par rapport à l'inhibition des moisissures, de même, la germination des conidies est la phase de croissance la plus sensible à l'inhibition et la différence de sensibilité observée entre les espèces des moisissures peut être liée à leur capacité à changer le métabolisme cellulaire en réponse à des conditions de stress (GEREZ *et al.*, 2009; DELAVENNE *et al.*, 2013; GUPTA et SRIVASTAVA, 2014).

Les acides organiques (métabolites microbiens) comme l'acide lactique sont connus pour leur grande activité antimicrobienne, ils franchissent la membrane bactérienne et peuvent ainsi perturber le fonctionnement de certains enzymes microbiennes.

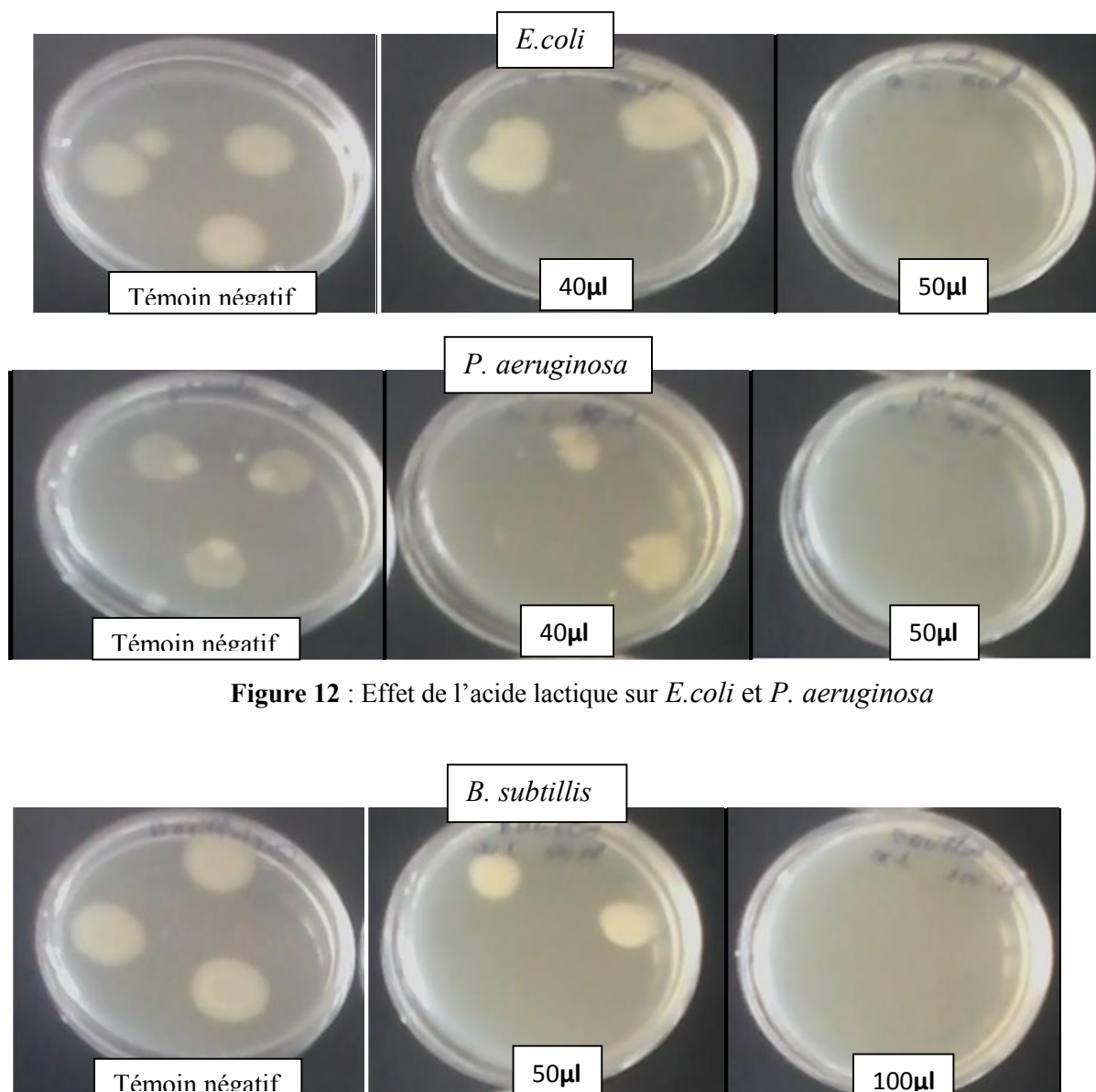


Figure 12 : Effet de l'acide lactique sur *E.coli* et *P. aeruginosa*

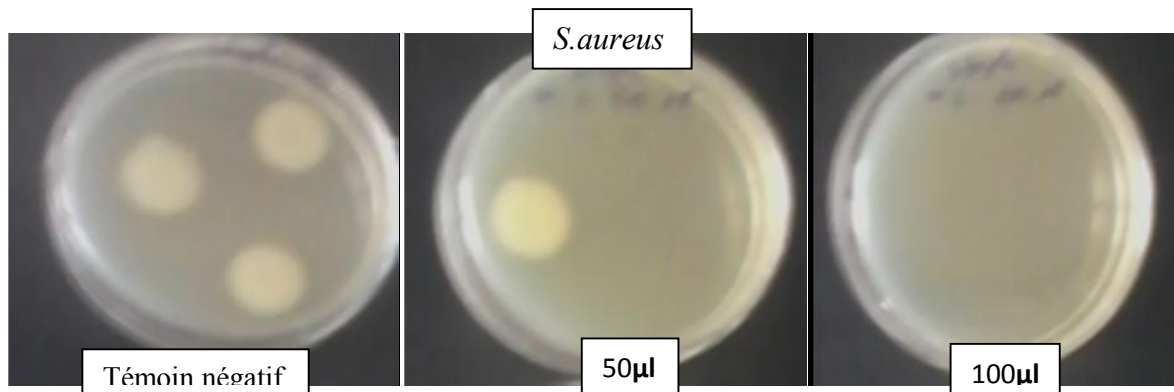


Figure13 : Effet de l'acide lactique sur *B. subtilis* et *S. aureus*

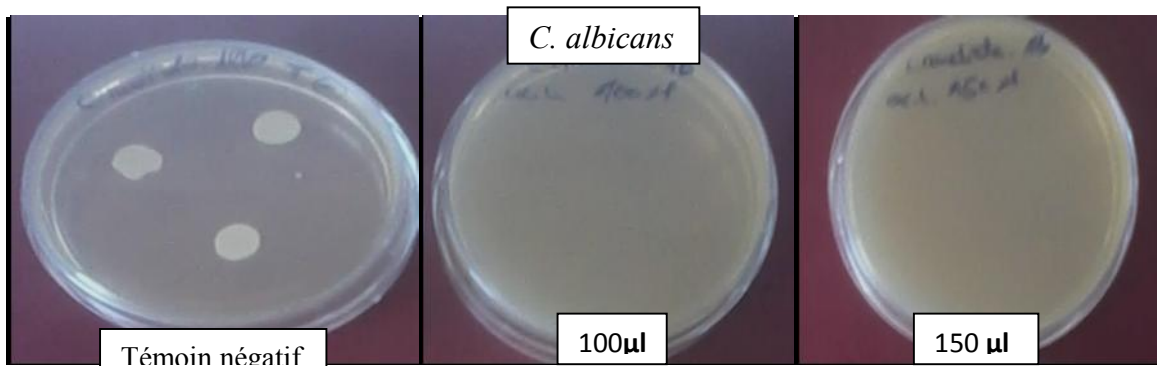


Figure 14 : Effet de l'acide lactique sur *C. albicans*

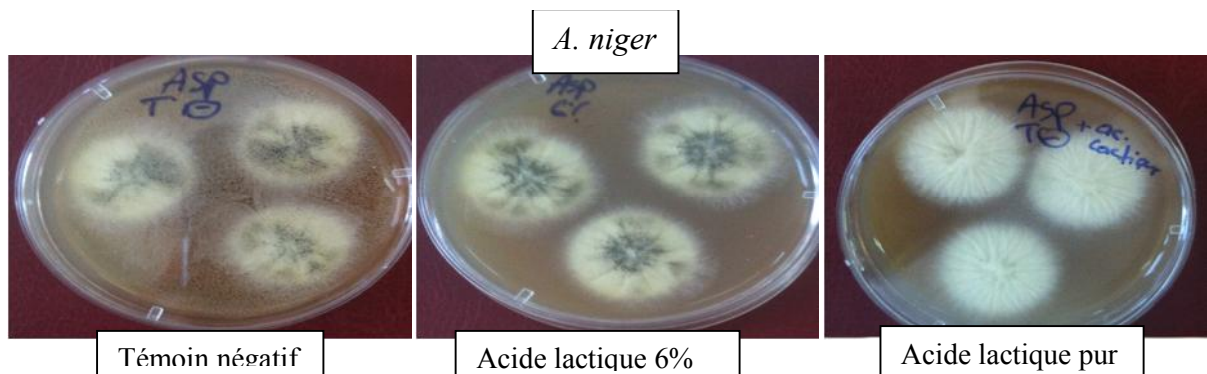


Figure15 : Effet de l'acide lactique sur *A. niger*

De nombreux produits alimentaires se conservent grâce à un pH faible, soit parce qu'ils contiennent naturellement une teneur élevée en acides organiques (par exemples : produits fermentés comme les yaourts, choucroutes...), soit parce que des acides leurs sont volontairement ajoutés (confiseries, boissons...). Dans ces produits, l'acidité participe à la conservation, mais est également recherchée pour la saveur qu'elle apporte. A l'inverse, dans certains produits (plats cuisinés, panification), c'est l'effet conservateur sans la saveur acide qui est recherché.

En effet, selon CHENE (2002) les acides ont un double effet antimicrobien : un effet via l'acidification qu'ils engendrent, et un effet spécifique à l'acide utilisé. :

L'effet acidifiant se manifeste lors de l'ajout d'acide, ceci provoque une diminution du pH externe qui va entraîner une baisse du pH interne des micro-organismes et ainsi inhiber leur développement. Mais, tous les microorganismes n'ont pas la même sensibilité au pH, tout d'abord, le pH interne varie d'un micro-organisme à l'autre (6,5 pour les acidophiles à 9 pour certains alcalophiles), ensuite, certains comme les bactéries fermentaires par exemple supportent de plus grandes variations de pH interne que d'autres. Enfin, une variation du pH externe d'une unité peut engendrer des variations de 0,1 à 1 unité de pH interne selon le micro-organisme, c'est pourquoi, chaque micro-organisme est caractérisé par un seuil de pH en dessous duquel il ne se développe pas.

L'effet spécifique correspond à la nature de l'acide : les acides forts (acide chlorhydrique par exemple) jouent un rôle uniquement sur le pH externe de la cellule. Par contre, les acides faibles étant lipophiles, sont capables de traverser la membrane et ainsi d'agir directement sur le pH cytoplasmique. Les acides organiques étant pour la plupart des acides faibles, ils vont donc agir plus efficacement pour inhiber les microorganismes.

Les acides sont caractérisés par une valeur dite de pKa qui correspond au pH auquel il y a équilibre entre les formes dissociées (COO⁻) et non dissociées (COOH) : au plus le pH est inférieur au pKa, au plus l'acide est sous forme non dissociée. Or, c'est cette forme non dissociée qui a un effet spécifique (en plus de l'effet acidifiant) sur les micro-organismes.

D'après METZNER et *al.*(2004), au niveau de la bactérie cible, les premières structures touchées par l'acidification du milieu extracellulaire sont évidemment les macromolécules de surface(flagelle, pili, récepteur chimique, protéines periplasmiques, paroi,...etc).Ainsi, les bactéries cibles ont peu de possibilités de protéger ces structures : soit elles modifient la structure des sites de fixation des composés acides au niveau de leurs membranes, soit elles évitent la perte de mobilité suite au stress acide en modulant ou en utilisant une voie métabolique alternative. De même DILWORTH et *al.* (1999) ont souligné que si les bactéries cibles n'arrivent pas à modifier la structure des sites ou trouver une alternative pour éviter la perte de mobilité due au stress acide, les protons vont entrer dans la cellule par le changement de gradient de concentration autour de la paroi bactérienne. Selon FOSTER (1999), la baisse du pH intracellulaire provoquée par cet afflux de protons entraîne des perturbations de flux métabolique et des dommages au niveau des macromolécules de surface. Cette baisse de pH intérieur va aussi favoriser l'oxydation des lipides modifiant ainsi leur état d'ionisation et de ce fait, leurs propriétés d'interaction avec les autres constituants cellulaires. Le même phénomène a été observé pour les protéines pour lesquelles une diminution du pH va entraîner une augmentation des charges positives, donc une modification de leur état d'ionisation qui va d'un côté, modifier leur configuration spatiale et altérer leur fonctionnalité, et d'un autre côté, perturber la transcription des gènes. L'ADN lui-même sera affecté par cette baisse de pH qui va altérer les bases puriques et pyrimidiques et ainsi le fragmenter (COTTER *et al.*, 2003)

DJENANE (2011) a rapporté que l'acide lactique peut franchir la membrane cellulaire des bactéries, en se dissociant à l'intérieur de cytoplasme. Les molécules chimiques issues lors de cette dissociation peuvent interférer avec les fonctions vitales de la cellule bactérienne (EKLUND, 1989). En outre, cette dissociation provoque une augmentation du nombre de protons à l'intérieur de la cellule bactérienne jusqu'au moment où la concentration des protons excède la capacité tampon du cytoplasme. Ces derniers seront transportés vers l'extérieur à travers une pompe de protons, diminuant ainsi les réserves énergétiques de la cellule. Quand ces réserves sont épuisées, la pompe de protons cesse de fonctionner, et le pH interne diminue lentement, provoquant ainsi l'altération des protéines et la déstabilisation des autres composés structurels et fonctionnels de la cellule bactérienne, interférant ainsi dans les fonctions vitales de cette dernière (PIARD et DESMAZEAUD, 1991).

IV. Effet du chitosane sur les souches microbiennes (méthode des spots)

Suivant la technique des spots comme celle utilisée pour l'effet de l'acide lactique sur les souches microbiennes, un effet inhibiteur du chitosane sur la croissance microbienne a été observé, selon la souche considérée. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau X.

Tableau X : Effets du chitosane sur les souches bactériennes et fongique.

		Les concentrations (les volumes)						
		200 µl	400 µl	600 µl	800 µl	1000 µl	1500 µl	2000 µl
Les souches microbiennes	<i>E. coli</i>	Croissance	croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>B. subtilis</i>	Croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>S.aureus</i>	Croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>P.aeruginosa</i>	Croissance	croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>C. albicans</i>	Croissance	croissance	croissance	Croissance	croissance	Pas de croissance	Pas de croissance
	<i>A.niger</i>	Croissance	croissance	croissance	Retardement de croissance	Retardement de croissance (+)	Retardement de croissance (++)	Retardement de croissance (+++)

Les résultats du Tableau X montrent que l'effet antimicrobien très significatif du chitosane sur toutes les souches, sauf pour *A. niger* où nous remarquons seulement un retardement de croissance (Figure 19). Nous constatons donc une inhibition totale de la croissance de *E.coli* à partir de 1000µl (Figure 16), de *B. subtilis*, *S. aureus* et *P.aeruginosa* au-delà de 800µl (Figure 17). Pour *C.albicans* l'inhibition totale est observée à partir de 1500µl (Figure 18).

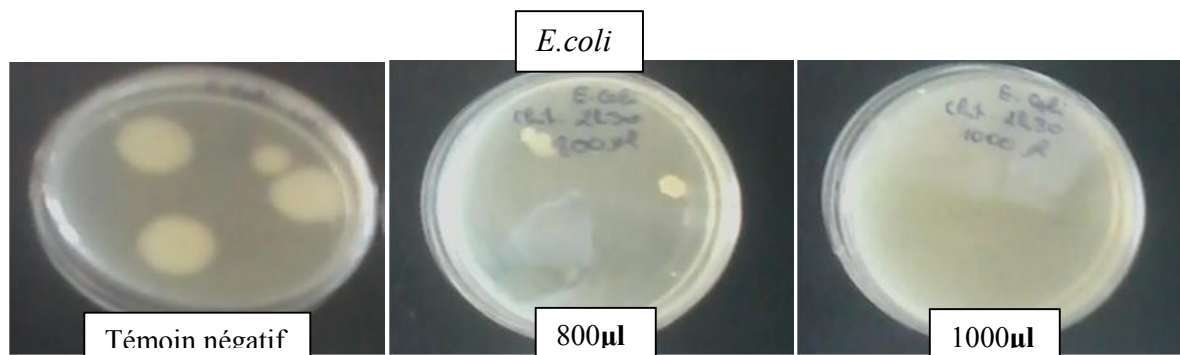


Figure 16 : effet de chitosane sur *E.coli*

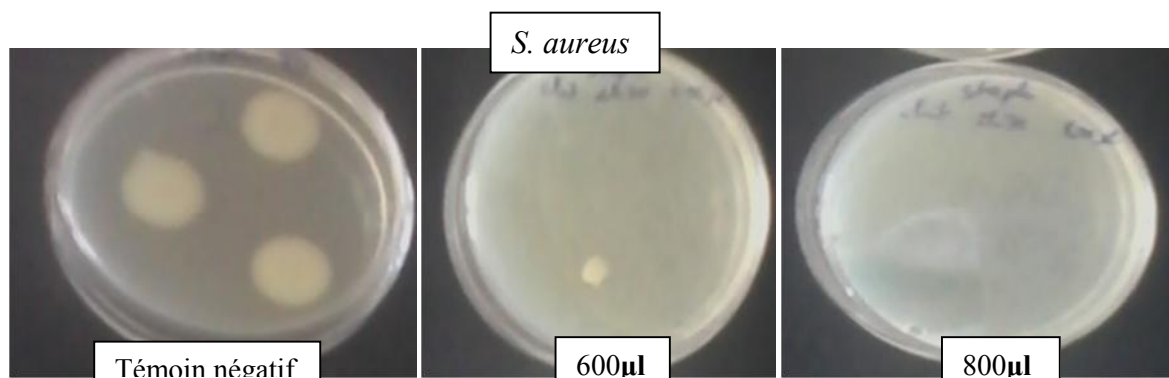
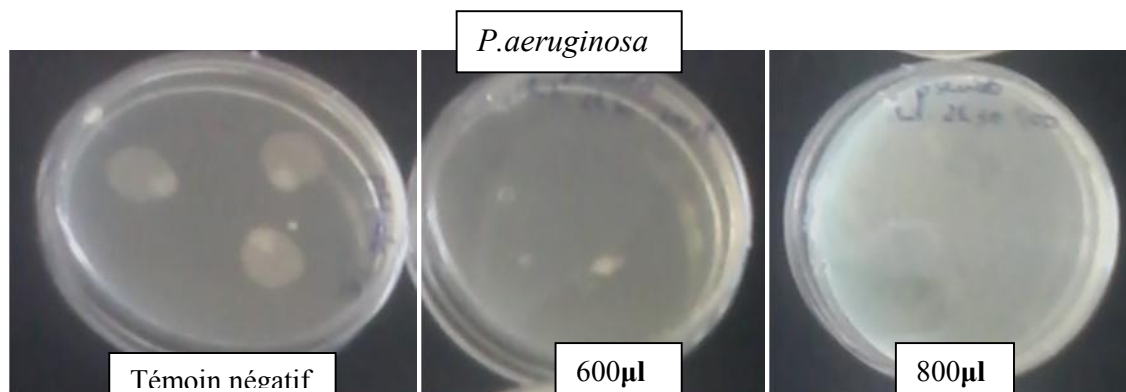
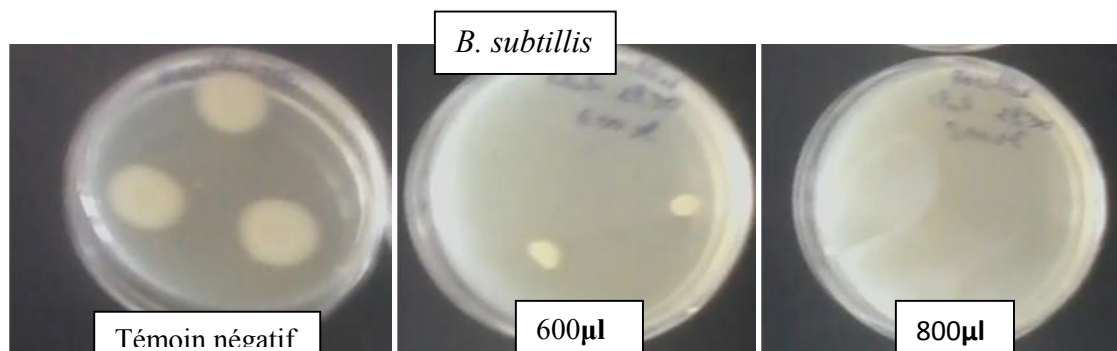


Figure 17 : effet de chitosane sur *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*

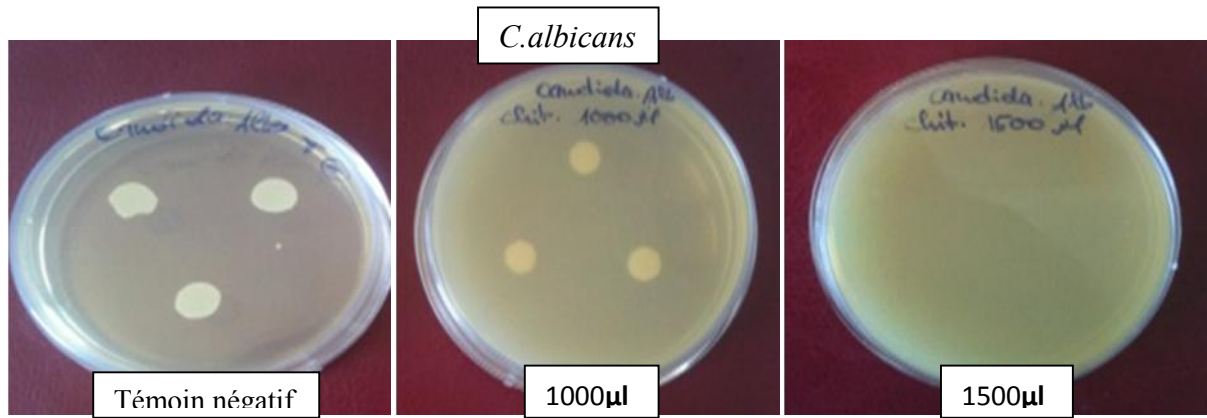


Figure 18 : Effet de chitosane sur *C. albicans*

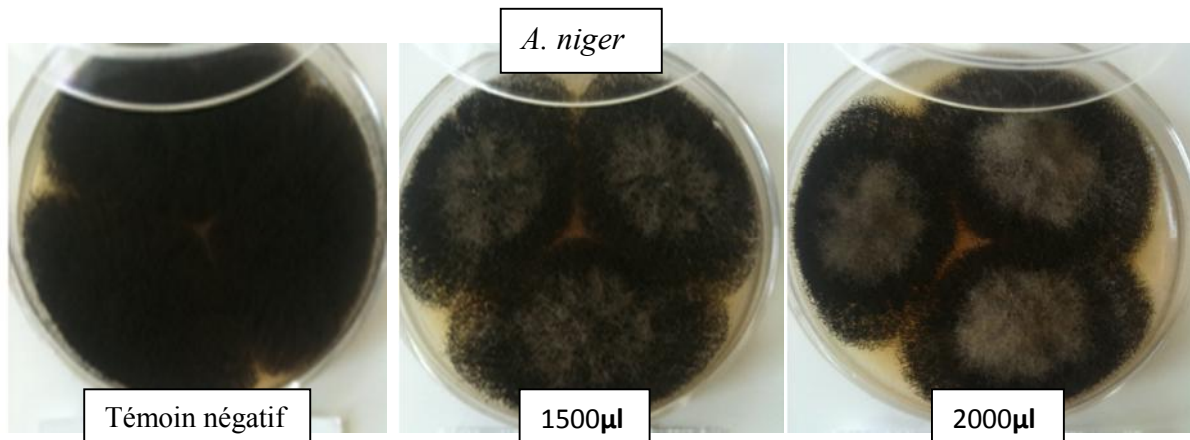


Figure 19 : Effet de chitosane sur *A. niger*

L'activité antibactérienne intense observée est liée probablement à la présence du chitosane soluble dans l'acide acétique sous forme d'oligomères de chitooligosaccharides (COS). Du fait de leurs courtes chaînes et de leurs groupes amines libres, la viscosité des COS est plus faible et leur solubilité augmente à pH neutre. Nous pouvons considérer les COS jusqu'à un degré de polymérisation d'environ 30. Ces COS suscitent depuis peu un grand intérêt pour la santé humaine, principalement dans la nutrition et l'alimentation.

Des études ont démontré leur habilité à augmenter la qualité des aliments (stabilisation pour des produits longue-durée) ainsi qu'à améliorer la santé des consommateurs. De récentes études ont montré les effets bénéfiques des COS notamment par leurs propriétés antimicrobiennes, anticancéreuses, antioxydantes ou encore par leurs effets immunostimulants (JEAN et KIM, 2001, BACON *et al.*, 2000).

Parmi les autres éléments qui influencent l'activité du chitosane, nous pouvons citer :

- L'action du chitosane est, à son maximum, à des pH faibles (6 et 6,5), puisque c'est dans cette zone où les groupements NH₂ sont protonés (le chitosane n'est soluble que dans des acides dilués). Cependant, à des pH plus faibles (entre 1 et 4) l'activité du chitosane

diminue. Ceci est dû à la compétition entre les protons et les groupes ammonium (CHUNG *et al.*, 2003) vis-à-vis des cellules microbiennes.

- La masse moléculaire : un chitosane avec une masse moléculaire élevée semble plus efficace contre les bactéries à Gram négatif, qu'avec les bactéries à Gram positif (NA *et al.*, 2002). De plus, au sein du même type de bactérie, cette influence peut varier. Par exemple, avec *Escherichia coli*, bactérie Gram négatif, l'activité augmente avec la masse moléculaire jusqu'à un certain niveau, puis elle diminue car avec l'augmentation de la masse moléculaire, il y a plus d'interactions intramoléculaires entre les groupes ammonium et les groupes hydroxyle du chitosane ce qui les rendent indisponibles. (LIU, 2001 ; XIE *et al.*, 2002)

- La présence de Ca^{2+} et les métaux comme Zn^{2+} , et Mg^{2+} diminue l'activité antimicrobienne du chitosane, car ce dernier complexe ces métaux (CHUNG *et al.*, 2003). C'est d'ailleurs, ce caractère qui est mis à profit dans le traitement des eaux usées.

Néanmoins, nos résultats concordent avec ceux rapportés dans la littérature ; traitant de l'activité antibactérienne du chitosane. Ainsi, HELANDER *et al.* (2001) ont signalé que l'utilisation du chitosane à forte concentration a un effet bactéricide sur des bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* se montrant plus sensible. De même LAFLAMME *et al.* (1999) qui montrent que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/l réduit considérablement la croissance des souches fongiques.

TORR *et al.* (2005), quant à eux, ils ont montré que le chitosane a un effet antifongique contre *Leptographium procerum* et *Sphaeropsis sapinea* à partir d'une concentration de 0,3 % (m/V).

ROLLER *et al.* (1999) ont étudié l'action du glutamate du chitosane sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, de *Cladosporium cladosporioides*, de *Mucor racemosus*, de *Penicillium aurantiogriseum* et de *Saccharomyces cerevisiae*, dans le jus de pomme. Ils ont démontré une action inhibitrice contre toutes ces souches à une concentration de chitosane de 5 g/l.

BLAISE OUATTARA *et al.* (2000) ont montré que des films obtenus à partir d'une solution du chitosane présentent un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques *Lactobacillus sakei*.

En outre, l'enrobage des fruits par le chitosane a également permis l'inhibition de la croissance la bactérie à Gram positif *Candida lambica* (DEVLIÉGHÈRE *et al.* 2004).

Le chitosane agit sur les bactéries à Gram positif et sur les bactéries à Gram négatif, cependant, son action sur ces dernières est moins importante que celle qui est sur les bactéries à Gram positif (NO *et al.*, 2002 ; COMA *et al.*, 2003).

V. Effet combiné du chitosane et l'acide lactique sur les souches microbiennes

Les résultats de l'effet antimicrobien du mélange d'acide lactique et du chitosane sur les souches testées *E.coli*, *P.aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans* et *A. niger* sont résumés dans le Tableau XI et Figures 21 et 22.

Tableau XI: Effet antimicrobien du mélange d'acide lactique et le chitosane sur les souches microbiennes testées

		<i>E.coli</i>					
		Acide lactique					
		50 µl	40 µl	30 µl	20 µl	10 µl	5 µl
chitosane	1000 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	800 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	600 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	400 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	200 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	100 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale

		<i>P. aeruginosa</i>					
		Acide lactique					
		50 µl	40 µl	30 µl	20 µl	10 µl	5 µl
chitosane	800 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	600 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	500 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	400 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	200 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	100 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale

B. subtilis, S. aureus

Acide lactique

chitosane		100 µl	80 µl	50 µl	30 µl	20 µl	10 µl
	800 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	600 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	500 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	400 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	200 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale
	100 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale

C. albicans

Acide lactique

chitosane		100µl	80µl	60 µl	40 µl	30µl	20 µl
	1500 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	croissance	Croissance
	1000 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	croissance	Croissance
	800µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	croissance	Croissance
	600 µl	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	inhibition totale	croissance	Croissance
	400 µl	Croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Croissance
	250 µl	Croissance	croissance	croissance	croissance	croissance	Croissance

Les résultats du tableau XI montrent que lors de la combinaison des deux agents chitosane et acide lactique sur les souches testées, nous constatons un effet antimicrobien bien distinct.

En effet, les bactéries se sont montrées sensibles à des volumes inférieurs à la CMI des agents antimicrobiens, même à des volumes minimales atteignant les 50% à 75%, l'effet inhibiteur de la combinaison des deux agents est toujours remarquable. Donc, l'effet antibactérien de la combinaison de l'acide lactique et de chitosane est très significatif sur les bactéries en le comparant à l'effet de chitosane et l'acide lactique utilisé séparément (Figure 20)

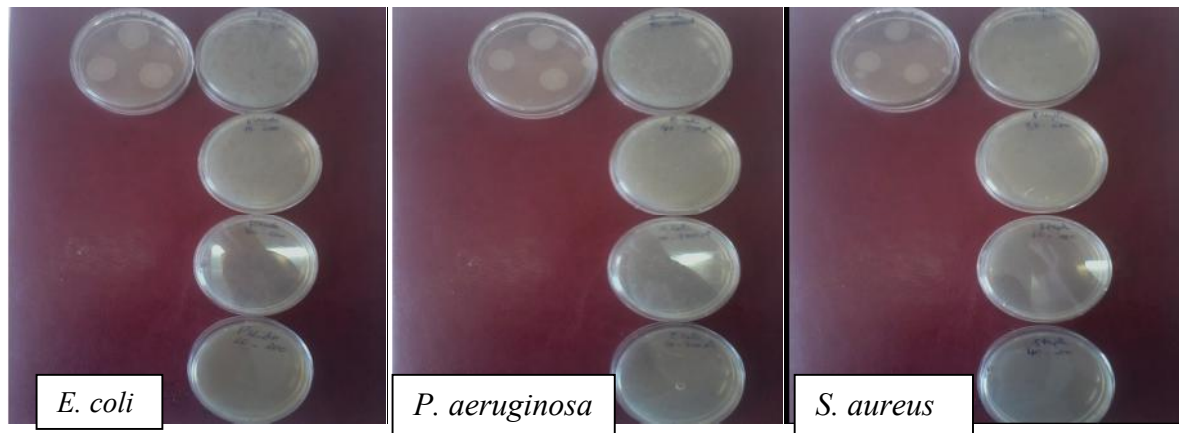


Figure 20 : Effet combiné de l'acide lactique et de chitosane sur les souches bactériennes

Cependant, l'effet antifongique de la combinaison de l'acide lactique et de chitosane sur *C. albicans* et *A. niger* se traduit par une résistance remarquable.

La souche *C. albicans* à montrer une sensibilité importante à des volumes inférieurs à la CMI des agents antimicrobiens. Mais au-delà de combinaison de 30 μ l d'acide lactique et 400 μ l de chitosane la souche montre une résistance à l'effet combiné de deux agents traduisant par une croissance importante (Figure 21)

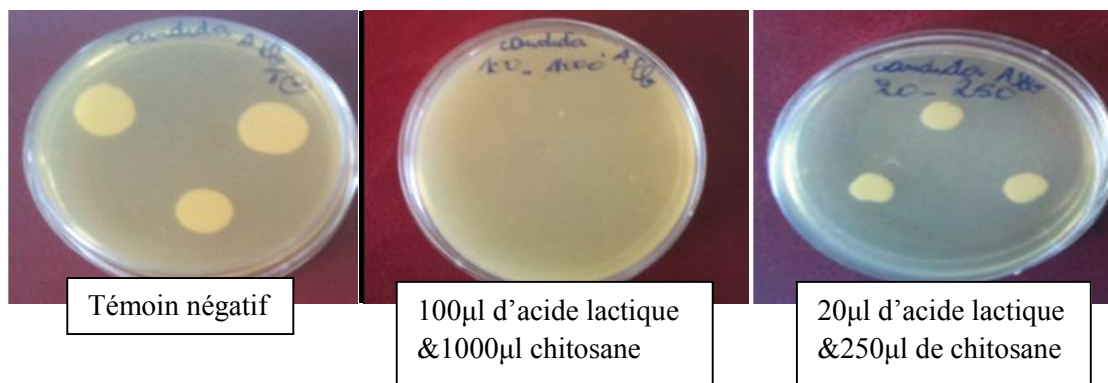


Figure 21 : Effet combiné de l'acide lactique et le chitosane sur *C. albicans*

L'effet antifongique de la combinaison sur *C. albicans* est plus important que l'effet antimicrobien de l'acide lactique et du chitosane utilisés seul, ce qui signifie que les fungi sont plus sensibles pour le mélange que l'acide lactique et chitosane appliqué seul.

Toutefois, l'effet antifongique du même mélange d'agents antimicrobiens sur *A. niger* n'a pas pu être effectué à cause de la souche qui présente une résistance importante vis-à-vis de l'acide lactique et un retardement de croissance de la souche en présence de chitosane, par ailleurs nous n'avions pas pu avoir la CMI d'*A. niger*.

Cet effet antibactérien et antifongique de la combinaison de l'acide lactique et du chitosane obtenu est en accord avec les résultats rapportés par des études similaires comme celle de FOSTER (1999). Ce dernier a observé que la baisse du pH intracellulaire provoquée par un afflux de protons entraîne des perturbations de flux métabolique et des dommages au niveau des macromolécules de surface. Cette baisse de pH intérieur va aussi favoriser l'oxydation des lipides modifiant ainsi leur état d'ionisation et de ce fait, leurs propriétés d'interaction avec les autres constituants cellulaires, idem pour les protéines dont les charges positives augmentent, L'ADN lui-même sera affecté par cette baisse de pH qui va altérer les bases puriques et pyrimidiques et ainsi le fragmenter (COTTER *et al.*, 2003)

KADOUCHE (2013), a affirmé que de façon générale la sensibilité des bactéries à l'effet antibactérien du chitosane semble augmenter avec une diminution du pH de l'aliment. A pH faible le chitosane sera soluble et porte de nombreuses charges positives, il y aura donc la formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane par la transformation des motifs NH_2 en motifs NH_3^+ en milieu acide et les phospholipides de la membrane cellulaire des microorganismes qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur. Cela pourra faciliter l'entrée de l'acide lactique après la déformation morphologique de la membrane créant des pores, cela pourra donc entraîner une perturbation et un changement du pH dans le cytoplasme de la cellule microbienne.

Le chitosane et l'acide lactique peuvent former des liaisons avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme et avec l'ADN des cellules microbiennes et donc provoquer l'inhibition de la synthèse d'ARNm.

A pH plus élevé ($\approx 6,5$), le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote libre (YEN *et al.*, 2009). Ces doublets libres et la présence de nombreux atomes d'oxygène dans le chitosane lui permettent de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourds. Par exemple, il est utilisé pour la purification des eaux, utilisé aussi pour la récupération de métaux dans les effluents industriels.

L'efficacité de la combinaison du chitosane et de l'acide lactique pourrait apparaître comme une alternative intéressante pour l'industrie alimentaire lorsque les doses inhibitrices sont réduites.

Selon FLAUIRO(2011), lors de la combinaison des substances antimicrobiennes, trois effets sont à distinguer : addition, antagonisme et synergie. Pour des objectifs de quantification, le concept de concentration inhibitrice fractionnelle (CIF) est fréquemment utilisé.

VI. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les CMI ont été déterminées uniquement pour le chitosane et l'acide lactique séparément, puisque c'est à l'état individuel que chacun d'eux a montré un effet antimicrobien important qu'à l'état combiné.

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité des souches au chitosane et à l'acide lactique. Les valeurs des CMI varient d'un microorganisme à un autre (Tableau XII).

Plus les CMI sont faibles plus l'activité antibactérienne des agents testés est meilleure. La meilleure CMI est obtenue par l'acide lactique testé sur les souches *E. coli*, *P.aeruginosa* et *C. albicans* (CMI = 50 µl).

Tableau XII : Les valeurs de la CMI pour l'acide lactique et le chitosane

Les microorganismes	CMI pour acide lactique	CMI pour le chitosane
<i>Escherichia coli</i>	50 µl	1000 µl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µl	800 µl
<i>Bacillus subtilis</i>	100 µl	800 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µl	800 µl
<i>Candida albicans</i>	100 µl	1500 µl
<i>Aspergillus niger</i>	Pas de résultat	Pas de résultat

VII. Les concentrations minimales bactéricides (CMB)

Les concentrations minimales bactéricides ont été effectuées à partir des résultats des CMI de l'acide lactique et le chitosane sur les souches microbiennes, la CMB est appliquée en grattant les spots des boîtes qui présente une inhibition totale du microorganisme (CMI) puis étaler dans d'autres boîtes de pétri pour chaque germe contenant le milieu MH pour les bactéries et milieu sabouraud pour la levure.

Les résultats montrant la croissance des bactéries traitées avec l'acide lactique et le chitosane sont présentés dans les Figure 22 et 23.

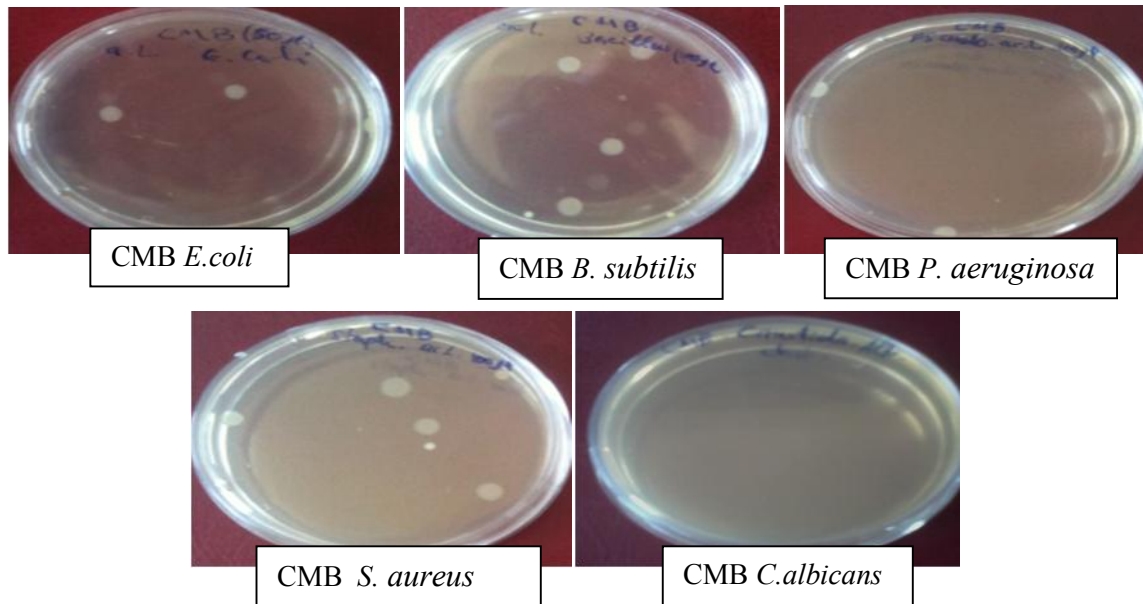


Figure 22 : le test de la CMB pour les bactéries et la levure traité avec l'acide lactique

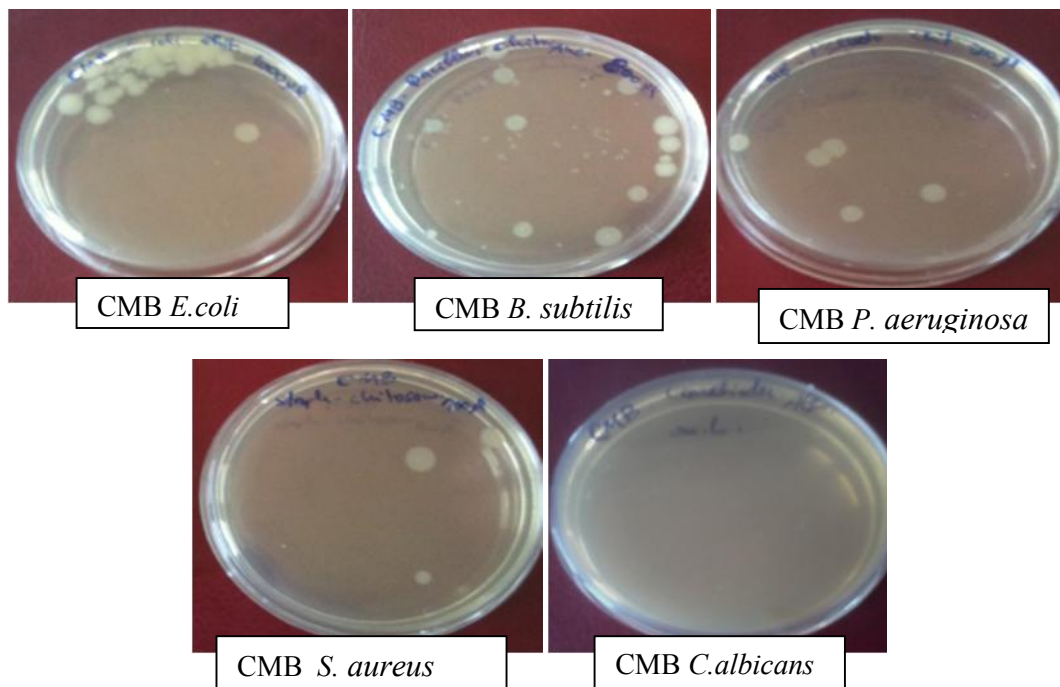


Figure23 : Le test de la CMB pour les bactéries et la levure traité avec le chitosane

Les résultats ainsi obtenus montrent que les deux agents ont un effet bacteriostatique et un effet fongicide.



Conclusion

Conclusion générale

La présente étude avait pour objectif d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'acide lactique et du chitosane utilisé individuellement ou en combinaison en vue de leur utilisation éventuelle dans le domaine alimentaire.

Les résultats obtenus nous amènent à conclure que l'acide lactique et le chitosane sont relativement plus efficaces sur les bactéries : *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* que sur la moisissure *A. niger*.

Toutefois, l'effet antimicrobien de l'acide lactique, il s'est avéré plus important à des quantités faibles pour chaque bactérie et pour *C. albicans*, par contre l'effet antimicrobien du chitosane est observé à des quantités relativement élevées. L'effet inhibiteur engendré sur *A. niger* n'est cependant pas négligeable.

La combinaison de ces deux agents (acide lactique – chitosane) a montré également des résultats très intéressants laissant suggérer une possible utilisation de ces agents dans la conservation des produits alimentaire.

Il serait intéressant de continuer cette étude en utilisant une matrice alimentaire pour évaluer l'efficacité de ces agents antimicrobiens et déterminer leurs interactions avec les composants alimentaires. Aussi serait-il intéressant de déterminer l'impact de ces agents sur la flore intestinale afin de prévenir sa perturbation chez le consommateur. Il serait également judicieux de déterminer l'impact des ces substances sur les propriétés sensorielles des aliments traités.

Références bibliographique

Références bibliographique :

« A »

ABOYA MOROH J. L. (2014). Resistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Agricultural sciences. Université de Bretagne occidentale – Brest. Université Felix Houphou et Boigny. France.

AGULLO E., RODRIGUEZ M.S., RAMOS V., ALBERTENGO L.(2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromol. Biosci.* 3, 521-530.

ARCHAMBAUD M. (2009). Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques *in vitro*. Laboratoire Bactériologie-Hygiène. CHU Rangueil. Toulouse, France

ASADA Y., OSHIKAWA T., WELL I. (1998). Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Planta medica.* 64(8): 746-747.

ATKINSON B., MAVITUNA F.(1991). Industrial microbial processes. In *Biochemical engineering and biotechnology*.

« B »

BACHELOT C., BLAISE A., CORBEL T., LE GUERNIC A. (2006 a). Les Huiles Essentielles. U.C.O Bretagne Nord. Licence 2 Biologie, Option travail d'étude.

BACON J., MOODY K., BATES, J., HAYTON R., MA C., MCNEIL A., SEIDEL O. and SPITERI M.(2000). Generic Support for Distributed Applications. *IEEE Computer,* 33(3):68-76.

BADIS A., LAOUABDIA-SELLAMI N., GUETARNI D., KIHAL M. et OUZROUT R. (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales " ARABIA ET KABYLE". *Science et technologie.* pp : 23, 30-37.

BAZINET L., CASTAIGNE F. (2014). Concepts de génie alimentaire. Procédés associés et applications à la conservation des aliments, Edition. tech& doc. pp : 18-29, paris.

BECILA A. (2009). Préventions des altérations et des contaminations des aliments. Post-graduation spécialisée en Alimentation, Nutrition et Santé. Université Mentouri, Constantine.

BEKHECHI C., ATIK-BEKKARA F., ABDELOUAHID D. E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie.*

BELALIA R. (2006). Synthèse d'un biocide par modification chimique de chitosane : préservation du bois, préservation des aliments, l'université hassan II. Maroc.

BELK, K.E. (2001). Beef decontaminating technologies. Beef facts. Denver. National Cattlemen's Beef Association

BENABBOU R. (2009). developpement et caracterisation de films antimicrobiens pour la biopréservation des produits marins prêts à consommer.Université Laval.québec.

BERCH E. (2007). Detection of mycobacterium tuberculosis complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis. Society for general microbiology.

BERGHE V. A., VLIETINCK, A. J. (1991). Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Method for Plant Biochemistry

BLACKWELL J. (1973). Chitin in Biopolymers. Walton AG, Blackwell J, Edition. New York:Academic Press, 474.

BORGES F. (2014).Sécurité sanitaire des aliments. Ensaia .Université de Lorraine.pp : 6-12. Paris.

BOUDJELAL A., NANCIB N. (2001). Production d'Acide Lactique par Lactobacillus Rhamnosus sur Milieu à Base de Jus de Dattes. Energ. Ren. Production et Valorisation-Biomasse. Pp : 41, 41-46.

BOURGEOIS.C.M., MESCLE.J.F., ZUCCA.J. (1988). Aspect microbiologie de la sécurité et de la qualité alimentaires, Paris, vol.1

BOUSSEBOUA H. (2006). Eléments de microbiologie générale. Pp : 32, 160-167

BOUZA A., (2009). Les toxi-infections alimentaires collectives dans l'est algérien. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro alimentaires (INATAA). pp :28- 35 Université Mentouri .Constantine

BRUL S. AND COOTE P. (1999) Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiology.

BRUNETON, J. (1999). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Paris.

« C »

CANTON E., PEMA'N J., VIUDES A., QUINDO'S G., GOBERNADO M. and ESPINEL-INGROIF A. (2003). Minimum fungicidal concentration of amphotericin B for bloodstream Candida species. J. Diagn. Micro bio. Infect. Dis. 45:203-206.

CDC (2000). Les infections d'origine alimentaire.

CE COMMISSION EUROPEENE JUIN. (2001) .proposition en matière de lutte contre la résistance microbienne.

CHEN, C.S., LIAU, W.Y., TSAI, G.J.(1998).Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. J. Food Prot. 61, 1124-1128.

CHENE C. (2002). Les acides organiques. www.scribd.com.

CHUNG H.J., STEINBERG J.P., HUGANIR R.L., LINDEN D.J.(2003). Requirement of AMPA receptor Glu R2 phosphorylation for cerebellar long term depression. *Science*, 300. pp : 1751-1755.

COEI,Codex OEnologique International. (2004). Acides lactiques: Acide L-Lactique, Acide D-Lactique, Acide 2-hydroxypropanoïque. *news.reseau-concept.net*.

COOPER, K. E. (1955).Theory of antibiotic inhibition zones in agar media. *Nature* **176**: 510- 511.

COTTER J.J., WELLEFORD E.A., VESLEY-MASSEY. And THURSTON M.O. (2003). Collaborative community, based research and innovation. *Family & community Health*, 26, 329- 337.

« D »

DE BILLERBECK V.G., ROQUES. C., VANIERE. P., MARQUIER. P., (2007) : Hygiènes. 3: 248-250

DELAVENTE E., MOUNIER J., D'ENIEL F., BARBIER G., LE BLAY G. (2012). biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one- year period, *Int. J. food Microbiology*, 155, 185-190

DEVLEIGHIERE, F., VERMEULEN, A., DEBEVERE, J.(2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21, 703-714.

DILWORTH F.J., FROMENTAL-RAMAIN C., REMBOUTSIKA E., BENECKE A., CHAMBON P.(1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1995-2000.

DION P.(2000). *Microbiologie générale*, Notes des cours BIO-19934 et BIO-12286, Université Laval.

DJENANE D., YANGUELA J., MONTANES L., DJERBAL M., and RONCALES P. (2011). Antimicrobial activity of *pistacia lentiscus* and *satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, 1046- 1053

DJIDEL A. (2007). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus*. sur jus de datte. Cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues. Institut National Polytechnique de Lorraine.

DORTU C., THONART P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* , 13: 143-154.

« E »

EKLUND T. (1989). Organic acids and esters. In: mechanisms of action of food preservation procedures .Elsevier Applied Science. Edition Gould G.W. PP 161-200.

EMILIE F. (2012).Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Edition tec& doc. Pp41-57. Paris

EUZEBY. (2005). Parasitologie médicale et vétérinaire. Edition tec&doc. PP 360. Paris

EUZEBY J.P. (2006). Document destiné aux travaux pratiques de bactériologie. Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.

« F »

FALLEH H, KSOURI R, CHAIEB K, KARRAY-BOURAOUI N, TRABELSI N, BOULAABA M and ABDELLY C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

FLAEIRO. (2011) Refinando dados espaciais para a conservação da biodiversidade. *Natureza & Conservação*. pp :160-166

FOSTER B. A., COFFEY H.A., MORIN M.J., RASTINEJA D.F.(1999) Pharmacological rescue of mutant P53 conformation and function *Science*.286(5449):2507-10.

FRANTZ L.E., DEVEDE C. (2008). Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés, université du Quebec. Montréal.

« G »

GEREZ C.L., TORINO M.I., ROLLAN G., DE VALDEZ G.F. (2009).Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties, *food control*, 20, 144-148.

GILLESPIE Z., PULIDO O., VAVASOUR., E. (2011).Démarches d'évaluation des risques relatifs aux contaminants alimentaires cancérogènes. INTECH open Access Publisher. pp : 32- 33-34, Canada.

GIRARD G. (2010). Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaire d'hier à aujourd'hui, thèse de doctorat en pharmacie. Université de Nancy.

GIVRY S. (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*.

GUIRAUD J.P. (1988). Microbiologie alimentaire. Edition. Dunod, Paris

GUIRAUD J., GALZY. (1988). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. pp : 79, Paris

GUIRAUD J.(1998). Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques. Edition Dunod, Paris.

GUIRAUD J.P.(2003). Microbiologie alimentaire .Edition Dunod, paris.

GUIRAUD J. P. ROSEC J. P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR.300.

GUPTA R., SRIVASTAVA S. (2014). Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage, *Food Microbiology*, 42,1-7.

« H »

HOFVENDAHL K., HAHN-HAGERDAL B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol*, 26 : 87- 107

« J »

JEON Y.J., KIM S.K. (2000). Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate polymers*, 41, pp.133-141

JEON, Y.J., KIM, S.-K. (2002). Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J microbiol. biotechnol.* 12, 503.

JEQUEL M.(2013). L'alteration microbienne des aliments. *Microbial spoilers in food*. Quimper.

JOFFIN.C. et JOFFIN.J.C. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod, Paris.

« K »

KADOUCHE S. (2013). Utilisation des biomatériaux dans le traitement des eaux, thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri. Pp : 50. Tizi-Ouzou

KAMAGAT E., KONE D., COULIBALY N.T., BROU E., SIXOU M. (2001). Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. *Ordonto-Stomatologie tropicale*. N° 95

KECHKAR M. (2008). Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne, mémoire de magister, université de Constantine.

KEDDOU M. (2008). Elaboration, caractérisation et application de membranes polymères à base de chitosane, département chimie, université M'Hamed Bouguera Boumerdes. PP :15.

KHOBZAOUI S., (2014). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des noyaux des dattes variété « Ajwa », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers .Pp 18-19 – 20. Université Abou Bekr Belkaïd.Tlemcen.

KOŁODZIEJSKA I., WOJTASZ-PAJAK A. (2000). Deacetylation of chitin in a two- stage chemical and enzymatic process, *Bulletin of the sea Fisheries Institute*, 2(150), 15-24.

KÖNIG H. ET FRÖHLICH J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg.

KRAJEWSKA B. (2005). membrane- based processes performed with use of chitin/chitosan materials. Separation and purification Technology 41-305- 312 .

KUETE V., PENLAP BENG V., ETOA F-X., MODJO S.L., BOGNE P., ASSOBI J. C., LONTSI D.,(2004). Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruit de *Citrus medica* lin. (*Rutaceae*). Pharmacie Médecine Traditionnelle Africaine.

KURITA, K., 2006. Marine Biotechnol 8-203.

KUWAKI S., OHHIRA I., TAKAHATA M., MURATA Y. and TADA M. (2002) antifungal activity of the fermentation product of herbs by lactic acid bacteria against tinea. *J.Biosci Bioeng* 94,401-405

« L »

LAFLAMME, P., BENHAMOU, N., BUSSIERES, G., DESSUREAULT, M.(1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Can. J. Bot.* 77, 1460–1468

LAHLAH F., Z.(2008).Extraction des flavonoïdes par le butanol et le chloroforme a partir de *silybum marianum* et étude de leur activité antimicrobienne, pp.10.Université Mentouri-Constantine

LECLERC H .,GUAILLARD J .L et SIMONET M., (1995). Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien.Edition Doin , PARIS .

LESAGE M. (2013).Toxi-infections alimentaires, évolution des modes de vie et production alimentaire. Centre d'étude et de prospectives. pp:2-3-4. Montreuil, paris

LIU, X.F., GUAN, Y.L., YANG, D.Z., LI, Z., DE YAO, K., 2001, Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324-1335.

LIU H., DU Y., WANG X., SUN L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol.* 95, 147-155.

LIU X.F. (2001).Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 79, 1324-1335.

LOUIS J. (2007). Microbiologie alimentaire. Université Montpellier 2, Sciences et Technologies des Industries Alimentaires. pp : 1-14. Paris.

« M »

MAJOROS L., KARDOS G., SZABO B. and SÍPICZKI M. (2005). Aspofofungin susceptibility testing of *Candida inconspicua*: correlation if different methods with the minimal fungicidal concentration (MFC). *Antimicrobial agents and Chemotherapy*; 49(8) 3486-3488.

MAPAQ (2013). agriculture, pêcheries et alimentation- toxi-infections alimentaire, Québec.

MARS DI BARTOLOMEO. (2011). Critère microbiologiques applicable aux denrées alimentaires. Lignes directrice pour l'interprétation. Grand duché de Luxembourg

METZNER R. (2004) Teonanacatl, sacred mushroom of visions. Four Tree, El Verano, CA.

MIRZADEH H., YAGHOBI N., AMANPOUR S., AHMADI H., ALI MOHAGHEGHI M., HORMOZI F.(2002); Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of Persian gulf as blood hemostasis agent, Iranian Polymer Journal, 11(1), 63-68.

MOLLAPOUR M. et PIPER W.(2008). Novel stress responses facilitate *saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of the monocarboxylate preservatives. PP:169-177

MTHUR N.K., NARANG C.K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. J. Chem. Educ. 67, 938 – 942.

MUZZARELLI, R.A.A., 1985. Chitin in: The polysaccharides. Edition Aspinall GO, London: Academic press 3, 417.

« N »

NABET N. (2009). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des substances végétales actives (polyphénols et huiles essentielles) et de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium*. Pp :130. Université Abderrahmane MIRA. Bejaia.

NAFTI Y, 2011; biochimie alimentaire, édition biohay, pp : 55. Djelfa,

NO H.K., PARK N.Y., LEE S.H., MEYERS S.P.(2002) antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int. J. Food Microbiology, 74, 65-72.

« O »

OI E. (2008) Office International des Epizooties

ONESIPPE C. (2005). Etude des systèmes polyélectrolytes/Tensioactif en phase aqueuse et l'interface liquide/gaz. Application à l'élaboration de microcapsules. Ecole Doctorale : Science chimiques et physique, Université de Montpellier II, France.

ONSOYEN E., SKAUGRUD O. (1990). Métal recovery using chitosan. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 49, 395-404.

OUSSOU K. R., KANKO C., GUESSEND N., YOLOU S., KOUKOUA G., DOSSO M., N'GUESSAN Y. T., FIGUEREDO G., CHALCHAT J. C. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d'Ivoire. Comptes Rendus Chimie.

« P »

PANISSET J.C., DEWAILL Y.E., DOUCET L., EDUC H. (2003). Contamination des aliments. Edition Tec & Doc. pp: 372 , 373, 374, Paris :

PARK P.L., JE L.Y., JUNG W. K., AHN C.B., KIM S.K.(2004). Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology*, pp: 219, 529-533.

PEDRO HENRIQUE S.S. (2015).Antimicrobial potential of chitosan.African journal of microbiology research 9(3), pp.147-154

PERRY J., STALEY J., LORY S ET AL. (2002). Microbiologie. Cours et question de révision. Edition Dunod.pp:159-160. Paris

PIARD J.C., DESMAZEAUD M.J.(1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Le Lait*. 71, 525-541.

PIARD J.C.,KUIPERS O.P., ROLLEMA H.S., DESMAZEAUD M.J. AND DEVOS W.M.(1993).Structure,organization and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotic produced by *L.lactis* subsp.*lactis*.*J.Biol.Chem.*, 268,16361-8.

PIBIRI M.C. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311. Faculté Environnement Naturel, architectural et construit, Institut des Infrastructures, des Ressources et de l'Environnement, Section d'Architecture, Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne

PRESCOT T., HARLEY, KLEIN, (2007), microbiologie.2^{ème} édition française.DE Boeck.

PRESCOTT, HARLEY ET KLEIN (1995). Microbiologie. *DeBoeck-Wesmael.S.A.,1014.* Radhakrishnan V V., Madhusoodnan K.J. et Kuruville K.M., (1992) Cinnamon the spicy bark, *Spice India*; 5(4): 12-13.

PRINGSULAKA O., THONGAM N., SUWANNASAI N., ATTHAKOR W., POTHIVEJKUL K., RANGSIRUJI A. (2011). Partial characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control* , 23: 547-551

POT B. (2008) The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments.* Lavoisier. Paris, France pp 1-152.

POIRIER M: Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide Chlorure de lithium. Université de Laval; pp : 2000.

« R »

RABEA E.I., BADAWY M.E., STEVENS C.V., SMAGGHE G., STEURBAUT W., (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.* 4, 1457-1465.

RAMSAY D. (2011).Toxi-infection alimentaire. Bilan 1^{er} avril 2010 au 31 mars 2011. Direction générale de la santé animale et de l'inspection des aliments, Québec

RAPPUOL I. (2000). Novel approaches to vaccine delivery.

REZGUI A., BEN MAÏZ N. et MOUSSA M. (2008). Modélisation du fonctionnement hydrodynamique et écologique du Lac Nord de Tunis. *Sciences de l'Eau*, Canada, 21, 3 : 349-361.

RINAUDO M. (2006).Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31, 603-632.

ROBERTS G.A.F.(1992). Chitin Chemistry. London: MacMillan

ROLLER S. and COVILL N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice.int.J. food microbial. 47, 67-77.

ROUSE S., VAN SINDEREN D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Prot.* **71**, 1724– 1733.

ROUSSARY A. (2010).Vers une recomposition de la gouvernance de la qualité de l'eau potable en France. De la conformité sanitaire à l'exigence de qualité environnementale. Université Toulouse le Mirail - Toulouse II.

« S »

SALMINEN S., WRIGHT A. V., OUWEHAND A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

SCHAAF SMA G. (1996).State of the art concerning probiotic strains in milk products. International Dairy Fed. Nutrition News

SENG J. M. (1988).Chitine, chitosane et dérivés, de nouvelles perspectives pour l'industrie, Biofutur. pp. 40-44.

Singh S.K., Ahmed SU A.(2006).Metabolic engineering approaches for lactic acid production. Process Biochemistry.

SÖDERGARD A., STOLT M.(2002).Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. Progress Polymer Science.

SUDARSHAN N.R., HOOVER D.G., KNORR D.(1992).Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnol. 6, 257-272

« T »

TOKORO, A., TATEWAKI K., SUZUKI T. MIKAMI S., SUZUKI M.,SUZUKI.(1988). Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor.Chem. Pharm. Bull. 36, 784.

TIMBUNTAM W. SRIROTH K. TOKIWA Y. (2006). Lactic acid production from sugarcane juice by a newly isolated lactobacillus sp.Biotechnol Lett 28:811-814

« V »

VERONIQUE D.M.(2011).Activite Antimicrobienne D'un Extrait Peptidique Issus D'un Hydrolysats Trypsique De Protéines De Lactosérum, Faculté Des Sciences De L'agriculture et De L'alimentation.Université Laval .Québec.

« W »

WIEGAND I., HILPERT K. and HANCOCK R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* 3: 163-175.

« Y »

YALA D., MERAD A. S., MOHAMEDI D. and OUAR KORICH M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.

YEN C.F., LEE Y., TANG T.C., YEN J.Y.(2009). Predictive value of self-stigma, insight, and perceived adverse effects of medication for the clinical outcomes in patients with depressive disorders. *J.Nervous and Mental Disease*,197(3):172-177.

« Z »

ZAIKA L. L. (1988). Spices and Herbs. Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *J. Food Safety*.

ZEMMOURI H. (2008). Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie.

ZOUHIR A., E. KHEADR I. FLISS and HAMIDA J. B. (2011). Partial purification and characterization of two bacteriocin like inhibitory substances produced by bifidobacteria. *African .J. Microbiology Research* 5: 411-418.