

**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 Agronomiques**  
**Département de Biochimie-Microbiologie**



**Polycopié de Cours**  
**Techniques d'Analyse et de Contrôle**  
**Destiné aux étudiants en Licence Microbiologie et Biotechnologie**  
**Microbienne**

Présenté par **Dr. DERMECHE Samia**

**2023-2024**

# Avant-propos

Dans le présent polycopié sont reprises les différentes parties du cours de méthodes d'analyse et de contrôle, dispensés au premier et du second semestre, à l'intention des étudiants de troisième année Licence Microbiologie et Biotechnologie Microbienne.

A travers ce palier d'études de Licence, les techniques qui sont incontournables pour l'analyse biochimique, microbiologiques sont abordées de telles sortes à permettre aux étudiant de saisir les objectifs des méthodes (tant dans un laboratoire de recherche que dans un établissement de contrôle de la qualité), leurs choix selon la nature structurale, la bioactivité des molécules et leur importance dans les différents domaines d'application.

Afin d'éviter tout risque sur la santé du consommateur, les examens biochimiques, microbiologiques et hygiéniques jouent un rôle prépondérant dans les domaines alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et de la biotechnologie de production. Dans ce contexte, le présent fascicule retrace les grandes lignes menant à la réalisation du contrôle biochimique et microbiologique des produits. Il est scindé en deux chapitres, où sont décrites les techniques d'analyse biochimiques dans le premier puis les techniques de bases d'analyse et de contrôle en microbiologie dans le second.

Dans la première partie, sont exposés les méthodes de fractionnement usuelles, indispensable pour l'extraction de biomolécules, suivie des méthodes chromatographiques analytiques et séparatives. La seconde partie passe en revue sur l'importance du contrôle, les techniques de prélèvements, conditions du transport et la préparation des échantillons qui constituent une étape délicate, très importante et cruciale dans le contrôle microbiologique. Ce chapitre traite les méthodes de dénombrement et les obstacles rencontrés lors du dénombrement qui tiennent surtout aux diverses sources de variation susceptibles d'entacher la fiabilité des résultats (traitement de l'échantillon, modalité de la prise d'essai, mode d'homogénéisation, réalisation des suspensions mères, des dilutions, revivifications des bactéries éventuellement stressées).il traite également les méthodes de conservation et le contrôle de l'efficacité de stérilisation et des moyens employés pour l'hygiène.

# Sommaire

## *Première partie : Méthodes d'Analyses et Biochimiques*

1. Aperçu global sur les méthodes d'analyses et de contrôle biochimiques et leurs domaines d'applications .....	1
1.1. Sources et origines des échantillons .....	1
1.2. Propriétés biologiques et/ ou techno-fonctionnelles des biomolécules recherchées .....	3
1.3. Orientation du choix de la méthode selon les propriétés de l'échantillon .....	4
1.4. Méthodes de fractionnement préparatives .....	6
1.4.1. Broyage et homogénéisation .....	6
1.4.2. Filtration .....	6
1.4.3. Dialyse .....	12
1.4.3.1. Membranes de dialyse .....	12
1.4.3.2. L'électrodialyse .....	13
1.4.3.3. Osmose inverse .....	14
1.4.4. Méthodes d'extraction par solvant à l'ampoule à décanter .....	14
1.4.4.1. Extraction liquide-liquide .....	14
1.4.4.2. Extraction solide-liquide .....	14
1.4.4.3. Evaporation des solvants d'extraction et concentration des extraits .....	17
1.4.4.4. Extraction par distillation et hydrodistillation .....	18
1.4.6. Méthodes d'extraction par précipitation .....	20
1.4.6.1. Précipitation par les sels (salting out ou relargages) .....	21
1.4.6.2. Précipitation par les solvants organiques .....	22
1.4.6.3. Précipitation isoélectrique .....	23
1.4.7. La centrifugation .....	23
1.4.7.2. Différents types de centrifugeuses .....	25
1.4.7.3. Centrifugation différentielle .....	26
1.4.7.4. Centrifugation en gradient de densité .....	26
1.4.7.5. Applications .....	27
1.5. Techniques chromatographiques .....	28
1.5.1. Chromatographie : aspects généraux .....	28
1.5.2. Classification .....	28
1.5.3. Expérience de base en chromatographie sur colonne (basse pression) .....	30
1.5.4. Analyse quantitative et qualitative .....	31
1.5.5. Chromatographie planaire : Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	
1.5.5.1. Mise en œuvre de la chromatographie planaire .....	33
1.5.5.2. Applications de la CCM .....	35
1.5.5.3. CCM bi-dimensionnelle .....	36
1.5.5.4. CCM quantitative .....	36
1.5.6. Chromatographie sur colonne .....	37
1.5.6.1. Chromatographie sur échangeurs d'ions .....	37
1.5.6.2. Chromatographie d'affinité .....	39
1.5.6.3. Chromatographie d'exclusion moléculaire .....	39
1.5.6.4. Applications préparatives .....	42
1.5.7. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) .....	41
1.5.7.1. Principe .....	42
1.5.7.2. Instrumentation .....	43

1.5.7.3. Applications .....	44
1.5.8. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	44
1.5.8.1. Principe.....	45
1.5.8.2. Instrumentation.....	46
1.5.8.3. Applications de la CPG .....	46
1.6. Méthodes de dosages biochimiques .....	47
1.6.1. Dosage colorimétrique .....	47
1.6.1.1. Réalisation d'une gamme d'étalonnage au spectrophotomètre .....	47
1.6.1.2.Exemples de dosage (les protéines) .....	48
1.6.2. Méthodes d'immuno-dosage .....	48
1.6.3. Méthodes chromatographiques .....	48
1.6.4. Méthodes électrophorétiques.....	49

## ***Deuxième partie : Méthodes d'Analyses et Microbiologiques***

2. Application à l'analyse et au contrôle de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques .....	50
2.1. Politique de contrôle.....	50
2.2. Niveaux de contrôle .....	50
2.3. Contrôle de la qualité hygiénique.....	50
2.4. Contrôle de la qualité marchande.....	51
2.5. Contrôle d'hygiène au niveau des locaux, des équipements et des matières premières dans les ateliers de fabrication (Points de contrôles) .....	51
2.5.1. Qualité microbiologique des aliments.....	51
2.5.2. Catégories de microflores recherchées.....	52
2.5.3. Qualité microbiologique des produits cosmétiques .....	53
2.5.4. Qualité microbiologique des produits pharmaceutiques .....	53
2.5.5. Contrôle microbiologique de l'hygiène .....	53
2.5.5.1. Contrôle de la qualité microbiologique de l'air .....	54
2.5.5.2. Contrôle de la qualité microbiologique des surfaces .....	54
2.6. Prélèvement des échantillons solide pour l'analyse microbiologique .....	57
2.7. Transport et conservation des prélèvements .....	57
2.8. Préparation et traitement de l'échantillon pour l'analyse.....	57
2.8.1. La revivification .....	60
2.8.2. Enrichissement ou concentration .....	60
2.9. Méthodes de contrôle .....	60
2.9.1. Techniques d'examen microscopique : état frais et colorations usuelles .....	60
2.9.2. Techniques de dénombrement ou de numération.....	61
2.9.2.1. Dénombrement direct des cellules à l'aide d'un microscope : la cyométrie .....	61
2.9.2.2. Les cellules de numération .....	61
2.9.2.3. Méthode par cytométrie sur filtre (CSF) et observation par épifluorescence DEFT ( <i>Direct Epifluorescent filter technique</i> ) .....	65
2.9.2.4. Cytométrie en flux (CMF) .....	66
2.9.2.5. Évaluation de l'activité globale .....	67
2.9.2.6.Dénombrement indirect sur un milieu solide (estimation de la flore viable) .....	68
2.9.2.7. Numération, après une phase de multiplication en milieu liquide .....	72
2.10. Méthodes de conservation des aliments .....	74
2.10.1. La conservation par le froid .....	74
2.10.2. La conservation par la chaleur.....	75
2.10.3. Conservation sous atmosphère contrôlée .....	75

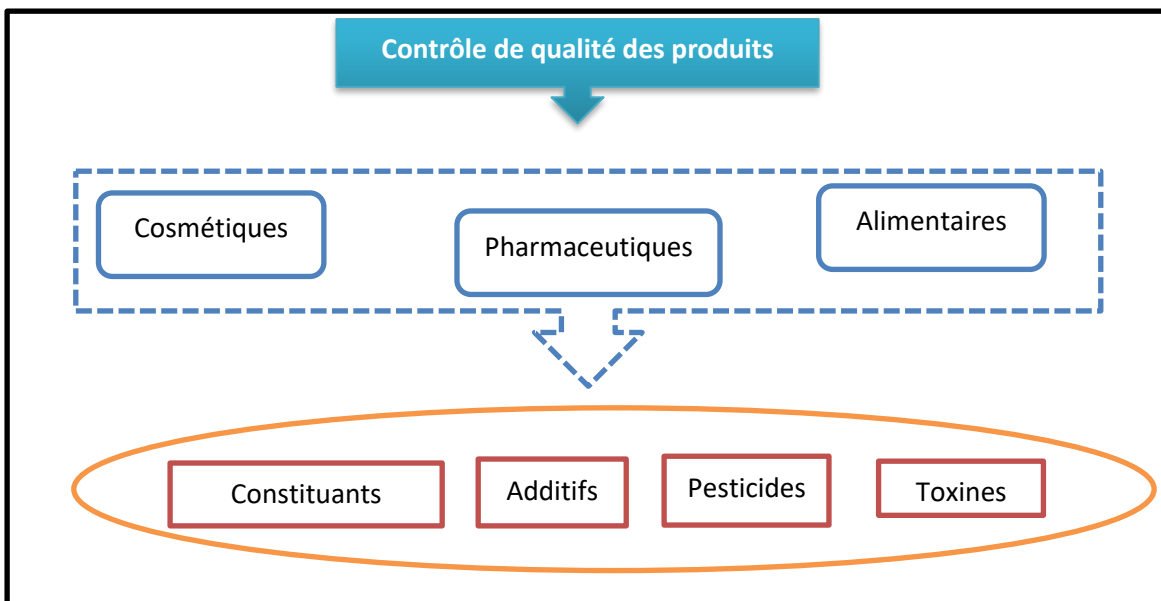
2.10.4. Conservation par élimination de l'eau, déshydratation .....	76
2.10.5. Fumage ou fumaison .....	76
2.10.6. Ajout de sucre, d'alcool ou de vinaigre .....	77
2.10.7. Conservation par additifs alimentaires .....	77
2.10.8. Conservation par fermentation .....	77
2.10.9. Conservation par ionisation.....	77
2.10.10. Conservation par hautes pressions (Pascalisation) .....	77
2.10.11. Conservation par microfiltration (stérilisation à froid) .....	77
2.10.12. Biopréservation .....	77

## **Références bibliographiques**

# **Méthodes d'analyse biochimiques**

## 1. Aperçu global sur les méthodes d'analyses et de contrôle biochimiques et leurs domaines d'applications

L'application des méthodes d'analyses biochimiques recouvre plusieurs domaines dans les laboratoires des unités de contrôle et de recherche scientifique universitaires et industrielles (figure1). Les techniques d'analyse biochimiques, à visée qualitative (structure et fonction) ou quantitative (dosage) d'un échantillon biologique, peuvent être mises en application soit à des fins de contrôle de la qualité de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques ; ou bien dans le cadre d'études dans la recherche de nouvelles biomolécules actives d'intérêt ou de leurs bio-production par biotechnologie. Elles concernent alors les domaines de la biotechnologie pour la santé, l'environnement et le secteur agricole et alimentaire. Les molécules recherchées et/ou ciblées par les méthodes de fractionnements en premier lieu, puis d'analyses biochimiques performantes dans un second temps, peuvent être de structure et de fonctions chimiques ou biologiques différentes d'ordre bénéfiques où toxiques. L'analyse peut être focalisée sur de variables structures moléculaires : protéines, enzymes, flavonoïdes, polyphénols, tannins, anthocyanes, polysaccharides, sucres, acides aminés, acides gras, lipides, vitamines, colorants naturels ou synthétiques et des antibiotiques.



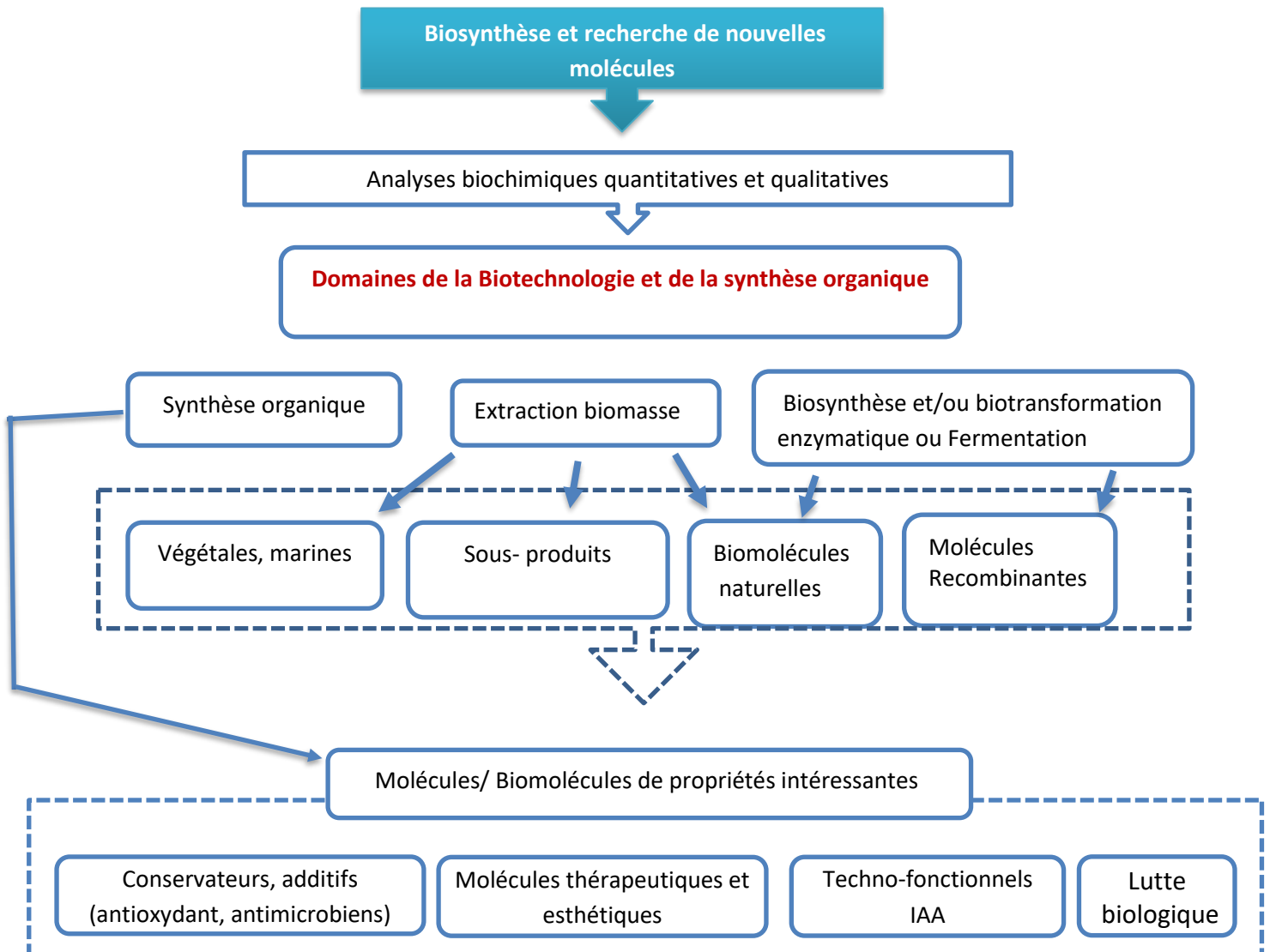
**Figure 1. Molécules et domaines d'application des analyses biochimiques pour le contrôle de qualité.**

### 1.1. Sources et origines des échantillons

L'extraction de biomolécules en vue d'une analyse biochimique peut concerner différents types d'échantillons liquides ou solides dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Parmi ces échantillons on peut citer :

- **Les produits destinés au contrôle de la qualité.**

Les matières première et produits fini : il s'agit d'identifier et de quantifier dans les produits alimentaires (lait, céréales, viandes et produits carnées), cosmétiques, médicamenteux et les eaux utilisées pour la fabrication, les éléments suivants : les constituants des produits (protéines, polysaccharides...), toxines (endotoxines, mycotoxines), pesticides, allergènes, résidus d'antibiotiques, substances étrangères (de nettoyage par exemple).



**Figure 2. Analyse biochimique de biomolécules dans le domaine de biosynthèse industrielle et de la recherche scientifique.**

- **Produits de synthèse organique, biosynthèse (biotechnologie) et de recherche**

Les méthodes biochimiques peuvent être également appliquées à l'analyse des :

- différentes parties de la biomasse végétale en générale et de plantes médicinales en

particuliers (fruits, fleurs, feuilles, tiges et racines), la biomasse marines (faune et flore) et leurs sous-produits industriels ;

- milieux réactionnels en synthèse organique de médicaments ou biologique comme les produits de dégradation enzymatique ;
- milieux de fermentation microbienne dans la filière biotechnologie microbienne destinée à la production d'acides organiques et des alcools (d'acétate, éthanol), de vitamines, biogaz, de protéines en générale et des enzymes en particulier, des antibiotiques et des peptides antimicrobiens.
- bio-médicaments : à l'exemple de l'insuline, des anti-corps thérapeutiques ou à usage analytique pour le diagnostic de pathologies (ELISA), des facteurs de coagulation du sang et hormones, vaccins et protéines recombinantes par culture cellulaire dans des système souvent hétérologues ( micro-organismes, cellules de végétaux ou d'insectes)

## **1.2. Propriétés biologiques et/ ou techno-fonctionnelles des biomolécules recherchées**

Les molécules ciblées par les analyses peuvent être des molécules de structure des édifices cellulaires ou tissulaires biologiques (cellulose, protéines), des hormones (insulines..) des molécules d'apport nutritionnels ou énergétique (protéines, sucres, acides aminés) ou douées d'activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes d'origines végétale ou microbiennes. Certaines peuvent être utiles en médecine et d'autres incorporées comme conservateurs chimiques dans les produits alimentaires ou cosmétiques afin d'éviter l'oxydation, la contamination microbiennes de la matière en question. De surcroit, certaines antibiotiques anti-fongiques et anti-bactériens peuvent également être employées comme agents de lutte biologique contre des phyto-pathogènes ou d'insectes ravageurs.

Des molécules à activité prébiotiques comme les fibres végétales à l'exemple des pectines et de polysaccharides, stimulant la croissance de microorganismes probiotiques bénéfiques pour la santé humaine (*saccharomyces cerevisiae, lactobacillus..*), peuvent trouver des applications en industrie agroalimentaire.

La structure de certains groupes de protéines ou de polysaccharides leur confèrent des propriétés techno-fonctionnelles intéressantes, tels que le pouvoir moussant, épaississant ou de gélification qui régissent la rhéologie des jus, pâtisseries et leurs viscosité..., exploitables en industrie agroalimentaire.

Par ailleurs, certaines protéines dotées d'activité enzymatiques sont employées comme biocatalyseurs :

- Dans la biosynthèse de protéines recombinantes en systèmes hétérologues, certaines enzymes peuvent être utilisés pour l'élimination de résidus de sucres indésirables ou bien pour le transfert de résidus manquants sur la partie glycosylée (suite aux modifications post-traductionnelles) ;
- dans la biodégradation dépolluantes, ou la biotransformation comme les cellulases, peroxydases, laccases, xylanases fongiques pour la dégradation et valorisation de biopolymères ou encore d'autres thérapeutiques ;
- en biologie moléculaire comme les enzymes de restriction ;
- technologie fromagère comme les enzyme coagulantes comme la chymotrypsine.

D'autres molécules ont des propriétés toxiques indésirables, il s'agit de toxines microbiennes, résidus de pesticides ou d'insecticides, notamment dans les fruits, légumes céréales et les conserves, produits métabolites de dégradation et d'altération (aliments, cosmétiques), résidus d'antibiotiques ou d'hormones dans les viandes et le lait.

### **1.3. Orientation du choix de la méthode selon les propriétés de l'échantillons**

Avant de procéder à l'analyse d'un échantillon qu'il soit un produit alimentaire liquide ou solide, produits de fermentation ou thérapeutiques, cosmétique ou biomasse végétale, les modes opératoires font souvent appel à des méthode dites préparatives puis de purification. Le choix du protocole devrait porter sur la méthode convenable, la plus efficace, plus rentable, moins couteuse afin d'en extraire la fraction moléculaire désirée le plus facilement possible, dans de meilleures conditions de pureté tout en conservant son activité biologique. La figure 3 résume les principales techniques de fractionnement incontournables pour les analyses biochimiques. Les Méthodes de fractionnement sont des méthodes basées sur des techniques physiques physicochimiques et biologiques. A cet effet, les méthodes de séparation des biomolécules dépendront de leur structure, propriétés physicochimiques (tableau 1) et biologiques : solubilité, densité, taille, charge, hydrophobicité, adsorption, liaisons spécifiques, conservation de la structure et/ou de l'activité biologique. Les différentes méthodes en question seront développées dans les parties qui suivent.

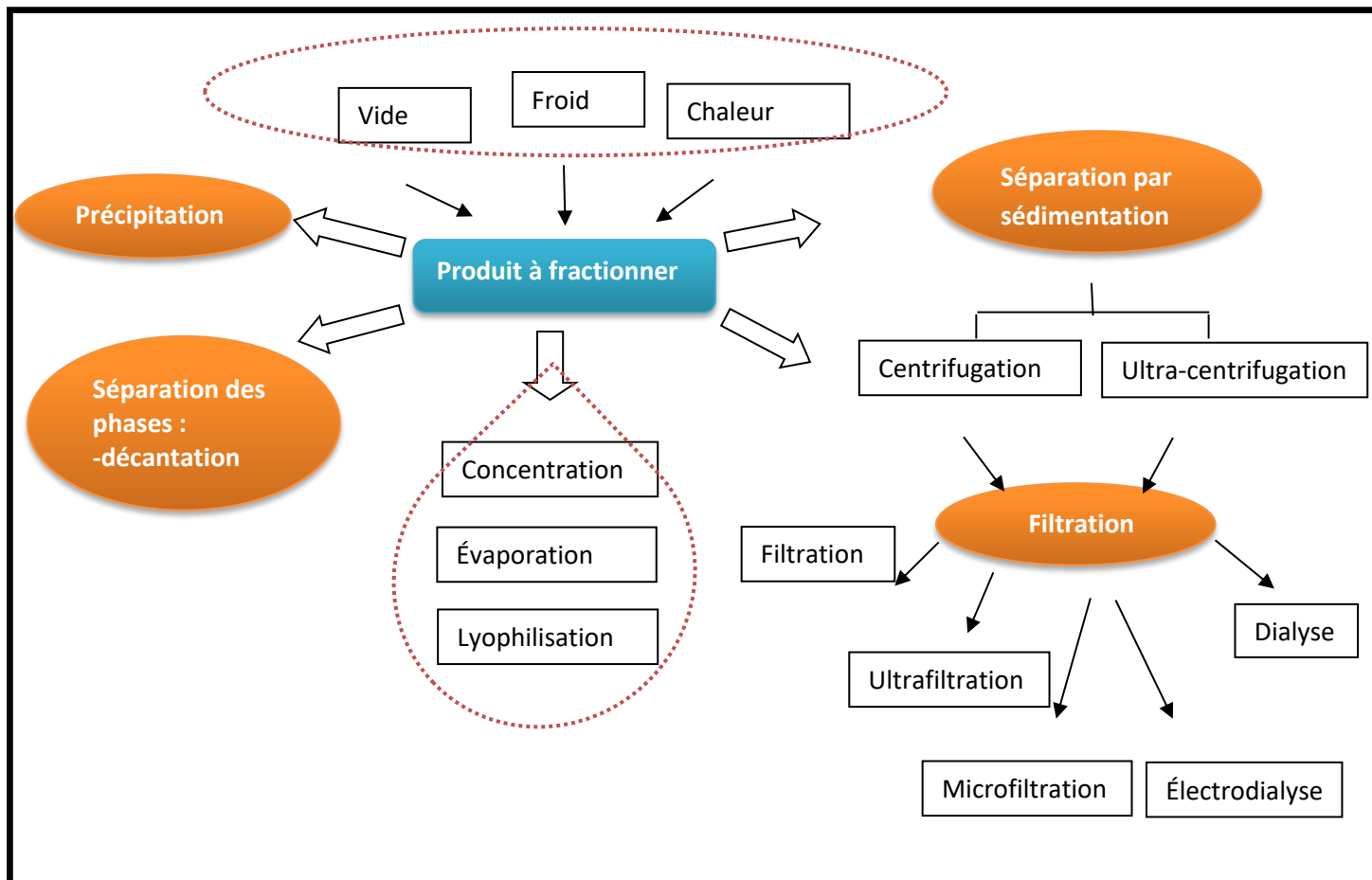


Figure 3. Principales méthodes de fractionnement usuelles

Paramètre	Solubilité	Vitesse de sédimentation, densité	Taille	Charge	Hydrophobicité	Adsorption	Liaison spécifiques
Méthode	Extraction Précipitation fractionnée	Centrifugation ultracentrifugation	Filtration Tamis moléculaire	Electrophorèse CEI EP. CP	CIH HPLC phase inverse	CAD CCM	CAF

CEI : Chromatographie échangeuses d'ions ; CIH : Chromatographie par interactions hydrophobe ; CDA : Chromatographie d'adsorption ; CAF : Chromatographie d'affinité ; CCM : chromatographie

Tableau 1. Méthodes de séparation et de purification selon les propriétés physicochimiques des molécules

## **1.4. Méthodes de fractionnement préparatives et usuelles**

### **1.4.1. Broyage et homogénéisation**

Un échantillon solide devrait être soumis à un broyage (mortiers, broyeurs électrique) suivie d'une homogénéisation afin d'avoir un échantillon représentatif avec un maximum de contacts entre les molécules et le solvant d'extraction et d'en extraire ainsi davantage de molécules. Il peut être soumis à des traitement physico-chimiques de solubilisation par chauffage. Un choc osmotique, hydrolyse acides ou basique, enzymatiques, ultrasons, peut être employé afin d'éclater les membranes et d'en extraire les produits intracellulaires ou de libérer des protéines de leur interaction avec des lipides ou de polysaccharides et vis-vers ça. Cependant, il faut tenir compte de l'effet des paramètres de température, de pH et des espèces chimiques utilisées lors du broyage, de l'extraction afin d'éviter la dénaturation et la perte d'activité des molécules recherchées.

### **1.4.2. Filtration**

La filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide ou de particules en suspension par différence de pression au travers d'un filtre convenable. L'utilisation d'un filtre permet de retenir les particules du mélange hétérogène qui sont plus grosses que les trous du filtre (porosité). Le liquide ayant subi la filtration se nomme filtrat, et ce que le filtre retient se nomme un retentât (concentré). Dans le cas de deux phases non miscibles il convient d'utiliser la décantation (dans une ampoule à décanté)

- **Ultrafiltration**

C'est une méthode de séparation de macromolécules en solution dans une phase dispersante. Procédé de séparation basé sur les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse (0,001 à 0,1  $\mu\text{m}$ ) balayé par le liquide contenant les constituants à séparer. L'ultrafiltration peut servir pour la micro-concentration de biomolécules à l'exemple de protéines. Elle est adaptée à de petits volumes où la centrifugation apporte la force centrifuge indispensable pour faire passer le liquide à travers la membrane. Durant la centrifugation, l'échantillon liquide déposé dans le réservoir supérieur, est forcé pour franchir le filtre sous l'effet du champ gravitationnel, pour se retrouver dans le microtube. Les macromolécules sont recueillies dans le retentât se retrouvant dans le contenu du réservoir supérieur, quand au filtrat celui-ci est récupéré dans le microtube. La micro-concentration a pour but soit de concentrer

des macromolécules ayant déjà subi une purification ou à éliminer de petites molécules contaminants les macromolécules (sels, détergents, tampons, ligands non liés .....etc.)..

- **Microfiltration**

Elle permet la séparation de particules de l'ordre de micromètre (cas de la filtration stérilisante). On peut affirmer qu'un procédé de filtration donne une solution exempte de micro-organismes lorsque le diamètre des pores du filtre (seuil de coupure) est de 0,22 micromètres ou moins. Les filtres seringues sont couramment utilisés par les laboratoires de recherches et d'analyse pour éliminer les microorganismes contaminants les échantillons destinés pour des analyses des échantillons par HPLC et ce, afin d'éviter l'obstruction des colonnes de séparation). La technique consiste à utiliser des filtres de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  ou de 0,22  $\mu\text{m}$  qui retiennent les bactéries, les levures et les spores. Ces filtres peuvent être colmatés facilement. Pour prévenir cette obstruction, on dépose sur le filtre à stériliser un préfiltre épais ("depth filter") généralement en fibre de verre.

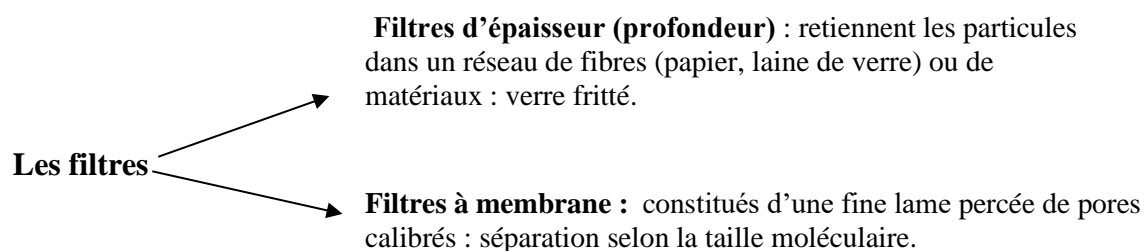
Par ailleurs, certaines biomolécules, additifs de milieux de cultures (vitamines) indicateurs colorés...), extraits de plantes médicinales ou bien des produits de synthèse organique sont souvent sensibles à la chaleur et ne peuvent être stérilisés à l'autoclave. A cet effet, la stérilisation à froid est indiquée dans ce cas de figure.

- **Autres types de filtration**

**Nanofiltration** : la taille de pores est inférieure à 1 nm ( $<0,001 \mu\text{m}$ ).

**Dia-filtration** : c'est une ultrafiltration avec des lavages répétés

**-Les différents filtres et dispositifs de filtration**



- **Les filtres d'épaisseur**

Les filtres doivent être insolubles et inertes physiquement et chimiquement

**-Filtres en papier** : ils sont différents dans leur forme, texture, porosité et pureté. Ils sont numérotés selon leur porosité.

**-Textiles** : gaze, laine, coton.

**-Fibres** : laine de verre.

-**Matériaux frittés** : ils sont composés de verre fritté (microbilles de verre compressées à température contrôlée) de porosité codifiées avec des numéros de 0 (larges pores) à 4 (pores étroits),

**Inconvénients** : Colmatage et adsorption ou rétention de produits (perte de matière).

-**Les filtres à membrane** : ils sont composés de cellulose, nitrate de cellulose, acétate de cellulose ou de téflon. Les filtres sont caractérisés par une faible porosité, une faible épaisseur et une forte densité de pores dans leur surface. Ils sont chimiquement inertes et possède un caractère hydrophile ou hydrophobe. Ce type de filtration s'effectue sous pression et est plus rapide vue leur faible épaisseur et leur forte densité des pores ( $10^{10}$  pores /cm<sup>2</sup>). Leur porosité varie de 5 à 35 nm pour l'ultrafiltration et de 0,1 à 8 µm pour la microfiltration.

- **Types de filtration**

-**Filtration gravimétrique** : la pression créée par la hauteur du liquide sur le filtre

-**Filtration sous vide** : une dépression est créée en aval du matériau filtrant. C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes.

-**Filtration sous pression** : elle évite le moussage et l'évaporation du solvant (emploi fréquent en industrie). Au laboratoire, la microfiltration stérilisante est très utilisée (filtre-seringue, figure 5).

La filtration trouve diverses applications dans différents domaines,

-Les industries pharmaceutiques comme la préparation des vaccins et des enzymes,

-Les industries alimentaires (clarification des jus de fruit et autres produits alimentaires)

-Filière de traitement des eaux.

-Recherche et laboratoire d'analyse (ultrafiltration et microfiltration sont plus analytiques).

-**Micro-séparation par ultrafiltration** : elle a été développée pour la concentration de petits volumes d'échantillon. Ce système requiert le champ de gravité d'une centrifugeuse (Figure 4)

- **Dispositifs de filtration**

- Le dispositif de base pour filtration sur papier
- Le dispositif avec un système sous vide
- Le dispositif constitué d'un Erlenmeyer avec un entonnoir à base plate perforée
- Filtres seringue pour microfiltration
- Les tubes d'ultrafiltration

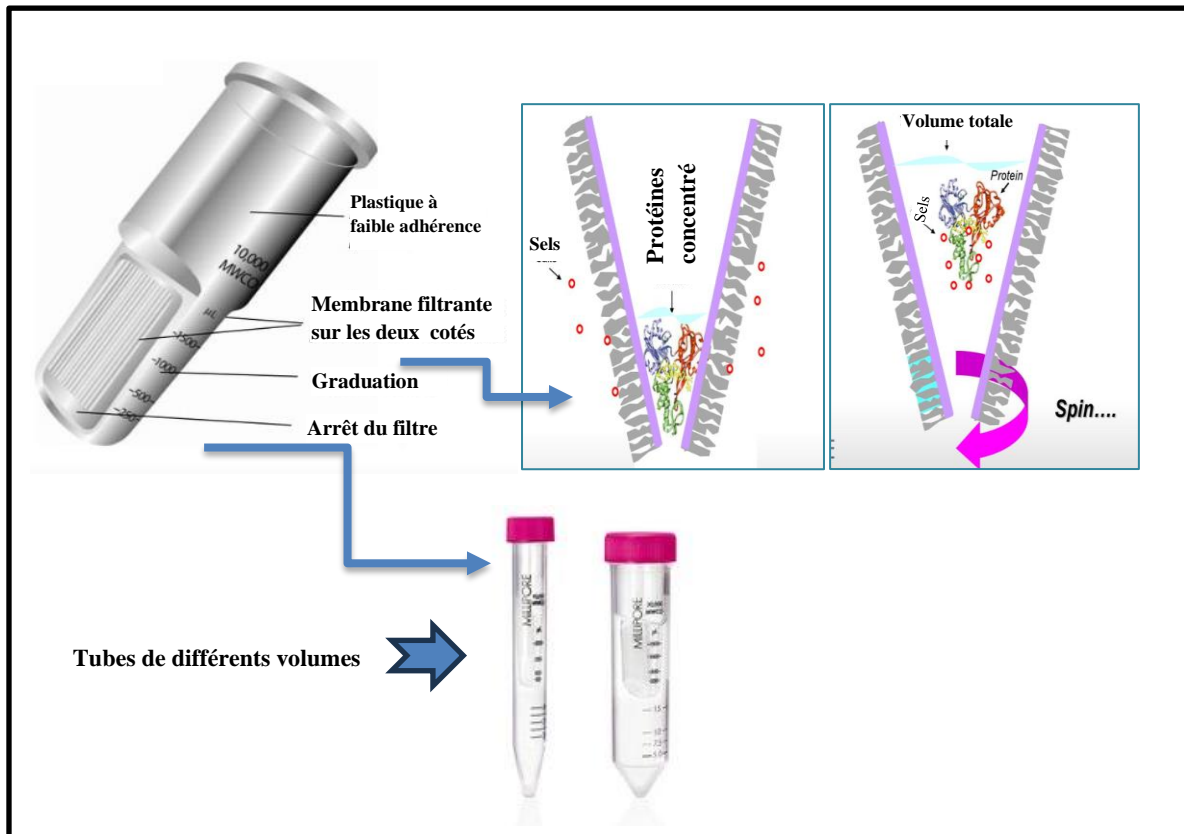


Figure 4. Tubes d'ultrafiltration pour les macromolécules



Figure 5. Filtres seringue pour microfiltration

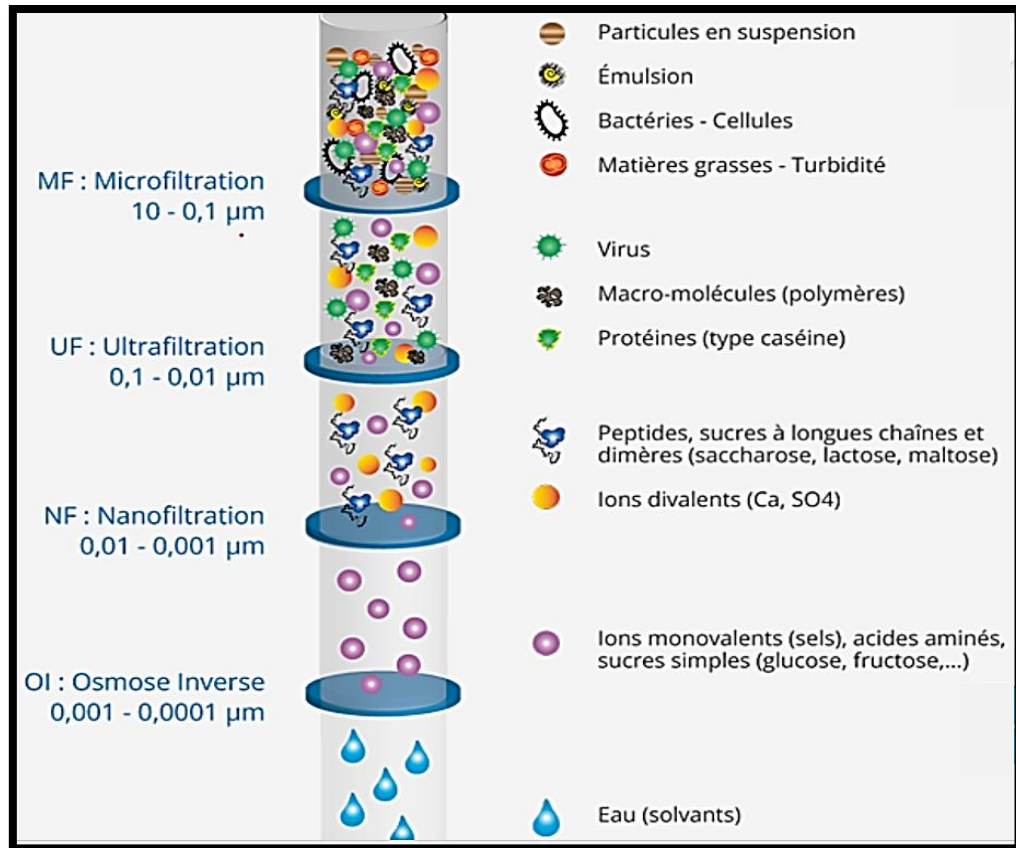


Figure 6. Seuil de coupure des différents types de filtration

- **Le système "Millipore"**

Il est constitué d'une base dont la surface en verre fritté est destinée à supporter le filtre (figure 7). Le réservoir supérieur est destiné à contenir la solution à filtrer, il se fixe sur le support. Une pince permet d'assujettir ces deux pièces ensemble de façon hermétique. Ce montage peut alors être installé sur une fiole à succion. La solution ou suspension à filtrer est alors déposée dans le réservoir, ensuite un vide doit être appliqué pour recueillir soit le filtrat, soit le retentât sur le filtre.

- **Rampes de filtration en biochimie et microbiologie**

Il existe plusieurs dispositifs (figure 7,8 et 9) :

- fabriqués soit en inox ou en verre ;
- multi-postes à usage de routine au laboratoire de contrôle microbiologique des eaux
- un poste pratique pour l'usage de laboratoire.

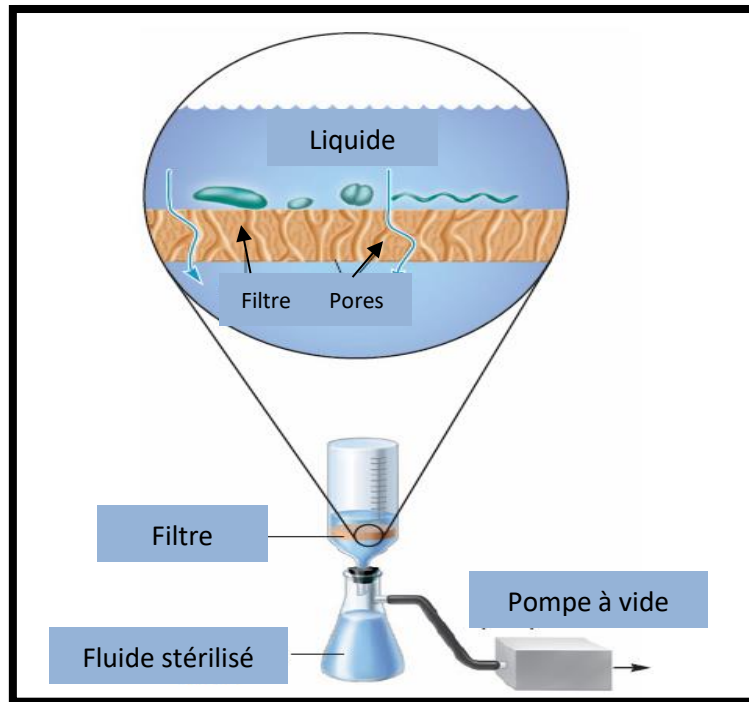


Figure 7. Dispositif de filtration sous-vide

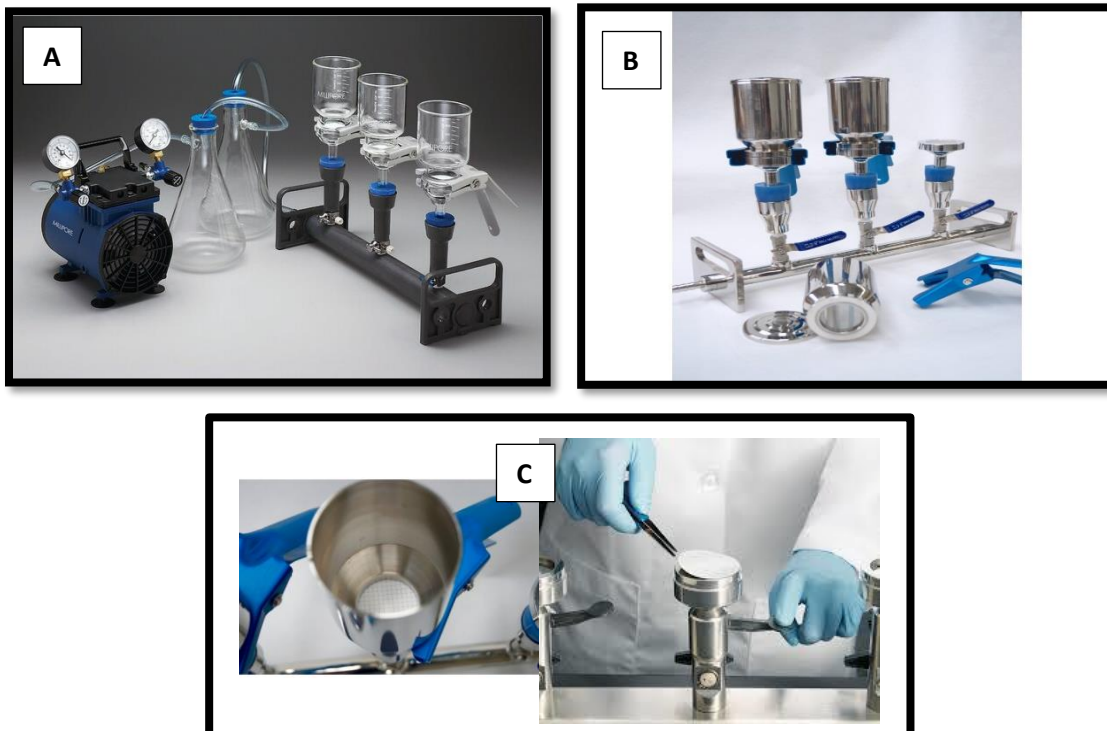
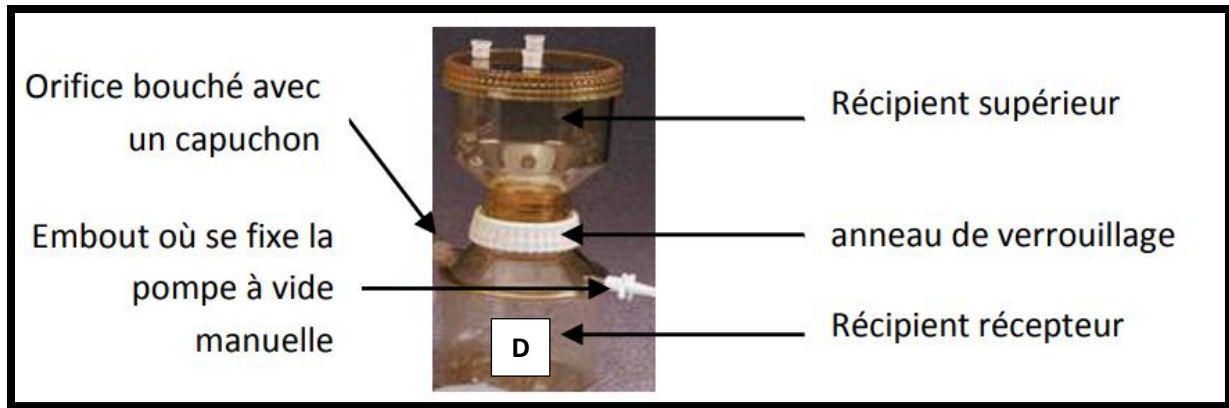


Figure 8. Dispositifs de filtration a) en verre ; b) en inox ; c) dépôt de la membrane filtrante à l'aide d'une pince.



**Figure 9. Dispositif de filtration en plastique autoclavable pour laboratoire.**

### 1.4.3. Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leurs capacités respectives à franchir les pores d'une membrane appelée : membrane de dialyse (passage par diffusion libre). Elle permet d'éliminer d'une solution macromoléculaire des ions ou de petites molécules par leur passage à travers la membrane (tamis). Lorsqu'un champ électrique est appliqué le transfert des ions est nettement amélioré : c'est l'électrodialyse.

Il est important de souligner que l'ultrafiltration peut substituer la dialyse. En effet, l'ultrafiltration, comparativement à la dialyse, permet d'éliminer une plus grande proportion des petites molécules contaminants dont la concentration finale est très faible et indépendante de leur concentration initiale. Dans la dialyse un équilibre moléculaire s'installe de part et d'autre de la membrane via le phénomène de diffusion, ainsi la concentration finale des molécules de l'échantillon dépend de leur concentration initiale.

#### 1.4.3.1. Membrane de dialyse

Exemple : membrane en cellophane sous forme d'un cylindre (boudins de dialyse)

- **Liquide contre dialyse**

En générale il peut s'agir d'eau distillée ; tampon de chromatographie ; tampon d'électrophorèse. L'échantillon à analyser devrait être dans une solution avec les mêmes conditions (pH, force ionique) que la technique de séparation et purification à utiliser.

- **Facteurs influençant la dialyse**

- **Température** : l'élévation de la température augmente la vitesse de diffusion (agitation moléculaires). De surcroit, il faudrait tenir compte des températures favorables au développement des microorganismes. Au laboratoire, il est indispensable de travailler à basse température ainsi pour une dialyse de plusieurs heures, il sera nécessaire d'ajouter un antimicrobien.

- **pH** : l'effet dépend des molécules à dialyser, l'apparition de charges peut ou non ralentir la vitesse de dialyse
- **Surface membrane/volume de la solution** : la vitesse va augmenter avec une grande surface.
- **Agitation** : en générale on peut appliquer une agitation douce afin d'améliorer la vitesse d'échange des molécules.
- **La nature des molécules présentes**
- **Seuil de coupure des membranes de dialyse**

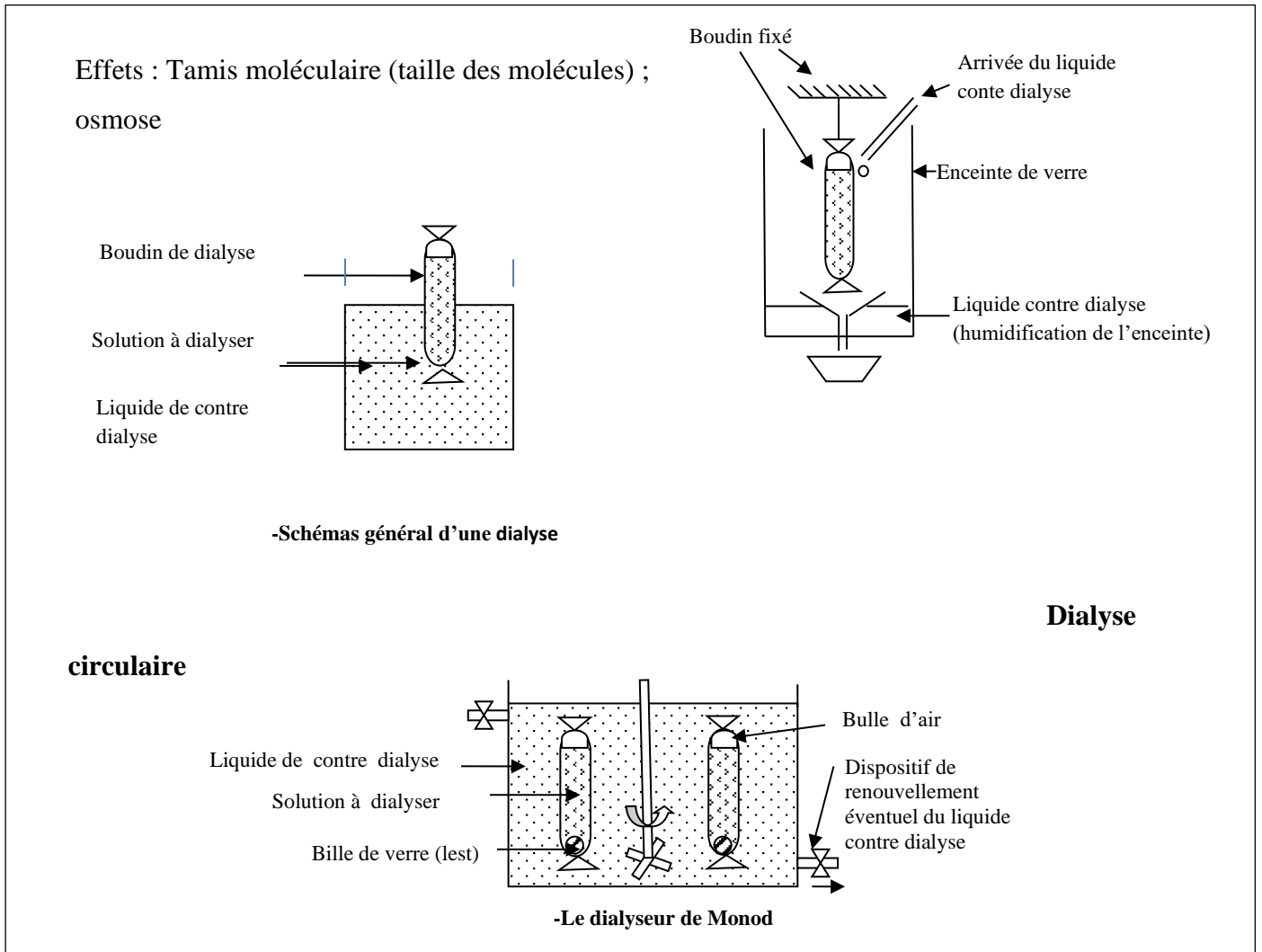
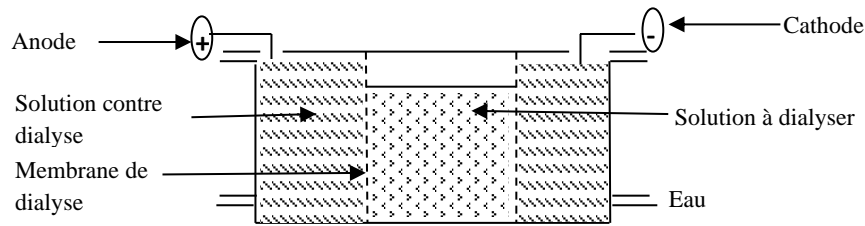


Figure 10. Différents dispositifs de dialyse

1.4.3.2. Electrodialyse

Elle permet une élimination complète et plus rapide des ions grâce à l'accélération des mouvements ioniques par un champ électrique. Elle utilise des membranes anioniques (perméables aux anions) et cationiques perméables aux cations.

Il faut tenir compte de la variation du pH et de l'élévation de la température (dénaturation des protéines) qui peuvent se produire au cours de l'électrodialyse (figure 11).



**Figure 11. Schéma d'une électrodialyse**

### 1.4.3.3. Osmose inverse

L'osmose inverse (OI) est un procédé qui met en œuvre des membranes denses qui ne laissent passer que le solvant et qui arrêtent tous les sels. La séparation solvant soluté se fait par un mécanisme de solubilisation-diffusion : le solvant s'adsorbe dans la phase membranaire puis diffuse à travers le matériau. La pression appliquée doit être supérieure à la pression osmotique exercée en amont de la membrane par la solution filtrée pour observer un flux de perméat à travers la membrane. Les pressions appliquées varient de 20 à 80 bar. Les membranes d'osmose inverse (membranes denses) peuvent retenir les ions monovalents par un mécanisme différent qui fait appel à la solubilisation et la diffusion. Celui-ci considère que le taux de transmission d'un soluté à travers une membrane d'osmose inverse résulte d'un processus dans lequel le soluté se solubilise dans la phase membranaire puis diffuse à travers celle-ci pour rejoindre le compartiment perméat. Les principales applications industrielles de l'osmose inverse sont les suivantes: - Dessalement d'eau de mer et d'eaux saumâtres - Elimination de pesticides et d'herbicides - Production d'eau ultra pure (industrie électronique, pharmaceutique...) - Concentration d'antibiotiques.

### 1.4.4. Méthodes d'extraction par solvant à l'ampoule à décanter

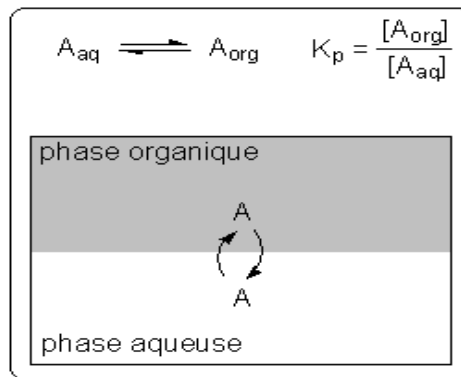
L'extraction est un procédé qui permet de séparer un composé d'un mélange (liquide ou solide broyé) ou d'une solution. On utilise en général un solvant dans lequel le composé à extraire est très soluble contrairement aux autres composés non désirés contenues dans le mélange. Une succession d'opérations peut être nécessaire avant que le composé ne puisse être isolé par distillation, hydrodistillation ou par évaporation du solvant d'extraction.

#### 1.4.4.1. Extraction liquide-liquide

Les extractions sont parmi les méthodes les plus utilisées en analyse pour séparer les mélanges. Elles reposent sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases non-miscibles entre elles. Le schéma illustre le principe de l'extraction liquide-liquide qui permet de transférer un soluté d'une phase liquide à une autre phase liquide non-miscible à la première.

- **Principe physico-chimique**

L'extraction liquide-liquide repose sur la différence d'affinité d'un soluté entre deux phases liquides non-miscibles. Considérons un soluté A en solution dans l'eau à extraire par une phase organique non-miscible à l'eau. Lorsque les deux phases liquides sont en contact, il s'établit un équilibre de partage suivant pour le soluté A (figure 12). Cet équilibre est caractérisé par une constante thermodynamique **K<sub>p</sub>** appelée le coefficient de partage : **K<sub>p</sub> = [A<sub>org</sub>]/[A<sub>aq</sub>]**



**Figure 12. Équilibre de partage d'un soluté A entre deux phases liquides non-miscibles (Aqueuse et organique)**

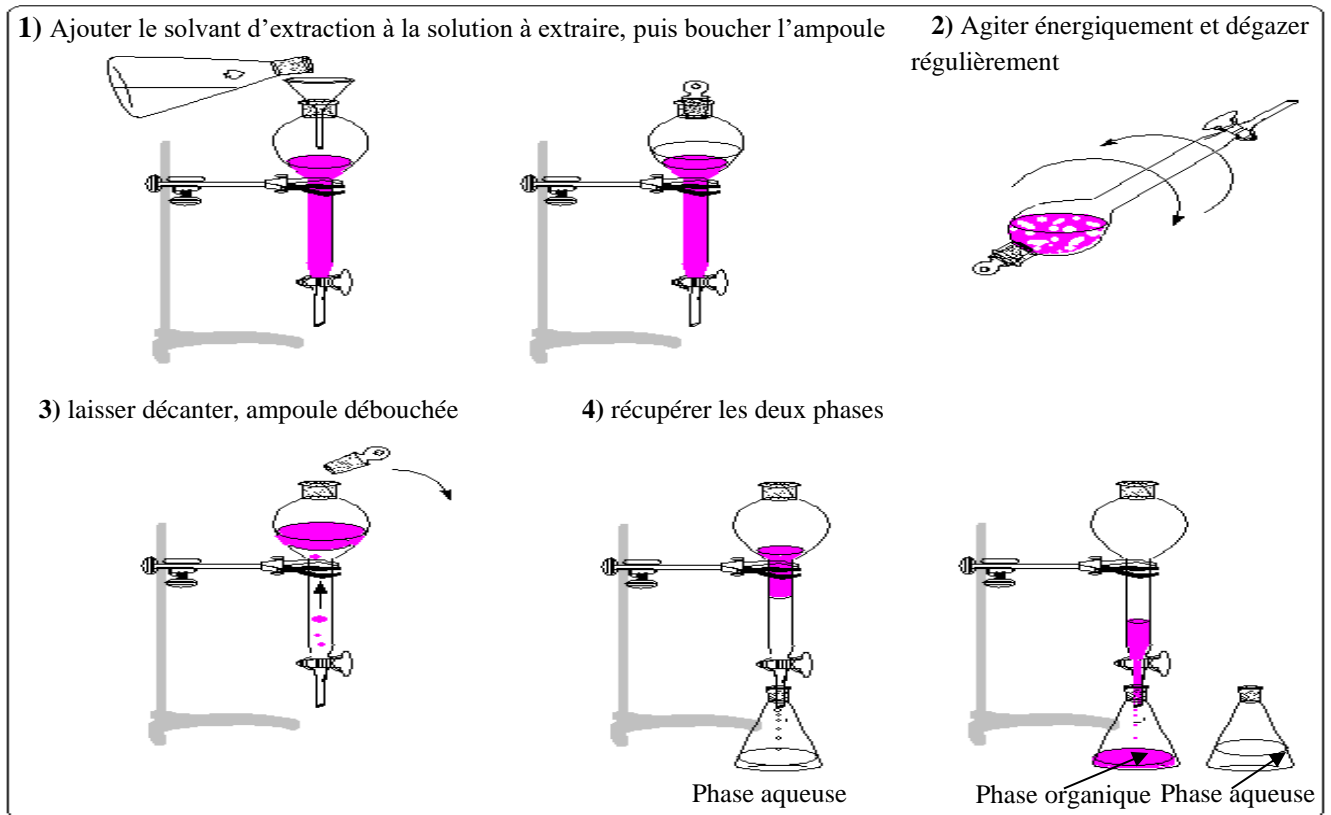
L'extraction sera d'autant plus efficace que le coefficient de partage est grand ; il faut choisir un solvant d'extraction dans lequel le soluté est très soluble. Des extractions multiples, répétées, sont plus efficaces que l'extraction simple pour un même volume de solvant. En effet, un premier volume de solvant va avoir une saturation avec la concentration des molécules extraites. A cet effet, il faudra récupérer le premier volume et le renouveler plusieurs fois pour extraire davantage de molécules cibles et ce, jusqu'à l'épuisement de toute la fraction ciblée de l'échantillon. Ce qui va permettre d'exprimer un rendement d'extraction par unité de volume d'échantillon (pour les liquides) ou unité de poids (matière sèche solide)

Au laboratoire de travaux pratiques on travaille sur des volumes de solution à extraire de l'ordre de la centaine de 1 mL au plus. On utilise pour cela des ampoules à décanter (figure 13).

L'ampoule est choisie de telle façon à ce que les phases liquides occupent au maximum la moitié de l'ampoule. Par exemple, pour extraire 30 mL de solution par 10 mL de solvant organique, plutôt que d'utiliser une ampoule de 50 mL, une ampoule de 100 mL est plus convenable.

La figure 13 montre les étapes d'extraction liquide-liquide, la première étape consiste à introduire la solution à extraire et le solvant d'extraction dans l'ampoule à l'aide d'un entonnoir à liquide.

Après avoir bouché l'ampoule (1), la tenir retournée, à deux mains, et agiter énergiquement (2). Pour extraire le soluté de façon optimale il faut atteindre l'équilibre de partage précédent. Si on laisse le contenu de l'ampoule sans agitation, l'interface entre les deux phases est très faible et la diffusion du soluté d'une phase vers l'autre est lente. L'agitation énergique de l'ampoule permet d'augmenter cette interface et d'atteindre l'équilibre plus rapidement. Il est important de dégazer le contenu entre chaque agitation pour éviter une surpression dans l'ampoule. En effet, l'équilibre de mélange peut être exothermique et entraîner une légère augmentation de température dans l'ampoule. Cela provoque une vaporisation du solvant le plus volatil qui met l'ampoule sous pression. Dans le cas de l'éther, très volatil, il peut être prudent de dégazer avant même la première agitation.



**Figure 13. Protocole d'extraction liquide-liquide à l'ampoule à décanter**

Remarque : le mélange et l'agitation peuvent être effectués, à l'aide d'un agitateur magnétique, dans un flacon en verre puis verser le contenu dans l'ampoule à décanter.

Il faut déboucher l'ampoule lorsqu'on la repose sur son support, toujours pour éviter une surpression. Ensuite, il faudra laisser décanter les phases (3) puis récupérer les deux phases séparément : la phase aqueuse est en générale plus dense que les phases organiques, à l'exception des solvants chlorés (4).

L'extraction est répétée avec une nouvelle fraction de phase organique. Une fois l'extraction terminée, toutes les phases organiques seront réunies pour le séchage.

#### **1.4.4.2. Extraction solide-liquide**

L'extraction de biomolécules à partir de la biomasse végétale (plantes médicinales, écorces d'agrumes) fait souvent appel à des étapes de séchage à température ambiante ou par lyophilisation. La matière solide est ensuite soumise au broyage afin d'optimiser les surfaces de contact avec le solvant. Il faut tenir compte de la température s'il en utilise un broyeur électrique, car certaines molécules lui sont sensibles. On procède donc à une macération dans un solvant froid ou chaud approprié ensuite à une filtration sur papier filtre ou sous-vide.

#### **1.4.4.3. Evaporation des solvants d'extraction et concentration des extraits**

- **Système de l'évaporateur rotatif**

L'extrait qui se retrouve dans le solvant d'extraction (solvant organique) peut être concentré ou récupéré comme résidu sec après évaporation sous vide (au rotavapor) de ce solvant d'extraction souvent toxique ou non désiré.

- **Système de lyophilisation**

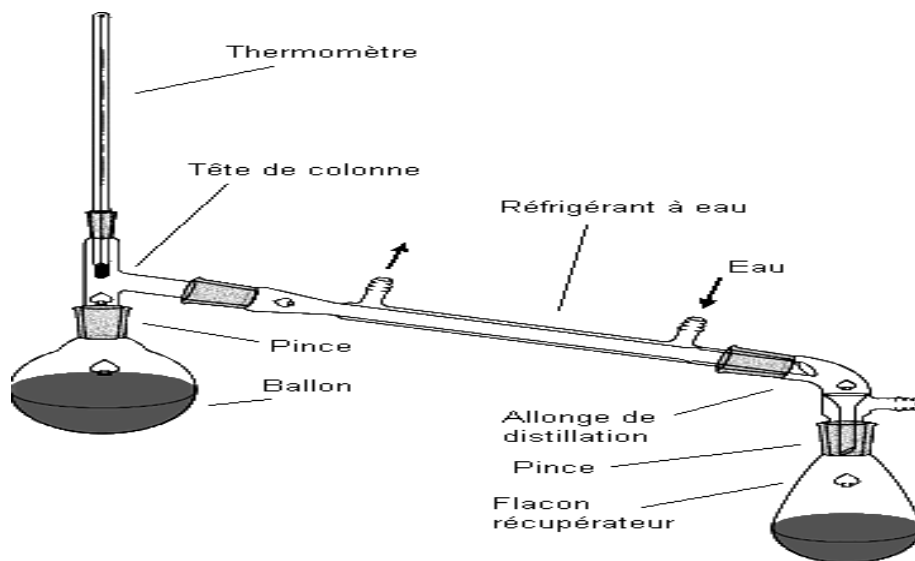
La lyophilisation est une méthode de déshydratation par sublimation d'un échantillon aqueux préalablement congelé. Grâce au sous-vide créé par la pompe à vide de l'appareil, l'échantillon va passer d'un état solide congelé vers un état sec (poudre) sans avoir passer par l'état liquide. Un extrait à l'eau (infusion ou décoction) peut être ainsi concentré ou récupéré sous forme d'un résidu sec qui doit être conservé à l'abri de l'humidité dans un dessiccateur par exemple. Ce dernier contient des billes borosilicatées qui adsorbent l'humidité, ce qui maintiendra les molécules bioactives intactes sans oxydation ou réhydratation de l'échantillon évitant par conséquent sa biodégradation par les microorganismes.

#### **1.4.4.4. Extraction par distillation et hydrodistillation**

Les changements d'état sont largement utilisés dans toutes les étapes de séparation et de purification. La distillation, et plus particulièrement l'hydrodistillation, est une technique basée

sur le changement d'état liquide - vapeur des espèces chimiques. La séparation de deux phases liquides non miscibles est relativement aisée par simple décantation. Il est cependant plus compliqué de séparer un composé d'un mélange complexe. Cette séquence présente l'hydrodistillation, technique se basant sur la distillation d'une solution aqueuse contenant un composé organique non miscible à l'eau.

Voici le montage de distillation le plus simple. Il est utilisé pour distiller un produit de faible température d'ébullition (inférieure à 120°C).



**Figure 14 : Montage de base de distillation**

- **Distillation**

La technique de distillation basée sur le principe élémentaire comme quoi dans un mélange, c'est le composé le plus volatil qui s'évapore en premier, peut-être réalisée de plusieurs façons selon plusieurs critères. La distillation est une méthode de séparation basée sur la différence de température d'ébullition des différents liquides qui composent un mélange (distillation fractionnée). Dans certains cas, mieux qu'une séparation, il s'agit d'une méthode de purification.

Si on chauffe un mélange de liquides, c'est le liquide le plus volatil, celui qui a la température d'ébullition ( $T_{éb}$ ) la plus basse qui s'échappera le premier. Pour recueillir les vapeurs de ce produit, il faut les condenser. Ceci est fait par un réfrigérant à eau.

- ✓ Pour purifier un composé qui a un point d'ébullition normal trop élevé, on effectue une distillation sous pression réduite en créant un vide partiel dans l'alambic. Plus le vide est important, plus la température de distillation est basse.

- ✓ Lorsque la distillation est effectuée sous un vide presque total, le procédé est appelé distillation moléculaire. Ce procédé est régulièrement utilisé dans l'industrie pour la purification des vitamines et de certains autres produits instables

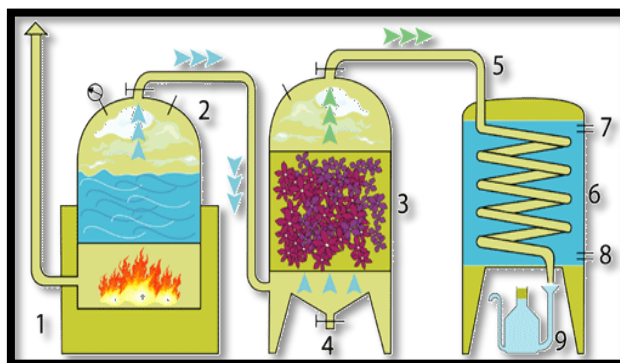
Il existe différentes techniques pour extraire l'huile essentielle :

- **Hydrodistillation**

La technique d'hydrodistillation permet d'obtenir, à partir d'un mélange complexe, le composé organique souhaité par simple séparation de phases dès lors que ce dernier est non miscible à l'eau. L'avantage principal de cette méthode par rapport à une distillation fractionnée tient aux températures utilisées : les températures sont toujours inférieures à 100 °C, alors que les températures d'ébullition de nombreux composés organiques sont nettement supérieures à cette valeur. Ceci explique que cette technique est très largement utilisée en parfumerie, où les molécules odorantes sont souvent fragiles et ne peuvent supporter des températures importantes.

- **Distillation à la vapeur d'eau (entraînement à la vapeur d'eau)**

C'est le procédé le plus courant (figure 15). Trois cuves sont reliées entre elles par de minces tubes, la première cuve, contenant de l'eau, est chauffée et la vapeur passe dans la cuve contenant les plantes. La vapeur circule à travers les plantes et se charge des principes actifs. Elle s'échappe ensuite par un long tuyau fin en forme de serpentin qui baigne dans un récipient d'eau froide. La vapeur se condense alors en gouttelettes et arrive dans la troisième cuve : l'essencier. Dans ce récipient, les huiles essentielles, plus légères que l'eau, peuvent être récupérées en surface.



**Figure 15. Distillation à la vapeur d'eau**

- 1) foyer, 2) chaudière, 3) plantes aromatiques, 4) purge, 5) vapeur chargée d'huile essentielle, 6)serpentin, 7-8) cuve d'eau froide, 9) essencier

### **1.4.6. Méthodes d'extraction par précipitation**

D'autres méthodes consistent à effectuer une précipitation saline, par solvant ou une réaction chimique (complexation, réactions d'oxydoréduction ou des réactions acido-basiques) entre le composé à extraire et un réactif hautement sélectif dont le produit est facilement séparable du reste de la solution. Il se forme alors un précipité que l'on récupère par filtration ; le composé recherché est restitué par la réaction inverse de la réaction qui a servi à former le précipité.

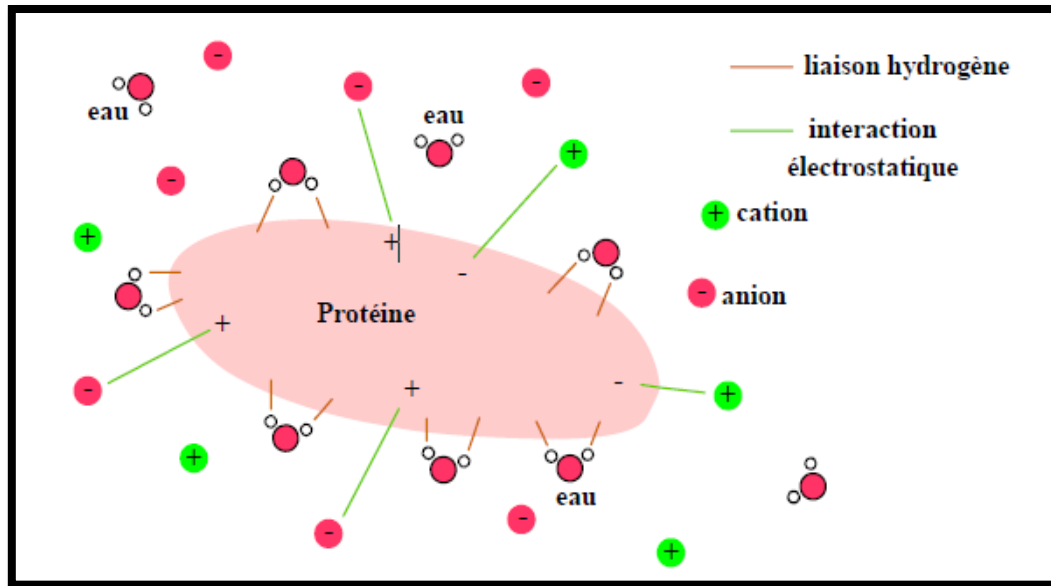
D'une manière générale, la précipitation a pour but de concentrer les molécules biologiques en solution mais aussi d'opérer un fractionnement selon leurs propriétés hydrosolubles. La précipitation doit rester un processus réversible, c'est-à-dire que les molécules, rendues insolubles, ont leurs propriétés biologiques restaurées dès qu'elles sont diluées ou dialysées.

Les protéines peuvent être précipitées en occasionnant des perturbations du solvant amenées, par exemple, grâce à une modification :

- de la force ionique
- du pH
- de la température

Dans de nombreuses protéines (globulaires ou fibreuses), l'intérieur de la structure est isolé du milieu aqueux par le regroupement de résidus d'acides aminés hydrophobes. L'extérieur - ou la surface - de la protéine interagit avec le milieu par le biais de chaînes polaires et de résidus d'acides aminés chargés.

La solubilité d'une molécule repose essentiellement sur les interactions qu'elle a avec le milieu extérieur (solvant, ions, constituants divers). Parmi ces interactions, les liaisons hydrogène et électrostatiques prédominent. Plus la molécule possède d'interaction avec le solvant (eau) et plus elle est soluble. Dans ce cas, un ensemble de molécules d'eau s'associe à la macromolécule, on parle alors d'une couche d'hydratation (figure 16). La précipitation s'obtient en détournant ou en détruisant les interactions établies entre la macromolécule et le milieu extérieur.



**Figure 16. Interaction des protéines et des molécules d'eau**

#### 1.4.6.1 Précipitation par les sels (salting out ou relargages)

Des sels neutres ou légèrement acides peuvent être utilisés pour solubiliser, précipiter ou fractionner les protéines. Le NaCl a été très utilisé à la fois comme agent précipitant mais aussi comme solubilisant : la propriété de solubilisation (salting in) est reliée à de faibles concentrations de sel (0,1 à 0,3 M) par contre, la précipitation (salting out) résulte à des concentrations supérieures à 1 M (figure 17).

La précipitation des protéines par l'utilisation des sels ou « relargage » est l'une des méthodes les plus utilisées pour le fractionnement des protéines contenues dans un mélange basée sur la différence dans leurs degrés de solubilité. Ce dernier tient compte de plusieurs paramètres : la charge nette de la protéine et son caractère hydrophobe, la nature du sel employé, le pH et la température. Afin d'assurer un effet précipitant pour fractionner des protéines, le sel est choisi parmi ceux ayant un effet « salting out » important, correspondant à des forces ioniques ( $\mu = \frac{1}{2} C.V^2$ ) élevées comme le sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_4$ . Le sel à un certain degré de saturation, entre en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau, privant ainsi ces dernières des molécules d'eau et réduisant ainsi leur couche d'hydratation, ce qui provoque leur relargage.

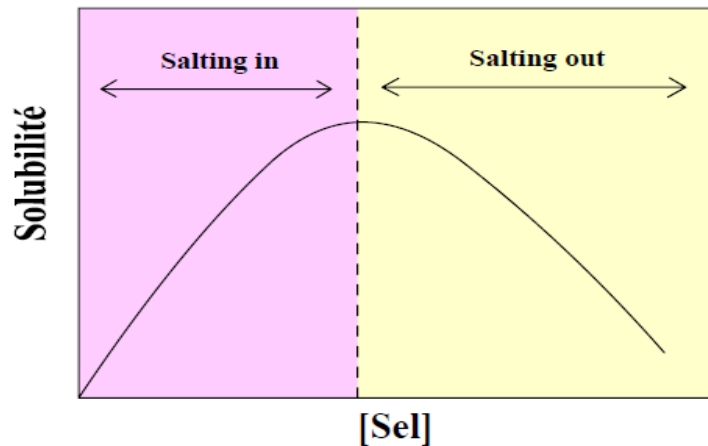


Figure 17. Le salting out et salting in

#### 1.4.6.2. Précipitation par les solvants organiques

Toutes les modifications touchant la solvation et les interactions hydrophobes provoquent une diminution importante de la stabilité de la protéine et par conséquent, sa précipitation (figure 18). Les solvants organiques les plus utilisés sont le méthanol, l'éthanol, le butanol et l'acétone. Ceux-ci possèdent à la fois des régions hydrophobe et polaire. Pour éviter la dénaturation des protéines, les solvants organiques sont utilisés à des températures inférieures à 0°C. Ces solvants entrent en compétition avec l'eau en interagissant avec les groupements polaires de la protéine. Les solvants, en réduisant la concentration de l'eau, diminuent la couche d'hydratation de la protéine et ainsi résulte leur précipitation.

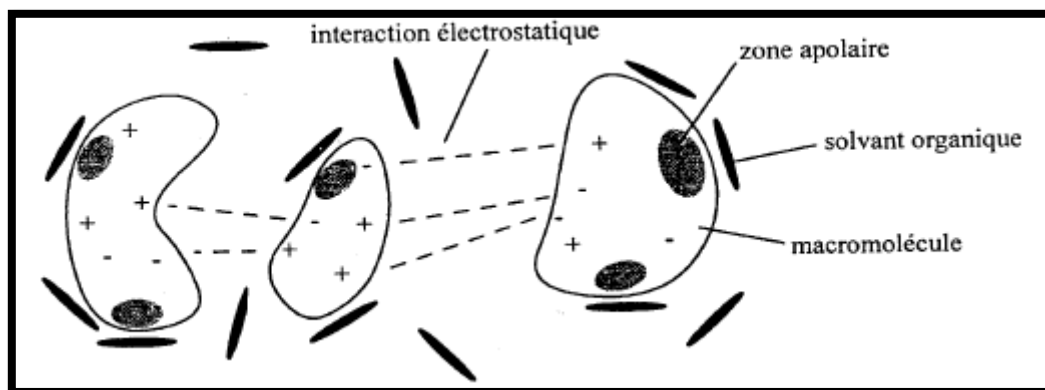


Figure 18. Précipitation par solvant

#### 1.4.6.3. Précipitation isoélectrique

Les protéines sont constituées de nombreux groupes ionisables et possèdent ainsi un point ou pH isoélectrique. Lorsqu'une protéine se retrouve avec une charge globale nette près de zéro, les répulsions électrostatiques se trouvent réduites, ce qui renforce les forces électrostatiques

locales leur permettant ainsi de prédominer et menant par conséquent, à des attractions entre les molécules, agrégation et enfin leur précipitation. C'est ce que l'on appelle une précipitation isoélectrique. Cette dernière permet alors de purifier une protéine sélectivement en amenant le pH à son point isoélectrique

La spécificité de la précipitation isoélectrique peut être améliorée par l'inclusion d'un sel qui décroît d'avantage la solubilité de la protéine d'intérêt (Figure 19 )

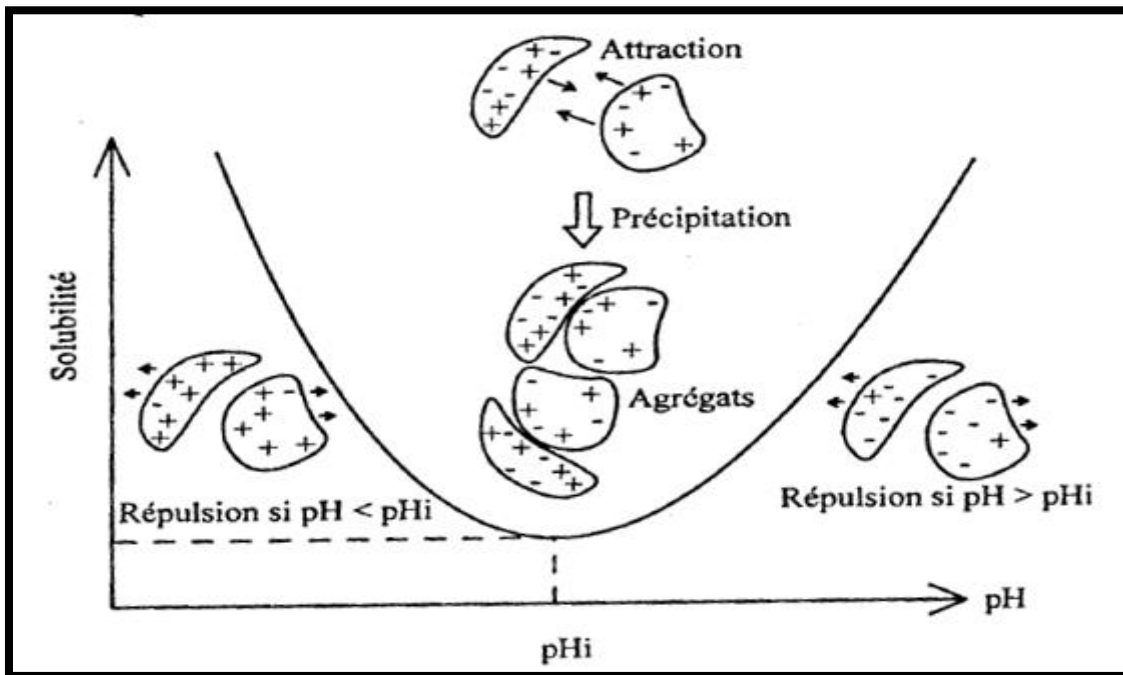


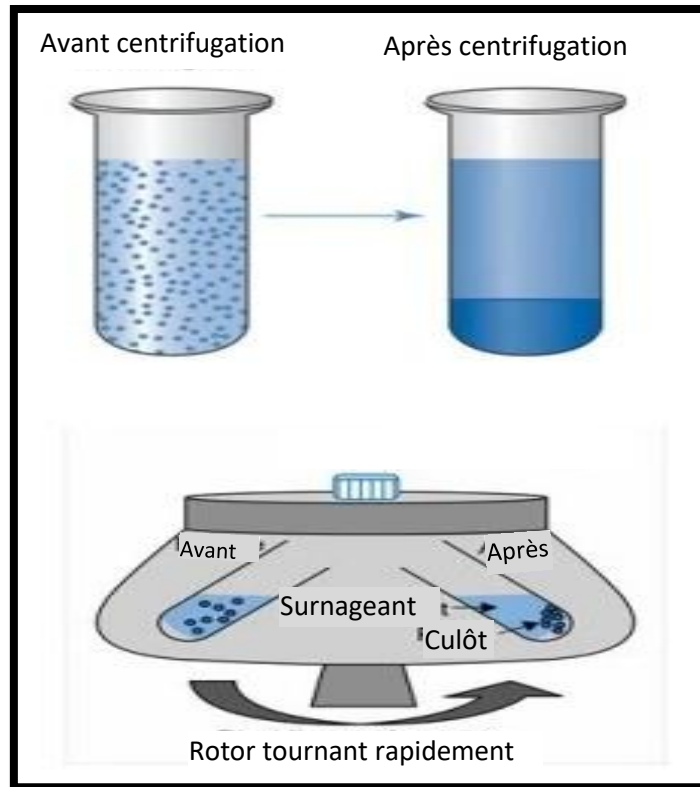
Figure 19. Précipitation isoélectrique

#### 1.4.7. La centrifugation

La centrifugation est une technique de séparation de fractions ou de structures cellulaires et macromoléculaires contenues dans un mélange. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse. Plusieurs protocoles expérimentaux font appel à une ou plusieurs étapes de centrifugation.

L'échantillons à traiter, subit alors de fortes accélérations menant ainsi à la séparation des constituants (figure 20). A la fin d'une centrifugation on peut obtenir

- un sédiment ou culot, constitué de matériel solidement entassé dans le fond du tube à centrifuger ;
- un surnageant constitué d'un liquide résiduel au-dessus du sédiment.



**Figure 20. Principe de la centrifugation**

La partie centrale d'une centrifugeuse, le rotor, sert à recevoir les godets à échantillons et est entraîné par un moteur à haute vitesse de rotation. Il y a différents types de construction de rotors qui sont disponibles en différentes tailles et matériaux :

- rotors à angle fixe ;
- rotors verticaux ;
- rotors à godets pivotants.

Ils permettent de séparer les constituants d'un mélange de quelques microlitres à plusieurs litres et peuvent être utilisés en fonction de la tâche à accomplir avec différentes vitesses de rotation réglables.

Afin d'éviter la dénaturation des échantillons, des centrifugeuses réfrigérées existent également. Les centrifugeuses à grande vitesse, les ultracentrifugeuses, fonctionnent constamment sous vide pour éviter la chaleur de frottement qui se produit à grande vitesse permettant d'éviter la dénaturation de l'échantillon.

Des précautions de sécurité doivent être respectées, notamment en ce qui concerne les récipients d'échantillons opposés dans le rotor qui doivent être bien équilibrés pour éviter tout déséquilibre qui pourrait détruire la centrifugeuse.

### 1.4.7.1. Principes de base

Le principe physique de la centrifugation est une séparation en fonction de la taille et de la densité. Une particule soumise à un champ gravitationnel tend à se déplacer dans ce champ jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter complètement. Ce principe fondamental de physique est utile pour séparer des précipités, des cellules, des organites et même des macromolécules. Un échantillon biochimique placé dans le rotor d'une centrifugeuse va subir une accélération qui va pousser les particules qui le composent vers l'extérieur du rotor, c'est-à-dire le fond du tube à centrifuger.

La vitesse de sédimentation des particules est dépendante de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, elle est quantifiée par le coefficient de sédimentation donné en unités Svedberg (S). Plus une particule est massive ou dense plus son S sera élevé.

- Voici comment calculer la force gravitationnelle relative

Dans une centrifugation, il faut connaître la force relative de centrifugation (force de gravité relative, FGR) en "x g". Cependant pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une FGR différente puisque que le rayon de rotation est différent. Il faudra alors convertir la vitesse de rotation (RPM, rotations par minute) en FGR. Pour cela on peut se servir de la formule de conversion suivante :  $FGR = 1.119 \cdot 10^{-5} \times (RPM)^2 \times r$

Où : r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et RPM (rotation par minute) exprime la vitesse de rotation.

### 1.4.7.2. Différents types de centrifugeuses

#### -Centrifugeuses de table

Les modèles les plus simples permettent d'atteindre de faibles accélérations (1000 à 2000 xg) à des vitesses de rotation relativement basses (moins de 1000 RPM). Certains modèles sont réfrigérés, d'autres non.

#### -Centrifugeuses au sol

Ces appareils sont un peu plus complexes. Elles permettent d'obtenir des vitesses de rotation de l'ordre de 30 000 RPM, donnant pour les plus petits rotors des accélérations d'environ 20 000 xg. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger des relativement gros volumes. Certains rotors peuvent contenir quatre ou six bouteilles de 250 mL.

#### -Ultracentrifugeuses

Ce sont des appareils complexes et coûteux qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300 000 xg) en faisant tourner des rotors très rapidement (50-75 000 RPM). De

telles vitesses de rotation ne peuvent s'obtenir que sous pression très réduite. Tous les modèles sont réfrigérés. Ces appareils doivent donc être munis de pompe à vide et de systèmes de réfrigération. Les volumes sont quelques peu limités, généralement on ne trouve pas de rotors pouvant contenir plus d'une dizaine de tubes de 40 mL.

#### - Microcentrifugeuses

Il existe aussi des centrifugeuses spécialement conçues pour les micro-volumes souvent employés en biochimie moderne. Les microtubes à centrifuger sont des petits tubes coniques en polypropylène généralement de 1.5 mL. Les centrifugeuses de ce type peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12-15 000 x g.

#### - Ultracentrifugeuses analytiques

Ce sont des appareils de moins en moins utilisés. Ces centrifugeuses servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines. D'autres techniques beaucoup moins coûteuses sont utilisées de nos jours : électrophorèse, filtration sur gel...

### 1.4.7.3. Centrifugation différentielle

Elle est utilisée pour séparer les composantes cellulaires. Évidemment les vitesses exactes et les durées de centrifugation peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs comme le type de tissus. Les particules sédimentent à une vitesse donnée, en fonction de leur taille et de leur densité, dans le tampon d'homogénéisation. Le procédé de purification des composants cellulaires peut être réalisé en plusieurs étapes, le surnageant étant chaque fois centrifugé plus vite et plus longtemps. Cette méthode ne permet pas d'obtenir des culots absolument purs.

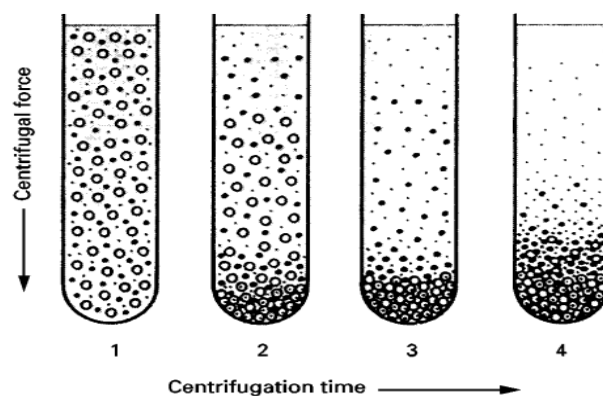


Figure 21. Centrifugation différentielle

### 1.4.7.4. Centrifugation en gradient de densité

Un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation est la différence entre la densité de la particule et celle du solvant. Cette vitesse peut être modulée en faisant varier de façon continue ou par étape (discontinue) cette différence de densité par la création d'un gradient de

concentration. Par exemple, un gradient de concentration, en saccharose ou en sels métalliques (chlorure de césium CsCl), est mis en place dans le tube avant centrifugation.

Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide. S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération. Si la particule est moins dense que celle du milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface. Les composés sédimentent en fonction de leur masse et de leur densité.

La masse et le coefficient de sédimentation des protéines et autres particules peuvent être déterminés avec une grande précision par ultracentrifugation analytique (UCA). Cette technique exige un appareillage (centrifugeuse, rotor, etc.) spécialisé à cette fin.

#### **1.4.7.5. Applications**

La séparation de deux phases liquides non miscibles peut être effectuée de façon beaucoup plus rapide par centrifugation après une extraction par solvant organique ou précipitation saline (relargage). En effet, la séparation des composés d'un mélange est réalisable par décantation, sous l'action de la seule gravitation, mais elle nécessite parfois une longue durée pour acquérir de bons résultats et est donc souvent inefficace. Il est donc plus recommandé d'utiliser la centrifugation.

## 1.5. Techniques chromatographiques

### 1.5.1. Chromatographie : aspects généraux

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. C'est une méthode d'analyse quantitative et qualitative qui sépare les constituants d'un mélange (les solutés) au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) par entraînement le long d'une phase stationnaire (solide, liquide fixé) grâce à la répartition des solutés entre les deux phases.

- **Phase stationnaire (fixe)**

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés absorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité, basse pression, et chromatographie à haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM)

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée).

- **Phase mobile**

La phase mobile est :

- soit un gaz (exemple : chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée **gaz vecteur**.
- soit un liquide (exemple : chromatographie sur papier, couche mince ou colonne), la phase mobile est appelée **éluant**.

### 1.5.2. Classification

Les méthodes chromatographiques regroupent des techniques très variées qui peuvent être classées selon trois modalités différentes :

- Classification selon la nature physique des phases
- Classification selon le phénomène mis en œuvre
- Classification selon le procédé opératoire

- **Classification selon la nature des phases**

-la phase mobile est un fluide, donc soit un liquide, soit un gaz

-la phase stationnaire est soit un solide, soit un liquide.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses types chromatographie :

- chromatographie liquide-solide
- chromatographie liquide-liquide
- chromatographie gaz-solide
- chromatographie gaz-liquide

- **Classification selon le phénomène chromatographique**

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées en fonction des mécanismes de séparation. Les facteurs qui interviennent dans la répartition des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique. Cela dépend de la nature (et de la structure) de la phase stationnaire utilisée.

On distinguera donc :

- La chromatographie d'adsorption**

C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

- La chromatographie d'adsorption en phase inverse :**

C'est une chromatographie liquide solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

- La chromatographie d'affinité**

Elle correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).

- La chromatographie de partage**

Lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage). C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (exemple : l'eau sur la cellulose d'un papier).

- La chromatographie d'échange d'ions**

La phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.

- La chromatographie d'exclusion**

La phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; on parle aussi de chromatographie de filtration ou de perméation sur gel.

- **Classifications selon les procédés utilisés**

Selon le conditionnement de la phase stationnaire, on distinguera :

-la chromatographie sur **colonne**

-la chromatographie planaire sur papier ou sur couche **mince (CCM)**

Selon les modalités de migration de la phase mobile, on distinguera :

-la **chromatographie par développement** (les constituants de l'échantillon restent sur la phase stationnaire exemple : CCM)

-la **chromatographie d'éluion** (les substances sont entraînées avec la phase mobile hors de la phase stationnaire).

#### ❖ Principes communs

- les substances se répartissent entre deux phases non miscibles, selon un équilibre lié à un coefficient de partition, qui dépend à la fois de la nature des composés et de celle des deux phases considérées;
- le renouvellement continu de la phase mobile remet en cause cet équilibre et entraîne une succession d'autres équilibres, ce qui se traduit par une migration des substances le long de la phase stationnaire;
- la séparation est obtenue car chaque composé migre avec une vitesse qui lui est propre (et dépend du coefficient de partition).

### 1.5.3. Expérience de base en chromatographie sur colonne (basse pression)

Elle peut être décrite comme suit (figure 22) :

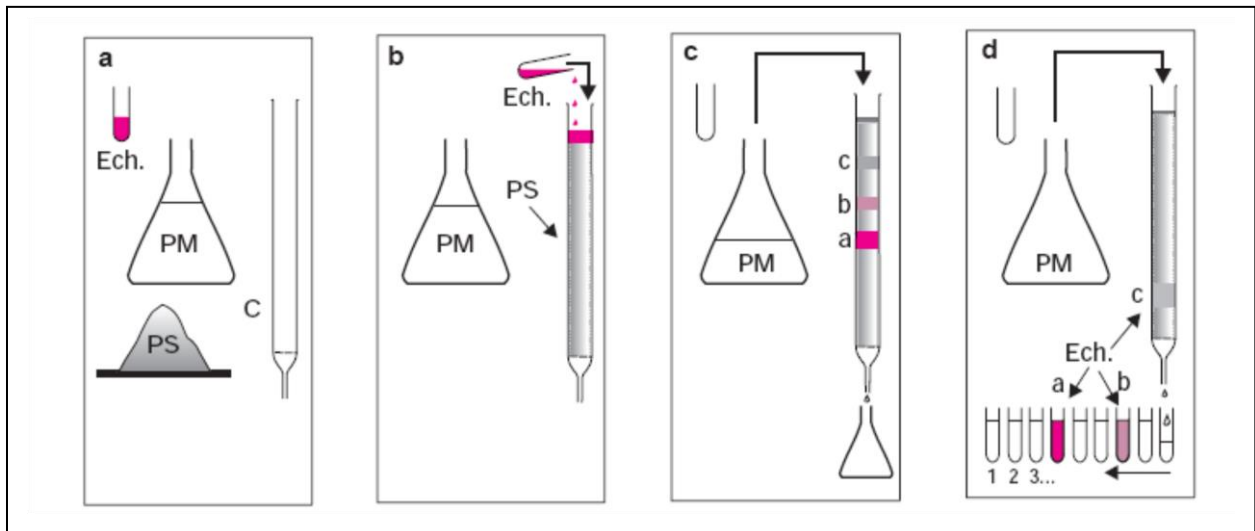
- A.** Immobiliser dans une colonne un solide finement divisé appelé phase stationnaire.
- B.** Placer au sommet de cette colonne un petit volume de l'échantillon à séparer.
- C.** Forcer cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la phase mobile (débit régulé grâce à des pompes) afin d'entraîner ses divers constituants.

Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile.

- On peut ainsi mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier.
  - Pour cela il est indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...)
  - Il faut placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile (détecter la sortie d'un composé) et un enregistreur.

Le but de cette application de la chromatographie :

- Récupérer les composés séparés et mesurer leurs temps de passage dans la colonne.



**Figure 22) Expérience de base en chromatographie sur colonne.**

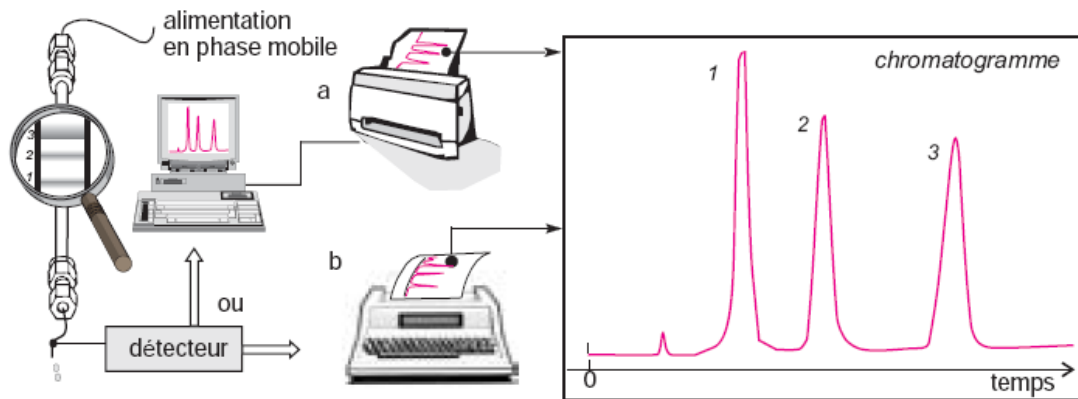
- a) Les ingrédients nécessaires C : colonne, PS : phase stationnaire, PM : phase mobile et E : échantillon ; b) Dépôt de l'échantillon ; c) Début de l'élution ; d) Récupération des produits après séparation.

#### 1.5.4. Analyse quantitative et qualitative

- L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative : Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son temps de migration à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

- les chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée – pour pouvoir séparer des micro-quantités d'échantillon – tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation.
- Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisées dans des conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près.
- Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé

chromatogramme, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un capteur dont il existe un grand nombre de variantes.



**Figure 23. Principe de l'analyse par chromatographie.** Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants principaux. L'ordre d'apparition des pics est en correspondance avec la vitesse d'élution de chaque constituant à travers la colonne.

L'analyse qualitative sert essentiellement à l'identification des composés d'un mélange. Elle est déterminée par les temps de rétention ( $t_R$ ) qui est une caractéristique de chaque soluté ou composé.

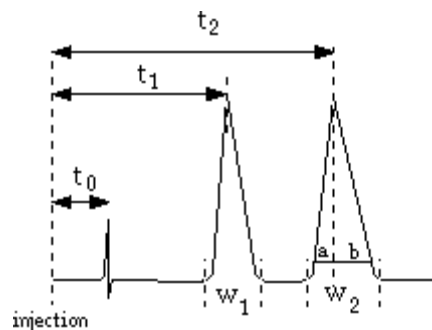
L'analyse quantitative est basée sur le fait que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration des produits analysés.

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

$m_i$  : masse de soluté i

$K_i$  : coefficient de proportionnalité

$A_i$  : aire de pic de soluté i



Les temps de rétention et les pics des chromatogrammes sont comparés à ceux de quantités connues de substances étalons (références connues).

L'analyse quantitative et qualitative repose sur les données théoriques suivantes :

➤ **Le facteur de capacité  $K'$**  : caractérise la rétention d'une substance donnée.

Soit :  $t_0$  est le temps mis par la phase mobile à traverser la colonne,  $t_i$  est le temps de rétention de cette substance.

$$K' = \frac{t_i - t_0}{t_0}$$

➤ **Facteur de sélectivité  $\alpha$  entre deux solutés** : caractérise le temps séparant les sommets de deux pics successifs et défini comme suit :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_{R0}}{t_{R1} - t_{R0}}$$

- Si  $\alpha=1$  : les pics coïncident, les paramètres appliqués à l'analyse ne sont pas convenables.
- Si  $\alpha > 1$  : les pics sont distincts, et donc la séparation est possible.

### 1.5.5. Chromatographie planaire : Chromatographie sur Couche Mince (CCM) / Thin Layer Chromatography (TLC)

#### -Mise en œuvre de la chromatographie planaire

La séparation par chromatographie planaire des constituants d'un échantillon est réalisée sur une fine couche de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.

Le principe de la séparation entre phases est semblable à celui de la chromatographie liquide sur colonne, mais la conduite de l'expérience de la CCM est différente. On distingue trois étapes :

#### ▪ Dépôt de l'échantillon

On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nanolitres et un microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache ou spot de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane.

La tache peut également avoir la forme d'un trait horizontal de quelques mm, obtenu par pulvérisation de l'échantillon au moyen d'un dispositif automatique dont l'intérêt est de pouvoir maîtriser la reproductibilité des quantités déposées, ce qui est indispensable pour une analyse quantitative.

La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant. L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

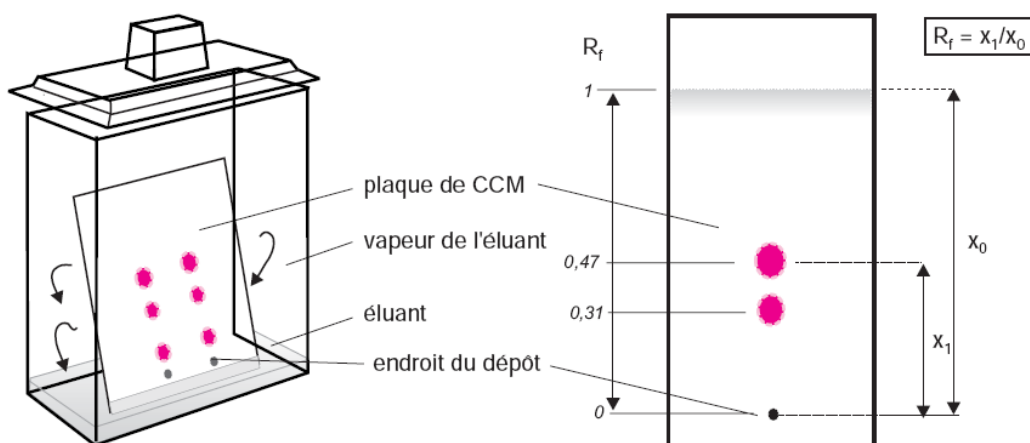
#### ▪ Développement de la plaque

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

#### ▪ Révélation post-chromatographique

La localisation des composés après migration se fait sur la plaque débarrassée de l'éluant. A l'exception des composés colorés naturellement (les chlorophylles, caroténoïdes,..), les composés qui donnent des taches invisibles doivent être « révélés ». À cette fin la phase stationnaire peut contenir un indicateur consistant en un sel de zinc qui émet une fluorescence verte lorsqu'on éclaire la plaque au moyen d'une lampe *UV* à vapeur de mercure ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde apparaît sous forme d'une tache sombre (ou quelquefois colorée) sur un fond illuminé en vert.

Une autre méthode quasi universelle de révélation consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique. Ce mode d'examen n'est cependant pas utilisable en CCM quantitative : on effectue, dans ce cas, la révélation par pulvérisation (avoir un brouillard fin et homogène) de réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline). nitrate d'argent (glucides); ninhydrine (acides aminés); solvant d'acide de  $\text{KmnO}_4$  (lipides).



**Figure 24.** Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM. De dimensions variées en fonction de la taille des plaques (de 5 × 5 à 20 × 20 cm) elles sont en verre et munies d'un couvercle. Aspect classique d'une plaque après révélation des spots de migration, calcul du  $R_f$ .

Chaque composé est défini par son  $R_f$ , (abréviation de « *retardation factor* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

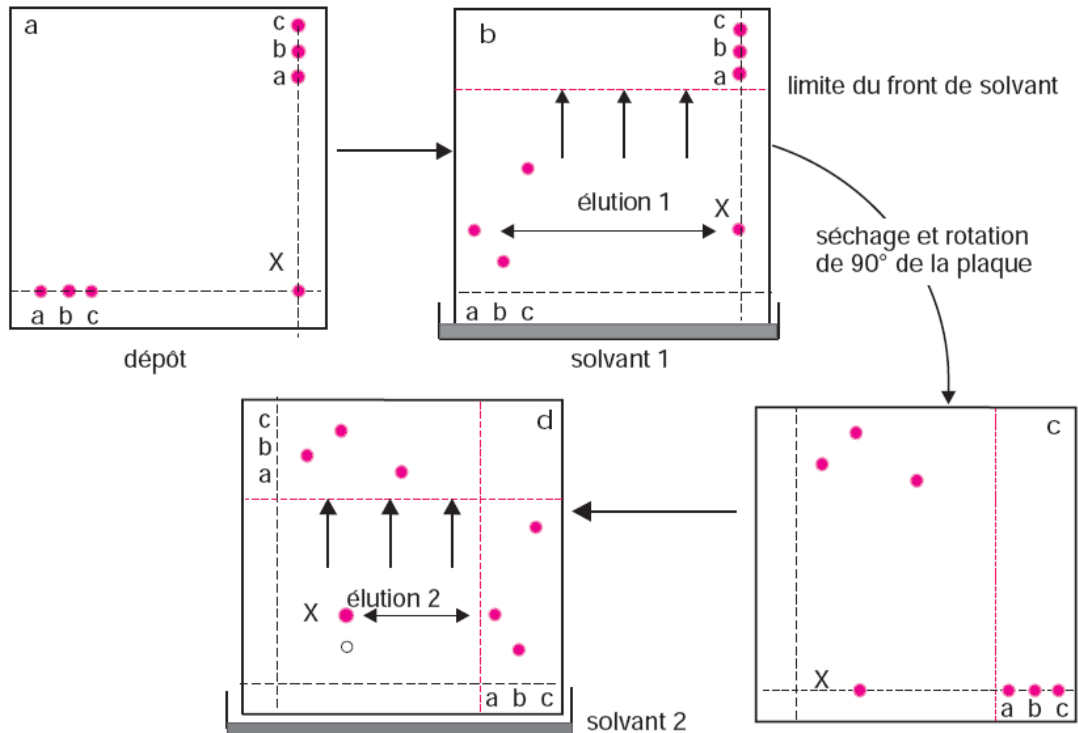
$$R = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

### 1.5.5.2. Applications de la CCM

Elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction. Elle permet aussi le traitement de plusieurs échantillons sur une même plaque et en même temps. C'est une méthode qualitative. La CCM permet l'analyse des glucides, d'acides aminés, lipides et des arômes.

### 1.5.5.3. CCM bi-dimensionnelle

L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la chromatographie bi-dimensionnelle en procédant à deux éluations successives avec deux éluants différents. Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés.



**Figure 25. Exemple d'une expérience de CCM bi-dimensionnelle.** En procédant à 2 éluions successives dans les 2 directions, on peut conclure que le composé X est un mélange d'au moins deux composés parmi lesquels le composé de référence a (même  $R_f$  dans les deux solvants), mais le second composé n'est pas b, bien qu'ayant le même  $R_f$  dans l'éluion 2.

#### 1.5.5.4.CCM quantitative

Pour valider une méthode de dosage par CCM, il faut non seulement disposer d'un moyen de quantification des taches, mais aussi définir les paramètres habituels (spécificité, étendue du domaine de linéarité, précision...). Dans ce but, la plaque à examiner est déplacée sous l'optique d'un densitomètre (ou scanner) qui mesure soit l'absorption soit la fluorescence à une ou plusieurs longueurs d'onde. Cet appareil conduit à un pseudo-chromatogramme comportant des pics dont on peut mesurer les aires. En CCM il suffit de quelques ng d'un composé absorbant dans l'UV pour former une tache décelable.

## 1.5.6. Chromatographie sur colonne

### 1.5.6.1. Chromatographie sur échangeurs d'ions

De nombreux constituants biologiques (amino-acides, protéines, ...) possèdent des groupes ionisables et peuvent ainsi avoir une charge nette ou globale positive ou négative. Cette charge nette constitue ainsi un paramètre clé pour la séparation de ces molécules chargées contenues dans un mélange. Notons que la charge nette est dépendante du pKa, donc du pH de la solution.

#### Principe

C'est une technique basée sur l'attraction électrostatique des ions à séparer par une phase stationnaire solide insoluble sur laquelle sont greffés des groupements fonctionnels (figure 26):

-Les échangeurs de cations portant des groupements chargés négativement qui fixent des molécules chargées positivement.

-Les échangeurs d'anions portant des groupements chargés positivement, qui fixent des molécules chargées négativement.

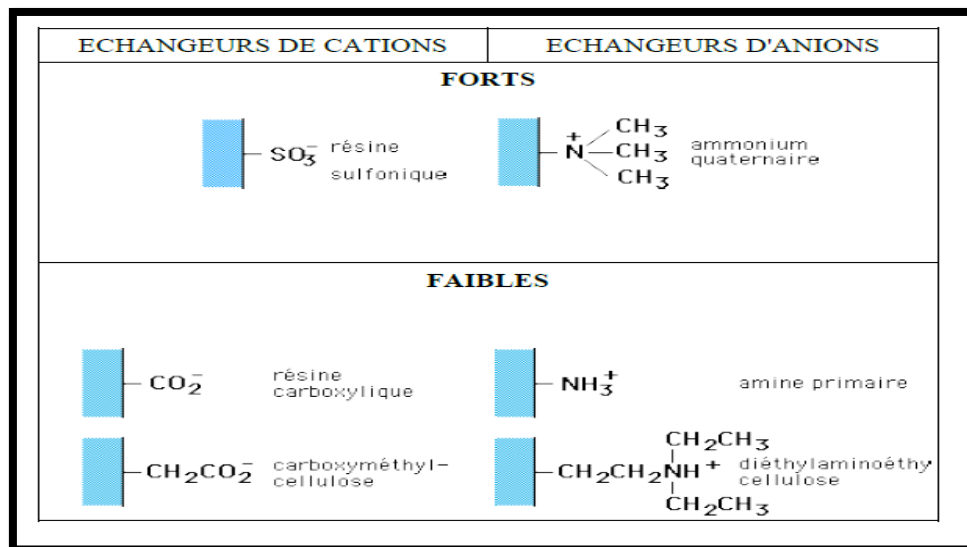


Figure 26. Les échangeurs d'ions

#### ▪ Résines cationiques

- Fortes sulfoniques **Res-SO<sub>4</sub><sup>-</sup> H<sup>+</sup>**: ionisation forte quelque soit le pH.
- Faibles carboxyliques **Res-COO<sup>-</sup> H<sup>+</sup>**: non ionisables en milieu fortement acide et s'ionisent à pH faiblement alcalin.
- Très faibles phénoliques **Res-O<sup>-</sup> H<sup>+</sup>**: ionisation uniquement en milieu alcalin.

- **Résines anioniques**

- Fortes : résines à groupement amine quaternaire ou tertiaire.
- Faibles à groupement amine primaire et secondaire.

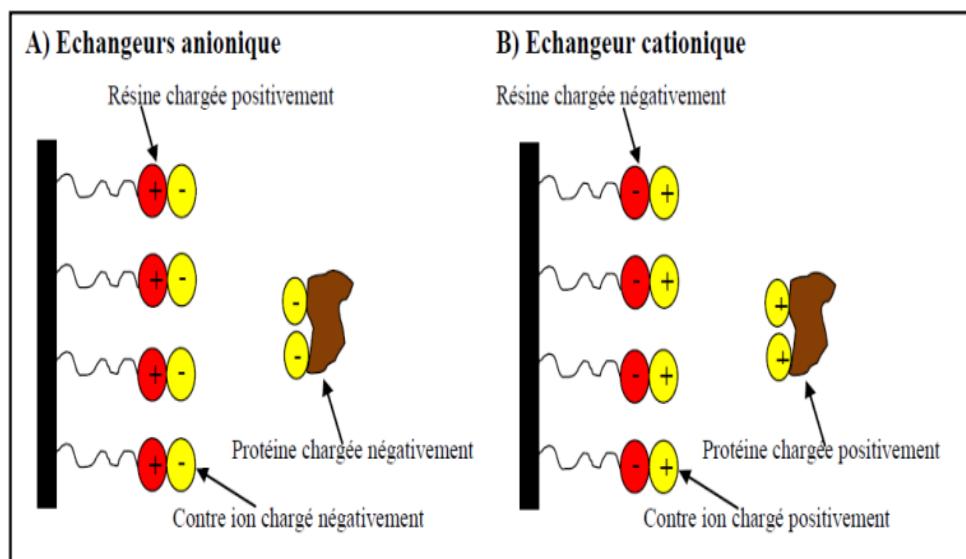
La résine est sous forme de billes poreuses de polystyrène polymérisées et réticulées contenant les groupements fonctionnels acides ou basiques.

- **Réalisation de la chromatographie par échange d'ions**

Les molécules ionisables de l'échantillon sont fixées sur la résine. On peut procéder ensuite à l'éluion qui consiste à déplacer l'ion fixé par un autre (contre ion), de densité de chargé et de concentration plus élevée on utilise de petits ions fortement chargés:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HO}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ....

Le mécanisme peut être scindé en plusieurs étapes :

- Diffusion de l'ion à travers la structure de l'échangeur jusqu'au site à travers le réseau du polymère, ce qui dépend du degré de réticulation présent dans la structure de l'échangeur et de la concentration de la solution. Cette étape détermine la vitesse du processus d'échange.
- Echange d'ions au site. Cette étape instantanée est toutefois équilibrée :



**Figure 27. Schéma d'une séparation sur un échangeur d'ions**

Plus la molécule porte une charge importante, plus elle aura une affinité plus élevée vis à vis de l'échangeur. Par conséquent elle sera plus difficile à déplacer par les autres ions.

- Diffusion de l'ion échangé à travers l'échangeur jusqu'à la surface.
- Désorption sélective par l'éluant et diffusion de l'ion dans la solution externe. La désorption sélective d'une molécule liée est effectuée par modification du pH et/ou de la concentration ionique.

- **Technologie et applications**

Plus souvent utilisée sur colonne, la chromatographie par échange d'ions peut être transposée sur couche mince. Du papier échangeur d'ions est également commercialisé. Enfin l'échange d'ions peut être réalisé en batch : la résine est mise en présence de la solution et agitée mécaniquement.

La chromatographie sur échangeurs d'ions est utilisée pour séparer des molécules ionisables : acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés, lipides ionisés, ions minéraux.

### 1.5.6.2. Chromatographie d'affinité

C'est une technique de séparation qui repose sur des interactions moléculaires spécifiques et réversibles entre deux substances biologiquement actives (enzyme-substrat, hormone-récepteur, Ac-Ag...). C'est une technique hautement de purification et très spécifique (figure 28).

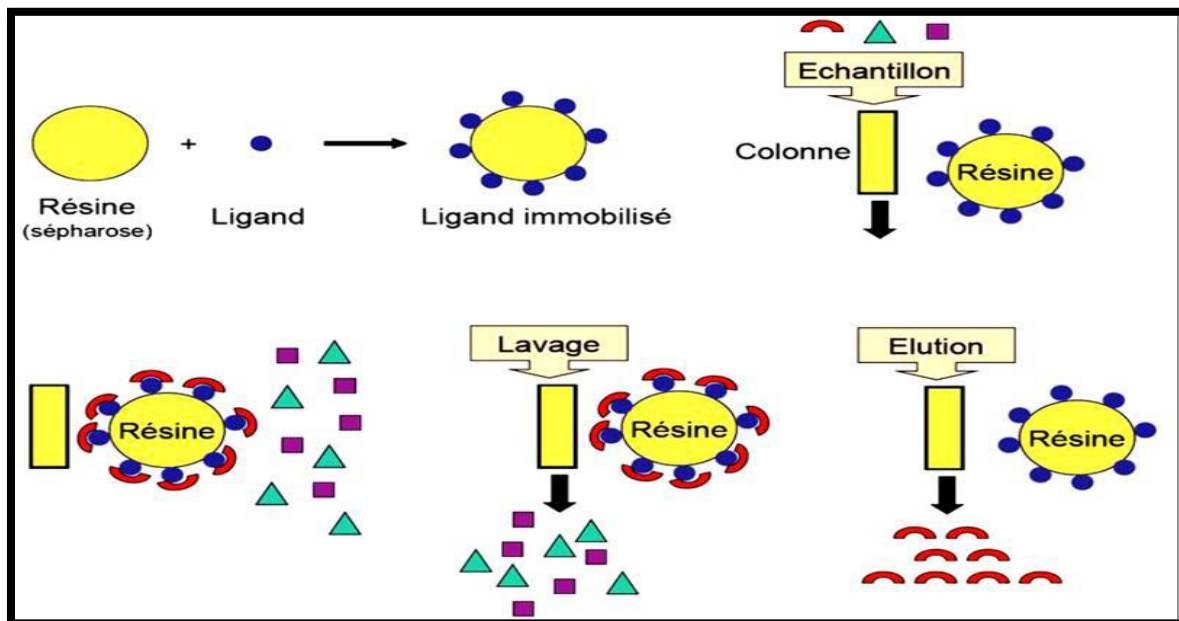


Figure 28. Schéma d'une séparation par chromatographie d'affinité

Il s'agit d'un système à deux composants : un produit impur en solution à séparer, « l'affinant », et un produit « ligand » fixé chimiquement sur un support solide. Il est immobilisé de manière covalente à une matrice poreuse et inerte. Le ligand se combine à l'affinant, il lie spécifiquement la protéine d'intérêt. Quand une solution protéique non purifiée traverse la colonne, la protéine ciblée se lie à l'effecteur (ligand), tandis que les autres composants sont

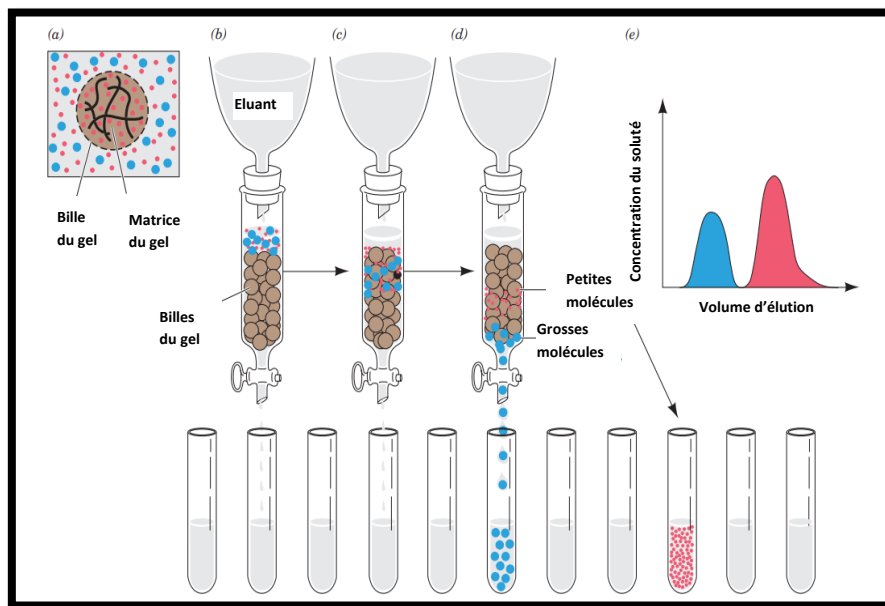
élués. La récupération de la protéine ciblée s'effectue par des modifications de la phase mobile (pH, force ionique ou l'ajout d'un compétiteur).

### 1.5.6.3 Chromatographie d'exclusion moléculaire : Chromatographie de tamisage moléculaire, gel-filtration ou de perméation sur gel.

#### A) Principe

C'est une technique de séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Des granules de gel poreux sont utilisés (figure 28). Les phase stationnaire est constituée de polymères insolubles à base de polysaccharides préparées sous formes de billes réticulées (poreuses) exemples : gel d'agarose (sépharose), gel de dextrane (sephadex) et de polyacrylamide(biogel).

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues, à cet effet elles sont éluées les premières, au niveau du volume mort ( $V_m$  ou  $V_0$ ). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élué et le logarithme de la masse moléculaire.



**Figure 29. Schéma du tamisage moléculaire**

(a) Une bille du gel ; (b) La solution de l'échantillon commence à pénétrer dans la colonne de gel ; (c) Les molécules plus petites peuvent pénétrer dans le gel et, par conséquent, migrer dans la colonne plus lentement que les molécules plus grosses qui sont exclues du gel ; (d) Les plus grosses molécules émergent de la colonne pour être collectées séparément des molécules plus petites, qui nécessitent un solvant supplémentaire pour l'élué de la colonne ; (e) Le diagramme d'élué du chromatogramme indique la séparation complète des deux composants, le plus gros composant s'éluant en premier.

### B) Représentation des résultats

- ✓ Porter le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution

$$\log MM = f(V_e)$$

-Représentation du logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution :

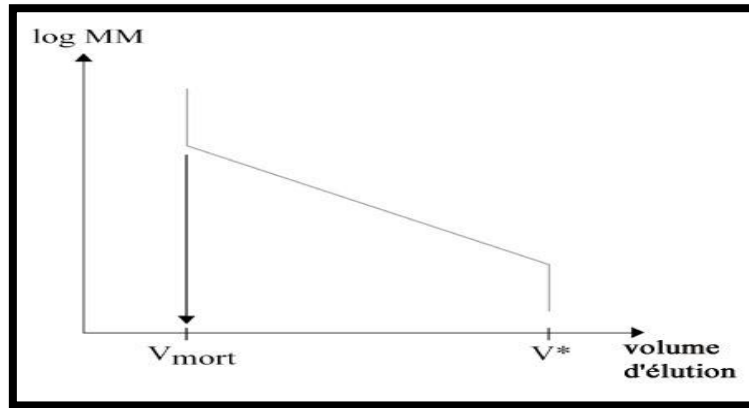
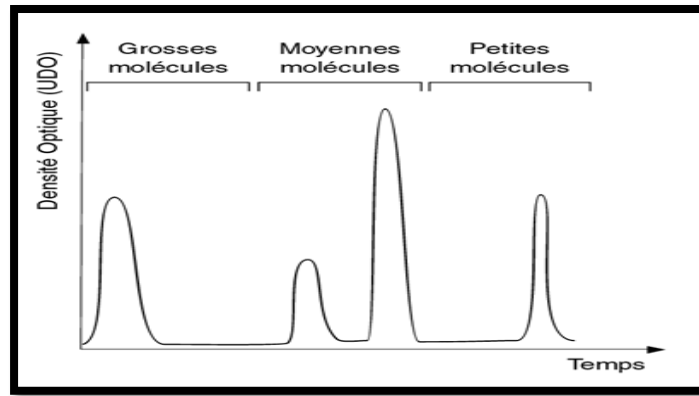


Figure 30. Variation du volume d'élution en fonction de log MM.

- ✓ Ou bien porter logarithme de la masse moléculaire en fonction du  $K_{AV}$ , le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :  $\log MM = f(K_{AV})$ . Le  $K_{AV}$ , est le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :

$$K_{AV} = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

- $V_t$  = volume total (déterminé en remplissant totalement la colonne, fermée, avec l'éluant)
- $V_m$  = volume mort (déterminé en mesurant le  $V_e$  d'une substance totalement exclue)
- Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, **au niveau du volume mort ( $V_m$  ou  $V_0$ )**.
- Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.
- Une molécule totalement incluse sera éluée avec un volume d'élution :  $V_e = V_m + V_i$ , où  $V_i$  est le volume d'eau interne aux granules de gel.
- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires



**Figure 40. Elution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires**

#### 1.5.6.4. Applications préparatives

Elle peut être utilisée pour la **concentration de macromolécules**. Elle permet aussi **l'élimination des sels ou de petites molécules**. Elle est utilisée dans les étapes de purification

#### D) Détermination du poids moléculaire

- Etalonner de la colonne avec des protéines de masse molaire connue ;
- Etablir le tracé de la courbe  $V_e = f(\log M)$  ;
- Faire passer l'échantillon de PM inconnu et déterminer son  $V_e$  ;
- Déterminer graphiquement le  $\log M$  correspondant au  $V_e$  de l'échantillon et ainsi est déterminé le PM de la protéine inconnues.

#### 1.5.7. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

c'est une chromatographie sur colonne, mais à haute pression. Tous les types de chromatographie (exclusion, adsorption, affinité...) peuvent être adaptés à cette technique. Les phénomènes mis en jeu lors de la chromatographie sont liés à la surface de la phase stationnaire. Plus celle-ci est importante, plus il y aura d'interactions avec le soluté et plus la séparation sera meilleure, d'où l'intérêt d'utiliser des particules de la phase stationnaire de la plus petite taille possible. La phase stationnaire est alors caractérisée d'une très fine granulométrie.

##### 1.5.7.1.Principe

Le mélange à analyser est injecté dans la phase mobile grâce à une vanne d'injection située entre la pompe et la colonne. La pompe permet la circulation de la phase mobile au travers de la colonne. Les diverses molécules du mélange vont alors être séparées dans la colonne suivant leur affinité pour la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. Cette technique est utilisée pour la séparation des

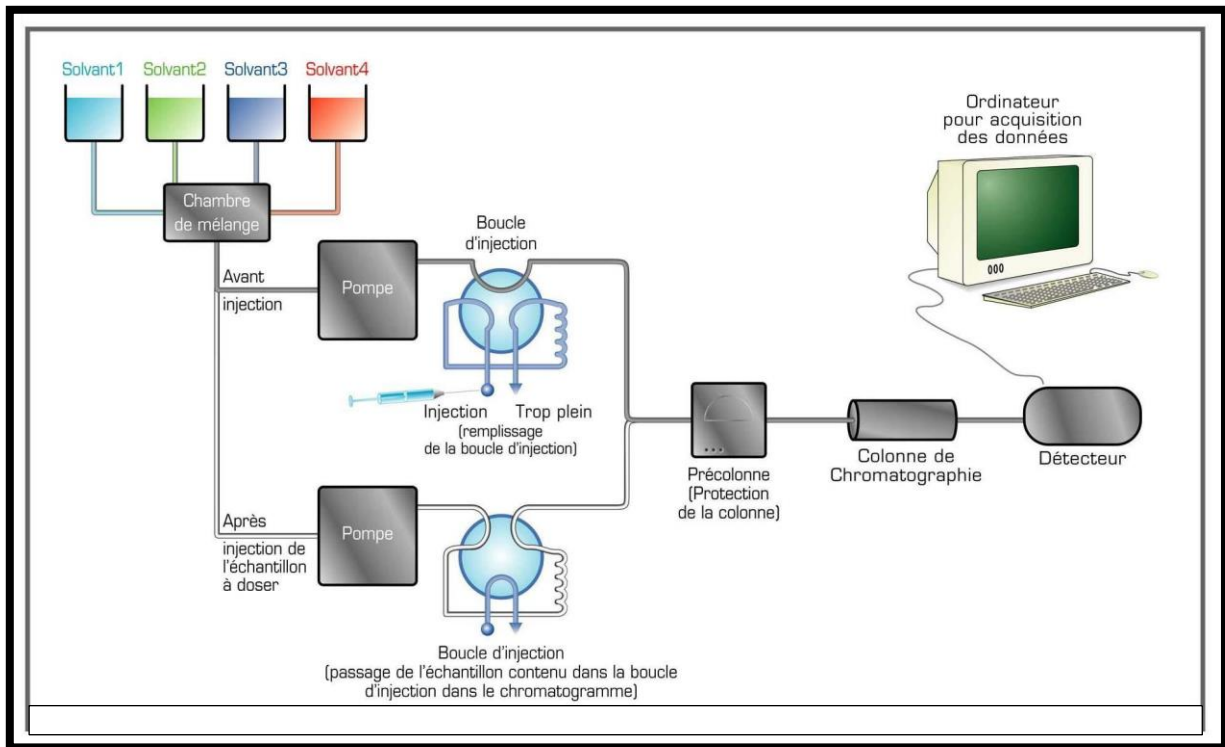
mélanges peu ou non volatiles afin d'effectuer une identification et/ou quantification des constituants (chromatographie analytique), mais on peut également l'utiliser pour purifier des molécules (chromatographie préparative).

### **1.5.7.2. Instrumentation**

Dans tous les appareils HPLC, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre. En aval de l'injecteur se trouvent la ou les colonnes où s'effectuera la séparation, puis au bout de la chaîne se trouve le détecteur (figure 50).

- **Pompes** : elles assurent le débit de la phase mobile (éluant), permettent sa traversée le long de la colonne. Elles assurent une pression élevée et un débit constant.
- **Injecteur** : Il permet l'injection de volumes variables allant du microlitre au millilitre et peut fonctionner sous de hautes pressions.
- **Colonne** : c'est généralement un tube en acier de 5 à 30 cm de longueur et de diamètre de l'ordre de 5 mm (figure 51). La phase stationnaire est constituée de grains sphériques calibrés de diamètre allant de 5 à 10  $\mu\text{m}$ . La nature de la phase est fonction du type de chromatographie liquide que l'on souhaite réaliser (exclusion, adsorption, ...).
- **Détecteur** : il permet la détection en continue la présence des composés dans la phase mobile tout au long de l'élution. Il existe différents types de détecteurs : le réfractomètre, le spectrophotomètre UV-visible, le spectrophotomètre à barrette de diodes (Diode Array Detector, DAD), le spectrofluorimètre et le polarimètre, le spectromètre de masse (MS).

- **Enregistreur** : les résultats sont enregistrés sous forme de pics ou chromatogramme, qui sont comparés à une base de données préalablement établie.



**Figure 50. Schéma montrant le principe du fonctionnement d'une HPLC.**



**Figure 51. Colonnes HPLC de différentes dimensions (10 à 30cm).**

### 1.5.7.3. Application

Elle est utilisée dans la détection de multiples résidus d'antibiotiques de quinolone, de sulphonamide, de  $\beta$ -lactamine, de macrolide, de tétracycline, et ce, dans des types d'échantillons très variés tels que le lait, viande ou les tissus musculaires.

## 1.5.8. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

### 1.5.8.1. Principe

La phase stationnaire est un solide adsorbant (gel de silice, alumine, ...etc). Un gaz vecteur (phase mobile) entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur. Lorsque les solutés sont directement volatilisables, les substances sont solubilisées dans un solvant et ensuite analysées. Lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température du chromatographe ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer en dérivés volatils stables.

### 1.5.8.2. Instrumentation

Un appareil de CPG comporte trois parties principales (figure 53) : injecteur, colonne et détecteur.

- **Injecteur**

Il sert à l'introduction du mélange à analyser dans la colonne. En générale, la chambre d'injection doit être à température supérieure que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons. L'injecteur est donc thermo-régulé à une température permettant la vaporisation de l'échantillon qui sera ensuite entraîné par le gaz vecteur dans de la colonne.

- **Les colonnes**

Plusieurs types de colonne existent mais les plus utilisées sont les colonnes capillaires qui sont des colonnes tubulaires de diamètre inférieur à 1mm (semi capillaire entre 0,5 et 1mm) (figure 52). La phase stationnaire est déposée sur la paroi interne de la colonne. On adopte généralement une température légèrement supérieure au point de vaporisation du constituant le moins volatil, la colonne est alors maintenue dans un four à bain d'air thermostaté.



Figure 52. Colonne capillaire pour CPG.

- **Les détecteurs**

- **Détecteur à ionisation de flamme (FID)** : des ions sont formés par la flamme provenant de la combustion de l'hydrogène dans l'air. Si une substance organique est présente dans cette flamme, le nombre d'ions formés augmente. La réponse du détecteur FID est proportionnelle

à la masse du soluté qui passe dans le brûleur, ainsi la surface d'un pic est proportionnelle à la concentration de l'analyte détecté.

- **Détection par spectrométrie de masse (MSD)** : le détecteur permet l'obtention des spectres de masse des molécules séparées par GC et ainsi l'obtention des structures des constituants aboutissant à leur identification.

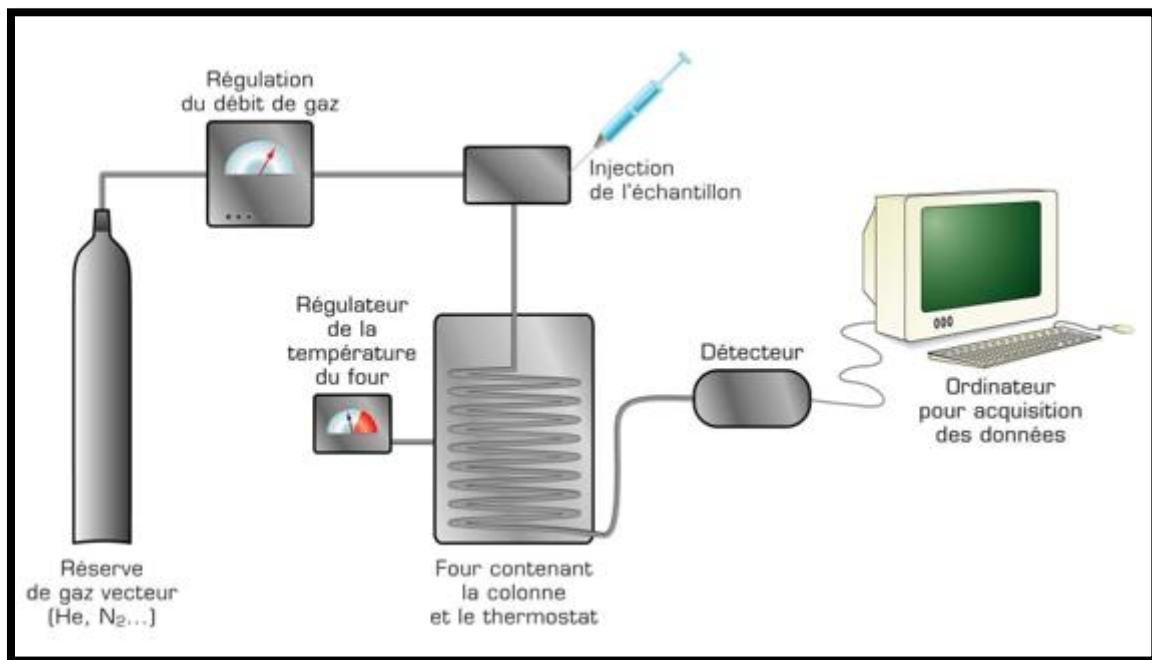


Figure 53. Schéma montrant le principe du fonctionnement d'une CPG.

### 1.5.8.3. Application de la CPG

- Dosage en toxicologie: recherche de produits toxiques en intoxication aiguë (méthanol...);
- Dosage des drogues: amphétamines, opiacés, cannabinoïdes ;
- Contrôle anti-dopage ;
- Dépistage de toxicomanie .
- Agroalimentaire:
  - Recherche et dosage de pesticides ;
  - Recherche et dosage des nitrosamines (nitrites)

## 1.6. Méthodes de dosages biochimiques

### 1.6.1. Dosage colorimétrique

Un dosage colorimétrique est un type de dosage possible lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et si l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Beer-Lambert.

Un dosage colorimétrique est également possible en utilisant des indicateurs colorés tels que l'hélianthine, la phénolphtaléine, le vert de bromocrésol qui vont se colorer par exemple à pH différents et de ce fait, vont pouvoir indiquer quand on atteint le point d'équivalence. On parle alors aussi de titrage colorimétrique. Le principe d'un dosage colorimétrique repose sur un changement de couleur lors d'un dosage, ce changement ayant généralement lieu lors des équivalences.

#### Loi de Beer-lambert

La forme utilisée est la suivante :  $A = \varepsilon \times l \times C$

A : absorbance de la solution sans unité

$\varepsilon$  : coefficient d'extinction molaire en  $L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$

l : longueur de cuve traversée par la lumière en cm

C : concentration molaire en  $mol \times L^{-1}$ .

#### 1.6.1.1. Réalisation d'une gamme d'étalonnage au spectrophotomètre

Trois types de solutions sont utilisés :

1. une solution de la protéine dont on veut déterminer la concentration.
2. une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence ou standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration.
3. une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines.

La solution de concentration connue va servir pour réaliser une gamme étalon par la préparation d'une série de tubes contenant un volume identique mais des quantités croissantes et connues de la protéine de référence. En parallèle, une série de tubes, contenant l'échantillon ou une dilution de l'échantillon à doser est préparée. Il faut donc préparer une solution de l'élément à doser à faible concentration.

Afin que la coloration se développe dans les mêmes conditions pour la gamme étalon et l'échantillon à doser, la solution de réactif est additionnée au même moment dans tous les tubes. Les volumes de réactifs doivent rester fixes pour permettre la réaction, et les quantités (reliées aux concentrations) de composé à doser varient d'un tube à un autre.

L'absorbance de tous les tubes est ensuite mesurée. Cette gamme permet de déterminer une absorbance à une longueur d'onde donnée à l'aide du spectrophotomètre. Lors la réalisation de la gamme d'étalonnage et du dosage, le volume final de liquide dans chaque tube doit être identique.

Il faut noter que les mêmes procédures concernent aussi d'autres composés à doser, sucres, flavonoïdes .....la différence réside dans les réactifs différents employés, le protocole et les longueurs d'onde utilisés.

### **1.6.1.2. Exemples de dosage (protéines)**

Des méthodes colorimétriques sont souvent utilisées pour déterminer la concentration totale des protéines. Elles sont basées sur la réaction d'agents chromophores avec les liaisons peptidiques ou avec certains acides aminés des protéines. Cette réaction donne naissance à une coloration (dans le visible) dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en protéine. Les méthodes les plus utilisées sont celles de Biuret, Lowry et Bradford.

#### **- Méthode de Lowry**

C'est une méthode de dosage colorimétrique de protéines. Elle est essentiellement basée sur la méthode du biuret, l'absorbance est mesurée à 745nm, l'un des inconvénients de cette méthode est qu'il peut y'avoir interférence de plusieurs substances tel que le saccharose l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)

#### **- Méthode de Bradford**

C'est une méthode spectrophotométrique, elle est utilisée pour déterminer les concentrations de protéines en solution, il s'agit d'un dosage colorimétrique au Bleu de Coomassie G250, basé sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après sa liaison avec les acides aminés basiques (Histidine, Arginine, Lysine) et les résidus hydrophobes de la protéine.

### **1.6.2. Méthodes d'immuno-dosage**

Il existe des méthodes à la fois de détection et de dosage beaucoup plus précises, c'est notamment le cas de la méthode d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), qui est une méthode immuno-enzymatique dans laquelle le dosage des concentrations de protéines dans une solution est couplé à une réaction catalysée par une enzyme, qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie.

### **1.6.3. Méthodes chromatographiques**

Les méthodes chromatographiques sur colonne permettent la séparation et la quantification des différentes protéines d'un mélange. L'analyse chromatographique peut nécessiter une étape préalable de traitement de l'échantillon (extraction, précipitation des protéines...) qui allonge la

durée de ces analyses mais qui peut aussi être automatisable. Elles nécessitent par ailleurs un équipement particulier et un savoir-faire pour l'utilisation de ces instruments. Ces méthodes sont des techniques de séparation qui permettent l'analyse d'un mélange en individualisant les différentes molécules de ce mélange. Les molécules sont quantifiées à l'aide de détecteurs de différents types, le plus répandu actuellement étant la spectrométrie de masse. Les méthodes chromatographiques sont très sensibles et spécifiques, pouvant permettre le dosage des métabolites. En particulier, la spectrométrie de masse est très spécifique.

Dans le cas de la CCM, la lecture peut se faire à l'oeil nu (analyse qualitative) ou par densitométrie (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration). Une analyse quantitative des fractions peut se faire l'intégration des pics. Le dosage peut être réalisé après élution des fractions.

#### **1.6.4. Méthodes électrophorétiques**

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés. Elle permet dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques) de séparer des molécules non ioniques.

La révélation des fractions peut être globale (rouge Ponceau, Amido-schwartz, bleu de Coomassie) ou spécifique (révélation des lipoprotéines avec un colorant des lipides, révélation d'une activité enzymatique...). La lecture peut se faire à l'oeil nu (analyse qualitative) ou par densitométrie (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, l'intégration des pics permet une analyse quantitative des fractions ; ou encore le dosage peut être effectué après élution des fractions.

# **Méthodes d'analyse microbiologiques**

## II. Application à l'analyse et au contrôle de produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques

### 2.1. Politique de contrôle

Le contrôle microbiologique de la fabrication des produits destinés à la consommation humaine et / ou animale fait partie d'un système de régulation, dont la fonction est de détecter, le plutôt possible, toute anomalie de ce système de façon à permettre une réaction préventive destinée à empêcher toute évolution défavorable de la qualité. Les contrôles doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande du produit fabriqué. De plus, les contrôles doivent permettre de minimiser les pertes dues à de mauvaises conditions de fabrication et donc d'avoir le moins possible de produits non conformes. Le contrôle microbiologique occupe une place privilégiée dans les procédures de mise sous assurance-qualité. Il comporte quatre démarches en interaction :

- L'évaluation (par exemple d'un niveau de qualité existant) ;
- La définition d'un objectif (amélioration de la qualité) ;
- La préparation (mise en place de moyens nécessaires pour atteindre l'objectif retenu) ;
- L'exécution (réalisation de la production à l'aide des dispositifs mis en place).

Le système HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) ou encore ADPCM (Analyse des Dangers et des Points Critiques pour leur Maîtrise) utilise une démarche où le contrôle microbiologique joue un rôle essentiel. En effet, à chaque point critique, en se basant sur des critères microbiologiques, un niveau seuil (défini) de contamination microbienne ne doit pas être dépassé.

Le contrôle microbiologique a deux fonctions distinctes :

- Evaluer la qualité microbiologique d'un produit ou d'une matière première ;
- Maîtriser un point critique sur une chaîne de production.

### 2.2. Niveaux de contrôle

Il existe trois niveaux de contrôle : avant, en cours et après la fabrication du produit.

- Contrôle préventif : effectué, avant la fabrication, sur les matières premières et les adjuvants.
- Contrôle en cours de fabrication : effectué sur le produit mais aussi sur le matériel, les locaux, et le personnel.
- Contrôle sur les produits finis : effectué sur le produit fini afin de conclure sa conformité aux normes.

### 2.3. Contrôle de la qualité hygiénique

Une altération de la qualité hygiénique met en cause la santé du consommateur, le produit altéré conduisant à des intoxications alimentaires de gravités diverses suivant la nature des microorganismes en cause. Cette altération est généralement invisible. Elle est due à un développement de microorganismes pathogènes produisant des toxines, deux cas peuvent alors se présenter :

- la toxine est excrétée dans le produit (exotoxine). A partir d'une certaine quantité de toxine, le produit est dangereux à consommer même si le microorganisme n'est plus vivant dans le produit. C'est le cas de staphylocoques pathogènes ou de *Clostridium botulinum* ;

- la toxine n'est pas sécrétée mais reste dans les cellules microbiennes (endotoxine). Pour que le produit soit dangereux pour le consommateur, le microorganisme doit être présent et vivant. C'est le cas des entérobactéries par exemple.

Les contrôles microbiologiques permettent donc d'éviter la présence de microorganismes dans les produits afin de ne pas risquer une altération de la qualité hygiénique des produits finis ou au moins détecter ces microorganismes s'ils sont présents dans les produits finis avant leur commercialisation.

#### **2.4. Contrôle de la qualité marchande**

Une altération de la qualité marchande modifie la texture et la qualité organoleptique du produit. Cette altération bien que généralement non dangereuse pour la santé du consommateur, rend le produit non commercialisable. Cette altération survient lorsque la technologie mise en œuvre pour assurer la stabilité microbiologique a été défectueuse. La nature des microorganismes responsables de ces altérations dépend étroitement du type de produit et de la technologie mise en œuvre. Exemple, des levures osmophiles peuvent se développer et donc altérer (gonflement) un produit sucré à faible activité d'eau si ce facteur n'a pas été parfaitement maîtrisé.

L'altération de la qualité marchande se produit généralement lentement au cours du stockage. Les contrôles microbiologiques ont pour objectif de détecter les microorganismes pouvant être responsables de ces altérations, et de vérifier l'efficacité des technologies après leur application afin de stocker et de commercialiser les produits microbiologiquement stables.

La bonne qualité microbiologique (hygiénique et marchande) est fonction de très nombreux facteurs ; le microbiologiste se doit néanmoins de définir le plus rapidement possible la notion quantitative et qualitative de flore normale de son produit ou de ses matières premières (microorganismes «habituels» et tolérables) et d'une flore contaminante dont le seuil de tolérance sera défini en fonction du risque que fait courir cette flore au consommateur.

#### **2.5. Contrôle d'hygiène au niveau des locaux, des équipements et des matières premières dans les ateliers de fabrication (Points de contrôles)**

##### **2.5.1. Qualité microbiologique des aliments**

En vue d'éviter les risques d'accident de fabrication et de situer l'origine de la contamination, tous les éléments entrant dans la chaîne de fabrication du produit doivent être soumis à une analyse microbiologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, ce contrôle concerne :

##### **-La matière première**

La matière première doit être contrôlée avant son entrée à l'usine voire même l'origine de la matière première par exemple les animaux producteurs du lait.

##### **-Les produits**

L'analyse microbiologique a pour but, de déceler et de prévenir les deux types d'altérations, qualité sanitaire et qualité marchande.

**L'analyse du produit fini** a pour but de mettre en évidence les deux types d'altération. Ce sont des analyses réalisées par les laboratoires officiels de contrôle ou par des entreprises. Elles nécessitent l'application des « méthodes normalisées » (ISO, AFNOR... ) et, permettent de vérifier la conformité du produit à des critères.

**L'analyse du produit en cours de fabrication**, il s'agit d'un contrôle de bonnes pratiques de fabrication ou hygiénique, elle a un but préventif où l'utilisation de nombreux guides sont plus sévères que les critères réglementaires. L'analyse microbiologique peut être complète ou partielle en fonction de la demande du client ou du contenu des cahiers des charges.

- **L'eau** utilisée pour le lavage, la transformation ou la formulation des produits. Dans tous les cas, l'eau utilisable en industrie alimentaire doit être obligatoirement potable y compris celle utilisée pour le lavage des locaux, des ustensiles et de la chaîne de fabrication.

La qualité hygiénique dépend aussi du contrôle :

- **des surfaces** des locaux et des ustensiles qui interviennent dans le stockage, la découpe ou tout autre processus de transformation.

- de **l'air** ambiant dans les ateliers de transformation de traitement et des hangars de stockage.

- **du personnel** de l'unité qui intervient depuis la réception de la matière première jusqu'au stockage du produit fini.

- **du matériel** de conditionnement et de l' **emballage**.

### 2.5.2. Catégories de microflores recherchées

Les microflores étudiées doivent refléter la qualité sanitaire et la qualité marchande du produit. La flore totale mésophile aérobie représente un indice du niveau de contamination globale de l'aliment. Si cette flore est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  microorganismes par gramme, il y a risque de voir apparaître très rapidement des détériorations de l'aliment. L'interprétation des résultats de la quantification de la flore totale aérobie mésophile doit tenir compte de son évolution laquelle dépend du mode de conservation et du mode d'utilisation de l'aliment.

La recherche et le dénombrement des **flores d'altération** sont effectués car leur présence est susceptible de modifier la qualité marchande du produit sans qu'il y ait obligatoirement danger pour la santé du consommateur. A cet effet, si le produit en cours de fabrication doit être conservé par réfrigération la flore psychrotrophe doit être dénombrée. En revanche, si le produit doit subir un traitement thermique avant conservation ou utilisation, la flore sporulée thermorésistante fera l'objet du dénombrement.

Pour évaluer **la qualité sanitaire du produit**, il sera réalisé une quantification de microflores indicatrices de **contamination fécale** et une recherche de microflores spécifiques responsables de **toxi-infection**. La présence d'entérobactéries, de coliformes ou de coliformes thermotolérants témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique du produit fini ou en cours de fabrication et peut être l'indice de la présence éventuelle de *Salmonella*.

D'autres microorganismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* ou *Listeria monocytogenes* sont recherchés car leur présence met également directement en jeu la santé du consommateur.

**Les risques de porter atteinte à la santé des consommateurs** et de voir apparaître des altérations de la qualité marchande d'un produit ne surviennent qu'à partir d'une concentration critique en microorganismes. Une évaluation quantitative des microorganismes contaminants est alors nécessaire.

### 2.5.3. Qualité microbiologique des produits cosmétiques

Afin de garantir la qualité d'un produit cosmétique et la sécurité du consommateur, des contrôles microbiologiques réguliers de chaque lot de produit fini avant la commercialisation sont indispensables. Les contaminations peuvent provenir : d'une contamination lors de la production et du remplissage, ce qui impose des tests de contrôle réguliers microbiologiques sur les lots. A partir de l'ouverture de l'emballage par le consommateur, des contaminations microbiologiques sont provoquées en permanence par l'environnement et le consommateur (mains, corps), d'où l'incorporation de conservateurs dans les produits. A cet effet, le contrôle consiste à :

-dénombrer les germes dans le produit

-contrôler la conservation du produit (test de l'efficacité de la conservation). Il s'agit de la numération des germes aérobies totaux, numération champignons (levures et moisissures) et de la recherche de microorganismes spécifiques sur des milieux de culture sélectifs *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les résultats quantitatifs sont comparés avec les valeurs limites.

### 2.5.4. Qualité microbiologique des produits pharmaceutiques

La qualité d'un médicament doit avoir un effet thérapeutique efficace et sans danger pour la santé. Pour des produits stériles : il faudra réaliser un contrôle de stérilisation. Rajoutant aussi le contrôle de l'efficacité de conservation et l'effet des formulations sur cette dernière.

Quant aux produits non obligatoirement stériles, leur qualité doit satisfaire aux critères de pureté microbiologique appropriés inclus dans la monographie de la pharmacopée. Les critères d'acceptabilité de ces produits reposent sur :

- le dénombrement des germes aérobies totaux ;
- la numération champignons (levures et moisissures) ;
- la vérification de l'absence ou la présence de germes pathogènes.

La fabrication de médicaments stériles impose le travail dans des zones d'air stérile. L'eau, utilisée comme excipient ou pour la formulation des produits doit être pure.

### 2.5.5. Contrôle microbiologique de l'hygiène

Afin de permettre et de garantir la qualité des produits, plus particulièrement dans la production stérile (pharmaceutiques et cosmétiques), il est important que la production s'effectue dans un environnement hygiénique. Toute salissure ou contamination croisée dans le cadre de la production doit être exclue afin de garantir la sécurité des patients ou consommateurs.

- Niveaux de contrôle des conditions d'hygiène :

-Environnement des locaux (air surfaces) ;

- Personnel ;
- Objets et matériel de production.

Le nettoyage et la désinfection se font généralement, soit de façon systématique, soit entre deux fabrications successives. Dans les deux cas, le contrôle a pour objectif de vérifier l'efficacité de l'opération du nettoyage et de la désinfection à détruire les microorganismes indésirables.

- **Contrôle de la stérilisation**

La stérilisation doit être contrôlée régulièrement avant, en cours et après sa réalisation. Une fois le cycle de stérilisation achevé, les dispositifs doivent subir un processus de contrôle et validation. Une surveillance attentive du bon déroulement du cycle d'autoclave doit être effectuée par le conducteur d'autoclave. Ensuite, la libération de chaque lot stérilisé fera obligatoirement l'objet d'un contrôle paramétrique très précis et très complet, et d'une traçabilité sur un registre papier ou numérique. Il faudra donc vérifier :

- Le conditionnement : vérifie l'intégrité et l'étanchéité des sachets et emballages.
- l'étiquetage : sur les étiquettes, on vérifie le numéro du stérilisateur, le numéro de lot du cycle, la date de la stérilisation, la date limite d'utilisation.
- L'indicateur coloré : Le virage du test Bowie-Dick (utilisé pour contrôler le bon fonctionnement d'un autoclave à vapeur
- Les enregistrements de la sonde embarquée des paramètres du processus de stérilisation et qui sont comparés à ceux donnés par le stérilisateur.

Toute non-conformité est retournée en zone de conditionnement pour être à nouveau emballée puis restérilisée.

#### **2.5.5.1. Contrôle de la qualité microbiologique de l'air**

Le contrôle microbiologique de l'air est important en milieu industriel les prélèvements peuvent s'effectués par :

- exposition de boîtes de Petri coulées avec un milieu de culture solide. Les boîtes sont exposées à différents endroits surtout ceux exposées aux courants d'air.
- un collecteur d'air qui aspire une quantité d'air donnée puis la projette sur de la gélose et y restent suspendues.
- des plaques de sédimentation permettent de déterminer la quantité d'unités formant colonie qui se dépose sur une surface donnée dans une unité de temps.

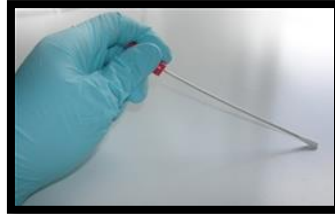
#### **2.5.5.2. Contrôle de la qualité microbiologique des surfaces**

Le contrôle des surfaces permet l'évaluation la qualité microbiologique de la surface des aliments et aussi les surfaces intervenants dans le processus de fabrication du produit. Les plans de travail comme

les tables de découpes, les murs et emballages et autres. Le prélèvement à partir des surfaces peut être effectué par :

➤ **Écouvillonnage**

L'échantillon est directement recueilli sur la surface grâce à l'écouvillon. Un écouvillon stérile dont l'extrémité est préalablement trempée au moment du prélèvement dans une solution stérile de tryptone-sel additionnée de 0,05% de tween 80. Le prélèvement est effectué par frottement du coton tige (écouvillon) sur la surface à analyser (figure 54), puis plongé dans le tube contenant la solution précédente ou de l'eau physiologique en vue de collecter les germes raclés de la surface à analyser. La suspension ainsi réalisée va servir pour l'analyse.



**Figure 54. Écouvillonnage sur une surface**

➤ **Impression**

**Impression sur gélose :** le prélèvement peut être effectué directement par impression sur milieu gélosé ou indirectement par impression à l'aide d'un ruban adhésif.

**-Impression directe sur milieu gélosé en boîtes :** cette méthode nécessite les boîtes de Petri dont le couvercle est plus haut que la partie destinée à contenir la gélose. Cette partie coulée. Les boîtes de Petri stériles coulées à ras bord de milieu de culture sont appliquées sur la surface à étudier.

**-Plaqués gélosés :** elles sont utilisées en industries agro-alimentaires, hygiène hospitalière, laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques, collectivités, restauration (H.A.C.C.P.), hygiène des textiles. Pour contrôler l'état de désinfection des surfaces de travail, du matériel, des mains et des vêtements (figure 55).



**Figure 55. Lames gélosées**

Les lames gélosées sont utilisées par contact, en appliquant (10 secondes à pression constante figure 2) l'une des faces de la lame sur la surface à analyser, puis retourner cette lame pour appliquer l'autre face sur une autre surface proche de la première, l'ensemble (bouchon + lame) et ensuite revissé puis incubé à l'étuve. La lecture des résultats se fait après incubation de cette lame (voir l'exemple pour la flore totale, Figure 56).

**Ces lames peuvent être utilisées par immersion** où l'ensemble (bouchon + lame) sera pris par le bouchon afin d'imprégner la lame quelques secondes dans l'échantillon à analyser, puis la suite de la procédure est la même que la précédente.

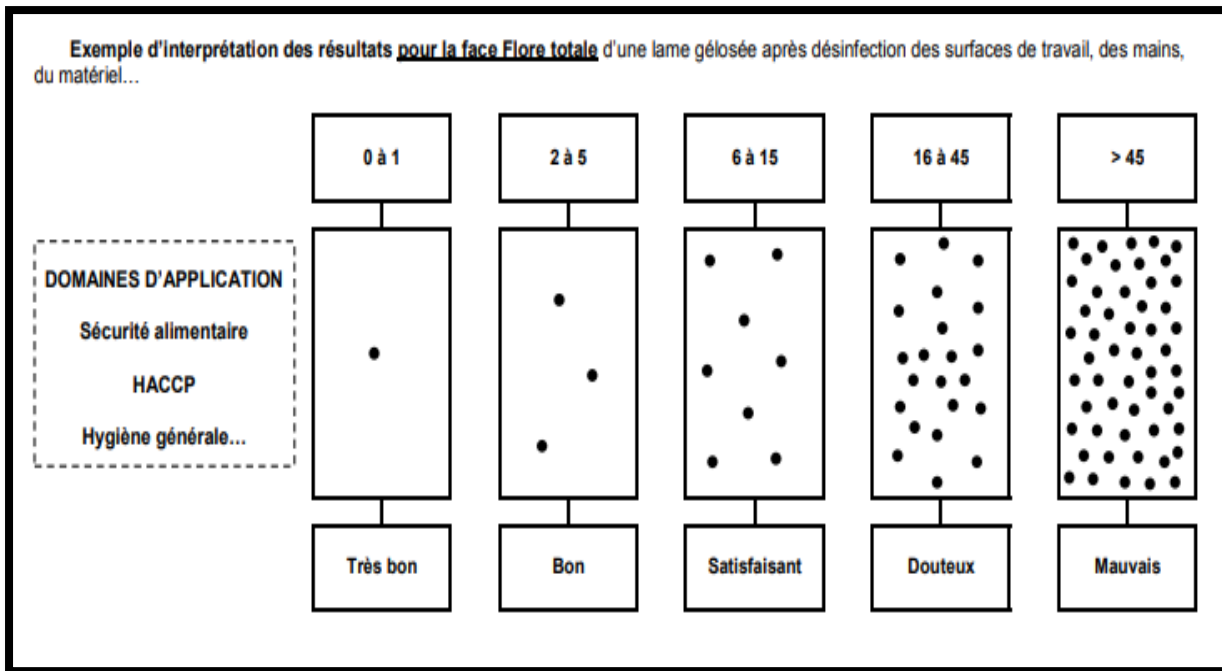


Figure 56. Interprétation d'un résultat sur lame gélosé

**Le Petrifilm (figure 57) :** c'est un double film dont la partie inférieure contient un milieu déshydraté et le film supérieur quadrillé contient un gel hydrosoluble. Le milieu se réhydrate par l'échantillon, ses dilutions décimales ou par un diluant approprié pour les contrôles de surfaces.

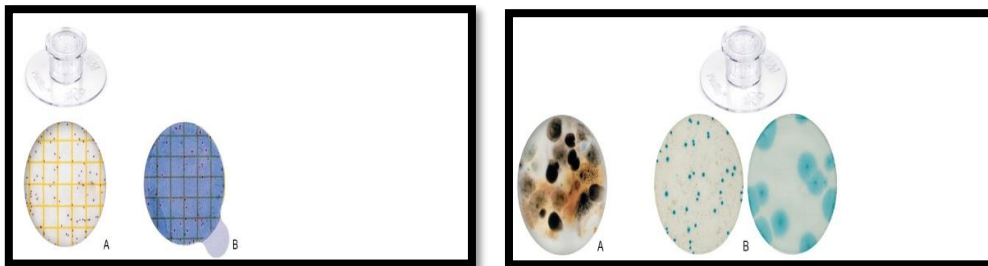


Figure 57. Pétrifilm pour bactéries à gauche et pour levures et moisissures à droite

- **Impression indirecte sur ruban adhésif :** le ruban adhésif stérilisé aux UV est appliqué sur la surface à étudier de façon à ce qu'il adhère parfaitement. Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée, il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies. Cette méthode est préconisée pour les mains et les surfaces rugueuses.
- **Le rinçage :** il consiste à recueillir un échantillon en rinçant la surface, il est particulièrement adapté pour les surfaces difficiles d'accès, par exemple dans les tuyauteries ou les appareils anguleux.
- **Coulage de milieu gélosé :** une gélose en surfusion à 45° C est introduite dans le récipient à étudier, bouteille par exemple, puis reparti uniformément par des mouvements de rotation du récipient selon un axe horizontale sous un courant d'eau froide après solidification, le récipient est incubé en l'état.

## 2.6. Prélèvement des échantillons solide pour l'analyse microbiologique

Le prélèvement aseptique est obligatoire pour tous les échantillons à analyser. Il consiste à empêcher toute contamination du matériel d'échantillonnage, des échantillons et de l'équipement soumis à l'échantillonnage

Selon le produit, le prélèvement sera effectué au scalpel, à la sonde (fromage et produits mous). La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plat cuisiné, conserves, ect), il faudra s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

### -Cas particuliers

Pour l'évaluation de la flore profonde (viandes de boucherie et salaisons) la flore de surface doit être éliminée par stérilisation puis un bloc d'échantillon (5 à 10 cm) est prélevé. Concernant les denrées congelées des trous à l'aide d'une perceuse (mèche de 14mm) sont effectués puis les copeaux seront rassemblés dans un sac stérile.

## 2.7. Transport et conservation des prélèvements

Des précautions permettant la stabilisation qualitative et quantitative de la flore présente au moment du prélèvement doivent être prises soigneusement. Le temps entre les prélèvements et le traitement doit être aussi court que possible, c'est-à-dire un transport et un stockage rapides. La conservation doit se faire à basse température, pendant toute la durée du stockage ultérieur. Un produit déshydraté ou en conserve, ne doit pas être réfrigéré. Concernant un produit congelé, il faut s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport. Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à  $-18^{\circ}\text{C}$ , transporter ce produit à cette température et décongeler à l'air ambiant à température voisine de  $20^{\circ}\text{C}$  pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permettra le prélèvement.

## 2.8. Préparation et traitement de l'échantillon pour l'analyse

A partir d'un prélèvement stérile, un certain nombre d'opérations vont permettre la préparation du produit en vue de l'analyse proprement dite : c'est le traitement de l'échantillon (figure 58). La suspension mère obtenue correspond à une dilution du produit. Les analyses sont effectuées sur la suspension mère ou sur ses dilutions et peuvent consister en :

- des dénombrements : évaluation quantitative des populations contaminantes ;
- des recherches : mise en évidence d'un microorganisme dans une quantité de produit déterminée, le plus souvent, c'est une bactérie responsable d'intoxication alimentaire qui est recherchée et identifiée.

L'ensemble de la démarche est présenté dans la figure 59.

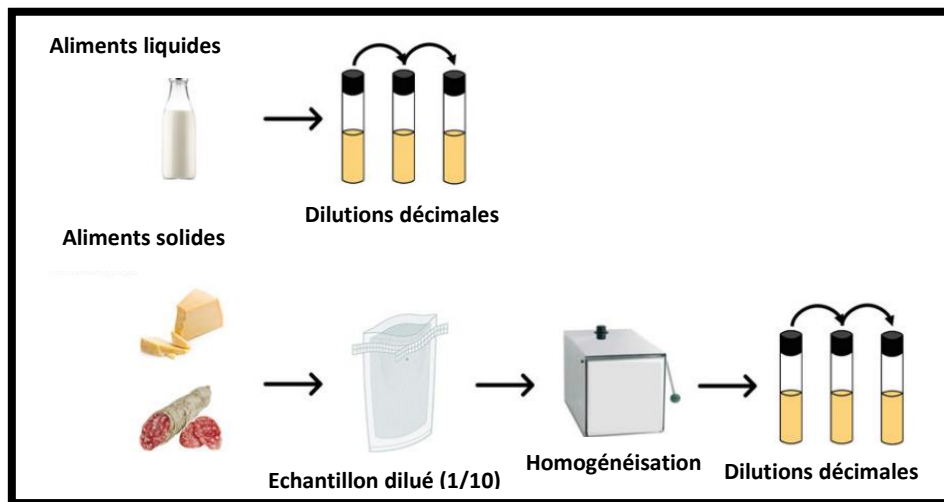
L'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera homogénéisé quand il s'agit d'un liquide ou broyé dans un volume connu de diluant stérile lorsque qu'il est solide, ce qui constitue la 1<sup>ère</sup> dilution.

Pour les produits liquides (ou semi-liquides), une agitation manuelle vigoureuse (ou en présence de billes de verre) ou au vortex permet d'obtenir une homogénéisation satisfaisante.

Quant aux produits solides, ceux-ci peuvent être broyés au moyen de broyeurs électriques à couteaux de type virtis. Les germes doivent être dispersés mais non détruits, de plus la température ne doit pas

trop s'élevée. En générale le broyage s'effectue avec 9 volumes de diluant pour 1 volume de produit ( par exemple 10g de produit et 90 ml, ou 100 de diluant stérile).

Le diluant peut être de l'eau distillée, de l'eau physiologique, de la solution de ringer au  $\frac{1}{4}$ , une solution tryptone-sel.....les récipients doivent être stérilisés. Des Broyeurs à palettes, types Stomacher permettent de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant. Ces appareils utilisent des sacs plastiques stériles à usage unique (figure 60).



**Figure 58. Préparation d'un échantillon pour l'analyse microbiologique**

Les avantages du malaxage par Stomacher par rapport au broyage sont les suivants :

- l'échantillon n'est pas chauffé pendant le broyage, ce qui entraîne une diminution de la létalité ;
  - en vue de tests futurs, il est possible de conserver la suspension mère ainsi réalisée dans le sac plastique et de la congeler ;
  - réaliser des suspensions de 40 à 400 mL.

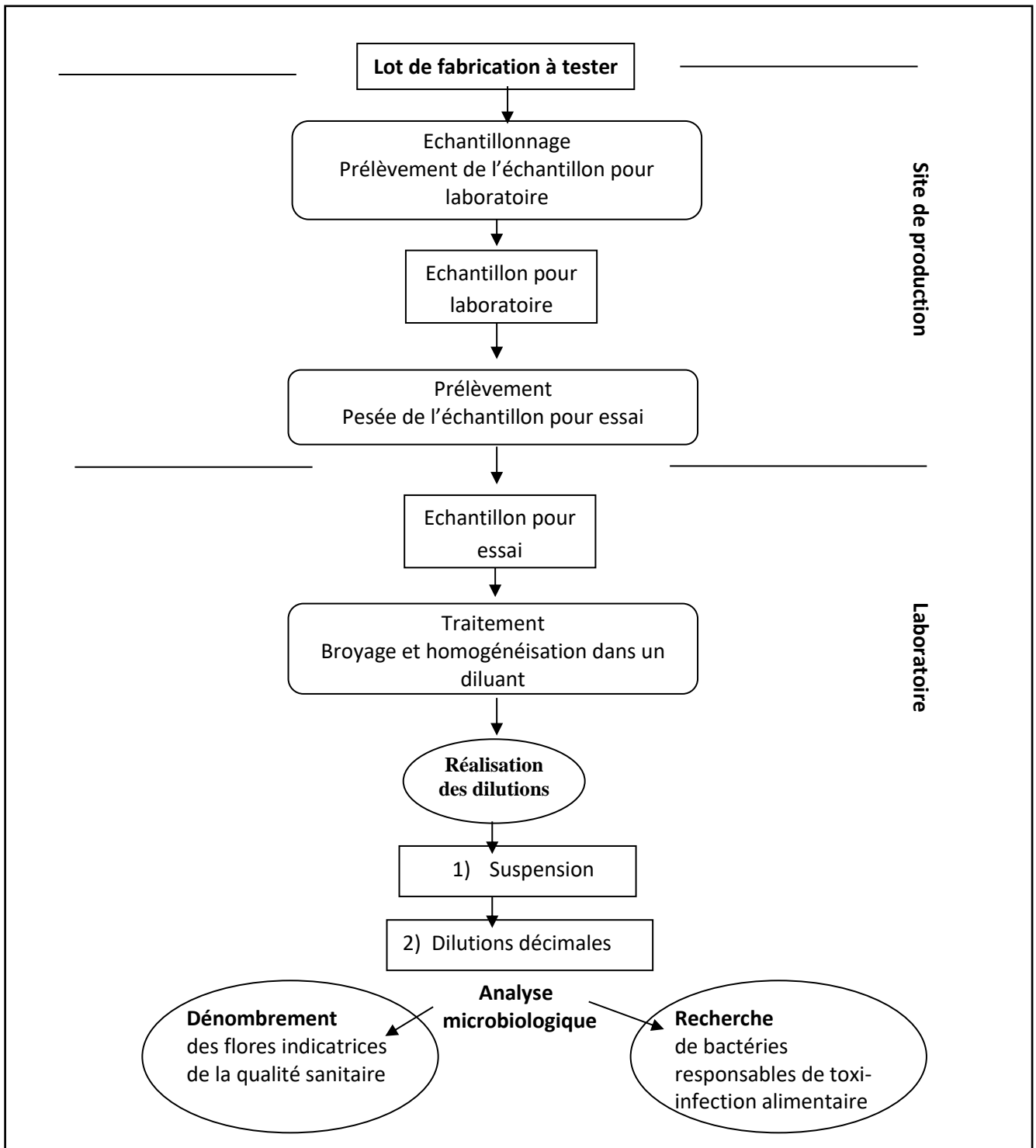


Figure 59. Contrôle microbiologique d'un produit fini

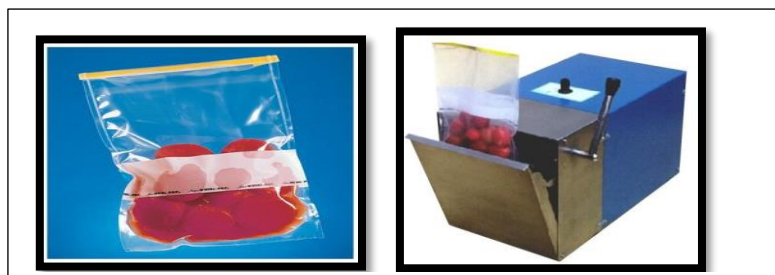


Figure 60. Stomacher et sac pour échantillon

### 2.8.1. La revivification

Suite à des traitements technologiques appliqués aux produits alimentaires (déshydratation, chaleur, froid, etc.) ou encore à leur vieillissement, les micro-organismes se retrouvent souvent «endommagés» mais non tués. Ces altérations se reflètent dans certaines de leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaries, colorants, sels, etc.). Ces altérations sont en générale réversibles et après leur disparition les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, en particulier au niveau de leur croissance ou de leur pouvoir pathogène. La présence de cellules en mauvais état physiologique dans un échantillon peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu'il n'y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non. La nécessité de promouvoir le «rétablissement» des cellules ayant subi des altérations sublétales, c'est-à-dire leur revivification, est importante avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance en raison de la présence d'inhibiteurs.

### 2.8.2. Enrichissement ou concentration

Etant donné que les germes pathogènes sont des germes fragiles et qu'ils sont les plus souvent retrouvés en faible nombre dans les produits alimentaires, il est donc important d'augmenter les chances de leur détection. Ceci peut être effectué par la concentration par centrifugation ou par filtration d'un volume connue. Cette méthode convient aux produits liquides comme le lait et l'eau. L'enrichissement consiste à mettre en contact l'échantillon avec un milieu de culture qui va favoriser la croissance du germe recherché et augmenter son nombre. Contrairement à la concentration, l'enrichissement est une opération qui modifie le nombre initial de germes.

Un pré-enrichissement sur un milieu peu sélectif qui est un milieu électif, permet la revivification des germes en mauvais état physiologique.

## 2.9. Méthodes de contrôle

Les méthodes de contrôles usuelles peuvent être divisées en deux catégories :

- (1) Techniques microbiologiques de culture qui sont longues, coûteuses, et demandent un délai de réponse très important.
- (2) Techniques microscopiques (état frais, coloration simple : de bleu de méthylène et double de Gram) qui sont simples, rapides, et de faible coût. Toutefois, la sensibilité de ces derniers n'étant pas toujours suffisante, donc il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par les techniques microbiologiques de culture dites classiques.

### 2.9.1. Techniques d'examen microscopique : état frais et colorations usuelles

L'examen microscopique est le plus souvent réalisé sur le prélèvement brut. Il s'effectue à l'état frais et/ou sur des frottis colorés. Les résultats de cette étude ne sont pas très fiables mais pour leur rapidité, ils peuvent être utiles pour :

- l'estimation de la flore totale (viable ou morte si des colorants vitaux sont utilisés comme le bleu méthylène ) ou de la charge microbienne initiale d'un aliment ;

- mettre en évidence des contaminants dans la flore de fabrication par exemple présence de bactéries dans le ferment constitué de levure ou de bactéries Gram- dans les ferments lactiques.
- le dénombrement direct des levures à l'aide d'un hématimètre (exemple, la cellule de Malassez ;
- la recherche présomptive du bacille tuberculeux par la méthode de Ziehl-Nielson.
- L'étude cytologique du lait pour la détermination de la formule leucocytaire pour avoir une idée sur l'état sanitaire de l'animal dont provient le lait.
- la recherche de parasites : elle permet de mettre en évidence les protozoaires (Toxoplasme, amibes) les nématodes (Ascaris) et les cestodes (Taenia) par la préparation de frottis colorés.

### a. Coloration de Gram

La coloration de Gram (le premier test à réaliser) permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : celles à paroi type Gram+ (qui retiennent le violet de gentiane) et celles à paroi type Gram- (qui prennent la couleur de la safranine après lavage par l'alcool).

Cette méthode est basée sur la structure et la composition de la paroi. Les lipides assez forts chez les Gram- que les Gram+, sont extraits par l'action de l'alcool entraînant, ensuite, une augmentation de la perméabilité et l'extraction du complexe violet de gentiane-iode, ceci lui permettant de prendre la couleur de la safranine (fuschine).

Ce test permet de bien distinguer les bactéries selon leurs formes en deux grands groupes : cocci et bacille, et il fournit de précieuses informations en ce qui concerne le mode de groupement qui peut être en : diplocoques, chainettes, tétrades, amas, et palissades. Cependant, même sans ce type de coloration, à l'état frais la forme, le groupement et la mobilité pouvons être observés.

### b. Coloration de Ziehl-Neelsen (*acid-fast stain*)

La coloration de Ziehl-Neelsen est spécialement désignée pour les mycobactéries qui sont caractérisées par leur aptitude à ne pas être décolorées par les acides dilués et l'alcool, après avoir été colorées par la safranine ou la fuchsine. Ils sont dits bacilles acido-alcool-résistants, exemple : *Mycobacterium tuberculosis*, qui apparaît rose- rouge, souvent parlé et légèrement incurvée.

### c. Coloration de la capsule

La présence d'une capsule est révélée par la coloration à l'encre de Chine, sa mise en évidence est un indice important pour identifier les microorganismes en deux groupes : les capsulés et ceux acapsulés, exemple : des diplocoques Gram+ entourés d'une capsule importante, ceci évoque *Streptococcus pneumoniae*.

### d. Coloration des endospores (sporulation)

La sporulation permet de diviser les bactéries en deux groupes : sporulées et asporulées, ce test est réalisé soit par coloration au vert de malachite solution à 5 %, soit tout simplement par essai de culture après pasteurisation. La position de la spore permet l'identification des bactéries en groupes à l'intérieur de la même famille.

## 2.9.2. Techniques de dénombrement ou de numération

### 2.9.2.1. Dénombrement direct des cellules, la cyométrie

Toutes ces méthodes de cytométrie requièrent de travailler sur un échantillon représentatif de la suspension, obtenu par prélèvement après homogénéisation, éventuellement sur plusieurs échantillons si une grande précision est recherchée. La finalité de ces méthodes est de mesurer certaines

caractéristiques des cellules vivantes ou mortes et également de les dénombrer. La cytométrie permet, en particulier, de dénombrer les levures et les bactéries présentes dans une suspension. La cytométrie fait appel à divers types de matériel : les modalités de présentation des cellules à dénombrer changent selon les méthodes ainsi que les systèmes de récupération et d'analyse de l'information. La présentation des cellules peut se faire :

- sur lame (microscopie classique) ;
- sur filtre (cytométrie sur filtre ou CSF) ;
- en tube capillaire (cytométrie en flux ou CMF).

Compte tenu de la taille microscopique des cellules, il est toujours nécessaire d'effectuer un grossissement à l'aide d'un microscope optique pour pouvoir les observer et les dénombrer. Il est possible de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par utilisation d'un fluorochrome et l'analyse par un microscope à épifluorescence.

### 2.9.2.2. Les cellules de numération

#### a) Principe

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. Le résultat de la numération est exprimé en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre ou par ml. La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération).

#### b) Dilution préalable

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable. En effet, lorsque la suspension est trop concentrée (grand nombre de cellules par unité de volume), il est difficile, voire même impossible de réaliser le comptage des cellules.

#### c) Utilisation de la cellule de numération

Il existe deux grands types principaux de cellules de numération :

- Cellule de Thoma.
- Cellule de Malassez (la plus courante).

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage (figure 61).

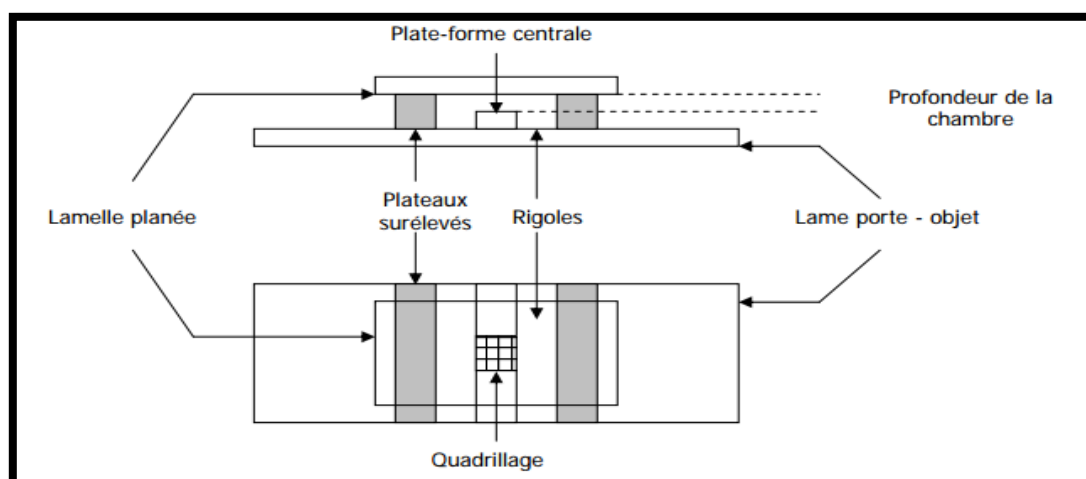


Figure 61. Schéma représentant une cellule de numération

Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Les cellules doivent sédimenter sur le quadrillage quelques minutes, avant de passer à la numération.

#### d) Démarche à suivre pour la numération

- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer) ;
- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ) ;
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, il faut compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite (figure 62).

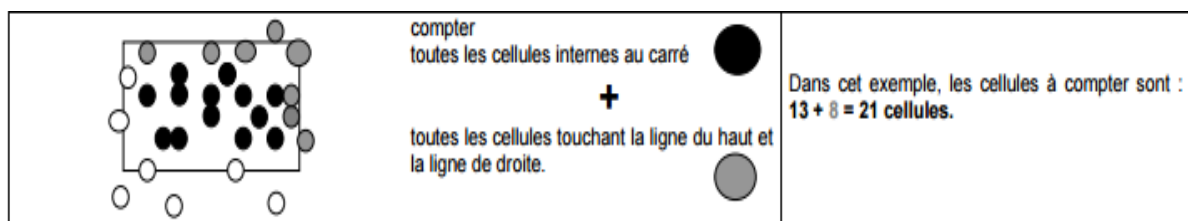


Figure 62. Méthode de dénombrement des cellule chevauchantes sur cellule de Malassez

#### e) Présentation de la cellule de Thomas

C'est une lame de verre épais portant sur sa partie supérieure un réseau de lignes gravées perpendiculairement et qui délimite à leur croisement 16 x 16 petits carrés de 1/20 mm de côté. Il existe 16 grands carrés et chaque carré comporte 16 petits carrés (figure 63).

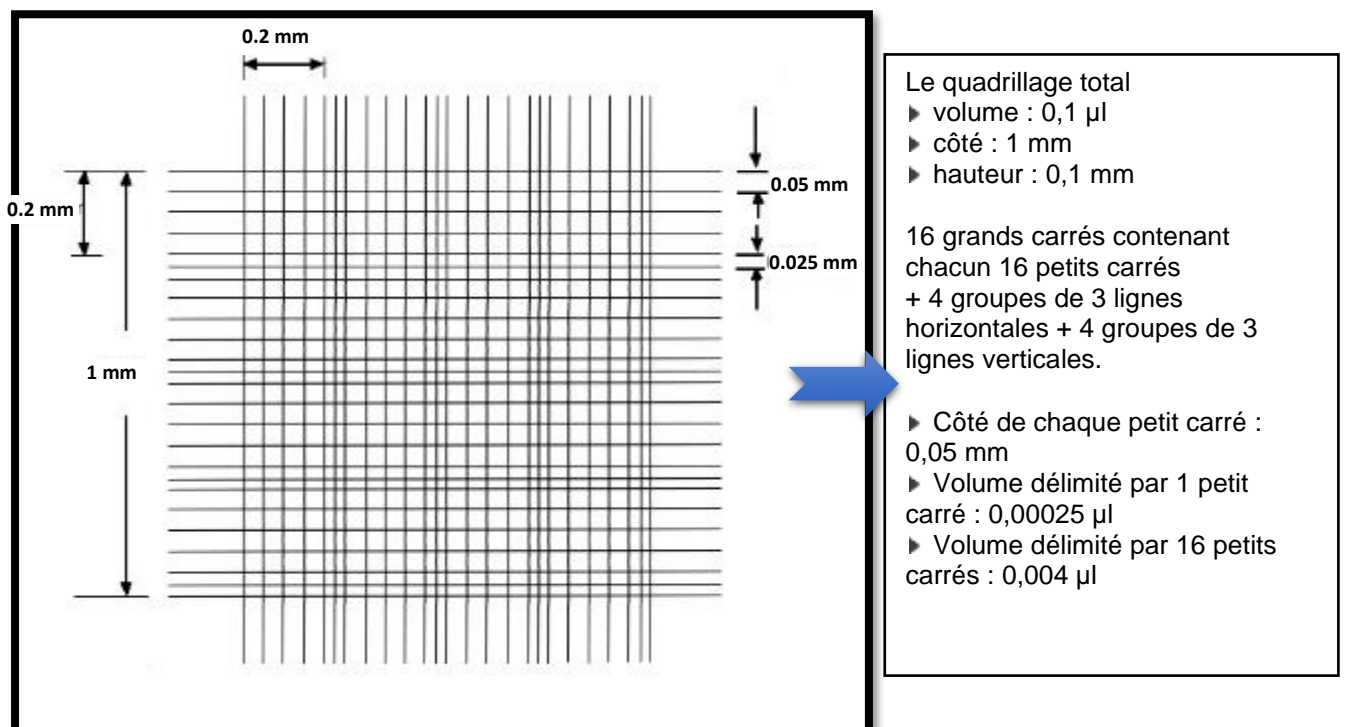


Figure 63. Présentation de la cellule de Thomas

Une goutte de suspension diluée et bien homogénéisée est déposée sur la lame puis recouverte d'une lamelle. On dénombre 10 grands carrés en fer à cheval ou en diagonale.

#### f). Présentation de la cellule (ou hématimètre) de Malassez

La cellule de Malassez (figure 64) est utilisée pour le comptage de cellules (animales, végétales, fongiques et bactériennes) en suspension dans un liquide (à l'origine, pour le comptage des cellules sanguines, d'où son nom), l'hématimètre de Malassez est une épaisse lame de verre creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes :

- deux plates-formes latérales surélevées qui supportent une lamelle en verre, épaisse et plane : la lamelle hématimétrique ;
- une plate-forme centrale légèrement abaissée sur laquelle est gravé un quadrillage ;
- Entre la lamelle et la plate-forme centrale est créée une cavité qui recevra la suspension ;
- La distance (lamelle/plate-forme) définit la profondeur ( $P$ ) connue de l'hématimètre ;
- Le quadrillage de la plate-forme centrale a une surface précise et connue ( $S$ ) ;
- Le volume ( $V$ ) de suspension dans lequel les cellules sont comptées est donc :  $V = p \times S$

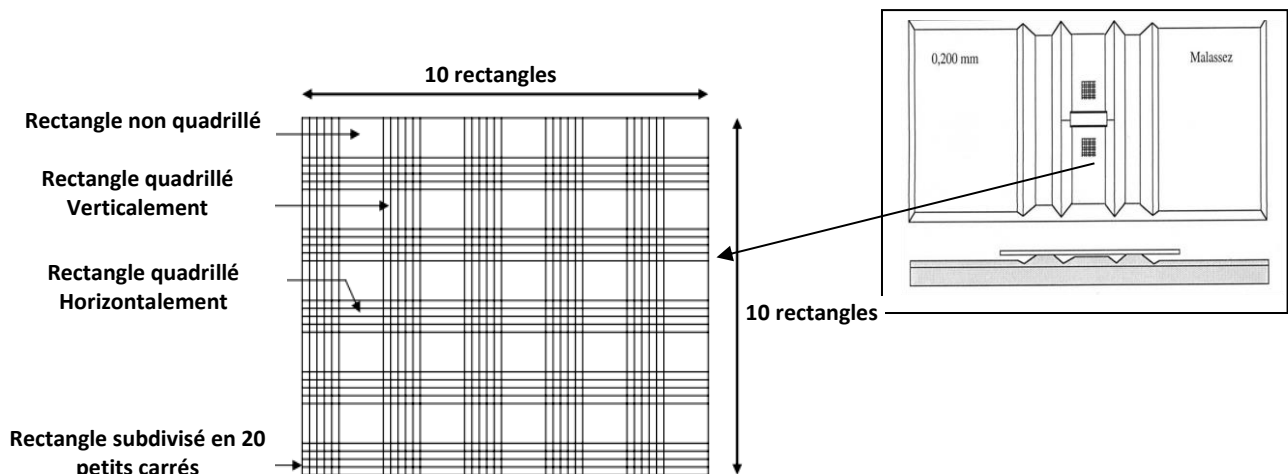


Figure 64. Présentation de la cellule de Malassez

Elle comporte 100 unités rectangulaires, avec une profondeur de 0.2mm, une surface de  $2.5 \times 2 = 5 \text{ mm}^2$  et un volume de  $0.2 \times 5 = 1 \text{ mm}^3$  ( $1 \mu\text{l}$ ). Une unité rectangulaire comporte un volume de  $0.01 \mu\text{l}$  et le quadrillage total de la cellule a un volume de  $1 \mu\text{l}$ .

Il existe 100 rectangles d'égales surfaces :

- 25 rectangles divisés en 20 petits carrés
- 25 claires
- 50 divisés (lignes horizontales)

Il est à noter que l'exposition à la source de lumière du microscope provoque un échauffement menant à une évaporation du liquide contenu dans la chambre hématimétrique. Le volume de celle-ci étant très faible, le comptage doit être rapide, sans quoi la diminution du volume va entraîner une erreur importante du comptage.

### g) Démarche pour le comptage

- **Cellule de Malassez**

-Compter le nombre de cellules (N) dans 10 petits rectangles (sur deux diagonales) ;

-Calculer le nombre moyen de cellules n sur un des 10 rectangles :  $n = N/10$  ;

Le volume du petit rectangle est de  $0.01\mu\text{l}$  ;

-Calculer le nombre de cellules sur toute la cellule (100 petits rectangles formant le grand rectangle), donc un volume total de  $1\mu\text{l}$  ( $0.01\mu\text{l} \times 100$ ) puis rapporter en ml de la suspension.

Le nombre de cellules est donc de  $n \times 100 \times 10^3 \text{ ml} = n \times 10^5$

- **Cellule de Thomas**

-Compter le nombre de cellules dans 10 grands carrés en fer à cheval ;

-N est le nombre de cellules dans 10 grand carrés donc  $16 \times 10$  petits carrés ;

-n représente le nombre de cellule dans un petit carré :  $n = N/160$  ;

-le volume d'un petit carré est de  $\frac{1}{4} \times 10^6 \text{ ml}$  ;

-Le nombre  $n = N/160$  cellules  $\longrightarrow$  est contenu dans  $\frac{1}{4} \times 10^6 \text{ ml}$

$X^*$  cellule ?  $\longrightarrow$  est contenu dans 1 ml

$X^*$  nombre de cellules par ml =  $n \times 4 \times 10^6$

Il ne faut pas oublier de multiplier le résultat par l'inverse de la dilution exemple : la dilution de la suspension était de  $10^{-8}$  alors :  $X$  nombre de cellules par ml =  $n \times 4 \times 10^6 \times 10^8$

### 2.9.2.3. Méthode par cytométrie sur filtre (CSF) et observation par épifluorescence DEFT (*Direct Epifluorescent filter technique*)

- **La microscopie par épifluorescence (DEFT : Direct Epifluorescent Filter Technique)**

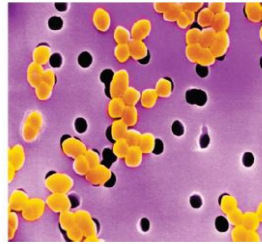
Après filtration du produit sur membrane, le comptage direct des microorganismes vivants et morts est réalisable par coloration de cette membrane par l'acridine orange puis l'observation au microscope à épifluorescence. L'acridine orange étant un intercalant des acides nucléiques avec lesquels il forme des complexes fluorescents verts (ADN) ou orange (ARN).

Dans le cas du lait, cette méthode consiste à filtrer 2 ml de lait (traité par une enzyme protéolytique et un surfactant) sur une membrane filtrante en polycarbonate. Après filtration et rinçage, cette membrane est colorée à l'orange d'acridine, lavée à l'acide critique, transparisée à l'isopropanol puis observée à l'immersion, les bactéries actives sont colorées en orange alors que les bactéries inactives sont colorées en vert.

- **Filtration sur membrane en polycarbonate**

Comme pour les méthodes de dénombrement après culture, il est possible de tester un grand volume d'échantillon afin d'améliorer la sensibilité et de pouvoir détecter des faibles concentrations en microorganismes. Contrairement aux membranes en acétate de cellulose ou 50 % des bactéries pénètrent dans son épaisseur, sur la membrane en polycarbonate, toutes les bactéries sont retenues à la surface. De plus, la taille des pores est beaucoup plus régulière et ces derniers se situent tous dans

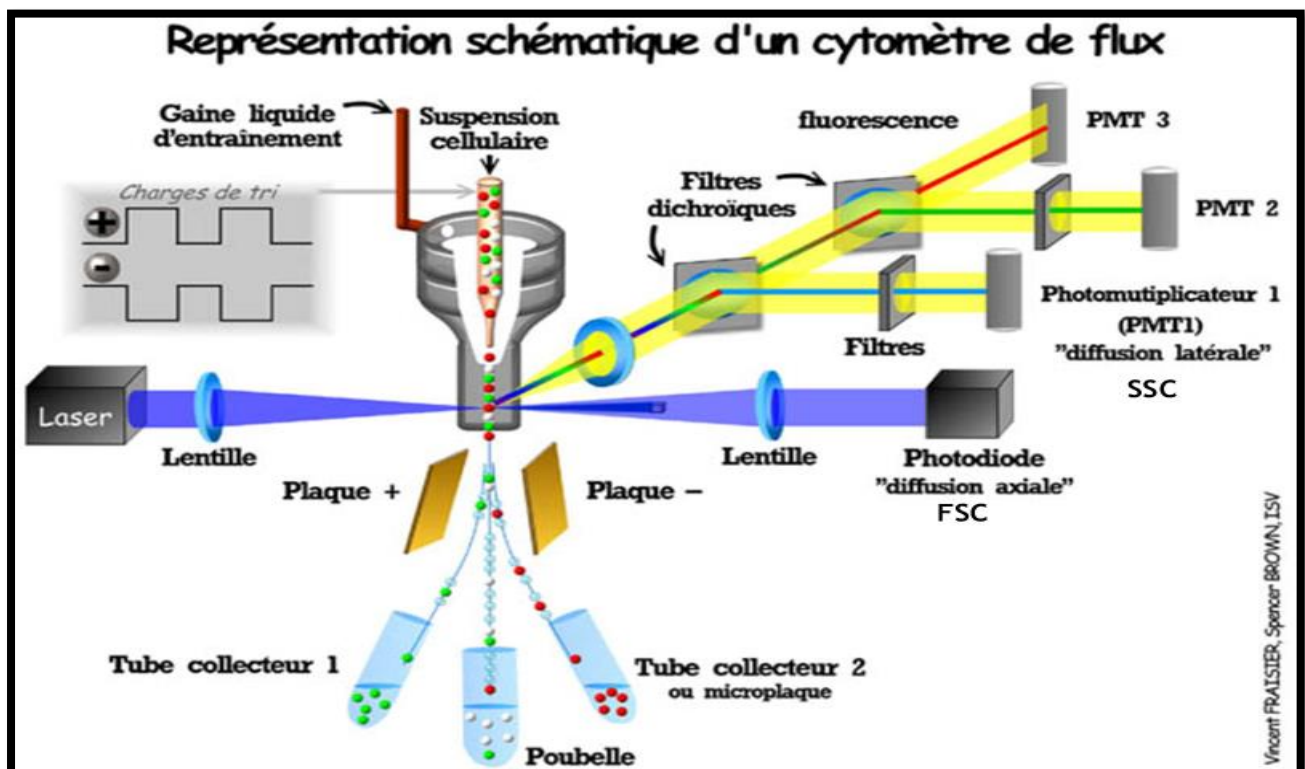
un même plan. Il est relativement aisé d'observer au microscope les bactéries retenues à la surface de ces membranes, car ces bactéries se trouvent toutes sur le même plan focal (figure 65).



**Figure 65. *Enterococcus faecalis* retenues sur membrane filtrante en polycarbonate de 0.4µ pores (x5.900)**

#### 2.9.2.4. Cytométrie en flux (CMF)

C'est une méthode récente et rapide de dénombrement et d'analyse d'échantillons. Elle permet de dénombrer bactéries et levures. Il est possible d'évaluer en parallèle leur degré de viabilité par l'utilisation de marqueurs fluorescents ou de substrats de viabilité devenant fluorescents lorsqu'ils sont métabolisés dans la cellule. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence reflète l'état physiologique des cellules. Il existe plusieurs types de réactifs, adaptés aux bactéries et aux levures. Cette analyse du signal (l'intensité de fluorescence) permet d'éviter les faux positifs. Cette méthode fait appel à un appareil complexe : le cytomètre en flux (figure 66).



**Figure 66. Principe du cymomètre en flux**

L'échantillon à analyser est traité pour l'extraction et le marquage fluorescent des microorganismes recherchés. Ces échantillons, entraînés par un flux liquide, passent devant une source lumineuse ; ils émettent alors une lumière fluorescente qui, transmise par l'objectif d'un microscope, peut être captée

par un photomultiplicateur. Il est aussi possible d'observer à l'œil la cellule de mesure à l'aide d'un oculaire. Un système de filtres et de miroirs permet de passer simplement de l'un à l'autre.

Cet appareil est composé de trois systèmes :

➤ Le système **fluidique**

Le produit est injecté au centre d'un liquide vecteur, le liquide de gaine. Ce liquide non miscible, très visqueux transporte le produit jusqu'à la cellule de mesure.

➤ Le système **optique**

Dans la cellule de mesure, l'échantillon est soumis à un faisceau lumineux excitateur produit par une lampe à vapeur de mercure. Les cellules défilent individuellement les unes derrière les autres et émettent à une longueur d'onde différente de la longueur d'excitation. Cette lumière est captée par un photomultiplicateur ou transmise à l'oculaire si le filtre dichroïque est en position miroir total.

➤ Le système **électronique** : les signaux électriques issus du photomultiplicateur sont ensuite analysés, quantifiés et classés par un ordinateur qui rend le résultat sous forme d'un histogramme représentant la répartition des cellules dans la population en fonction de leur intensité de fluorescence. On peut alors vérifier l'homogénéité de l'ensemble et juger de la viabilité. L'aire du pic donne le nombre de cellules total pour un volume qui correspond au défilement du liquide avec un certain débit pendant un temps donné.

• **Applications**

- marqueurs de viabilité des cellules : ce sont des substrats non fluorescents qui, après avoir traversé la membrane, libèrent sous l'action d'une enzyme active du métabolisme cellulaire un composé fluorescent qui reste dans le cytoplasme. Ces substrats fluorogènes enzymatiques doivent être adaptés aux microorganismes recherchés, ils ne colorent que des cellules vivantes ;

- marqueurs spécifiques de la population que l'on souhaite dénombrer (par exemple : flore totale, coliformes, levures). Ce sont alors des anticorps monoclonaux ou des sondes nucléiques.

Cette technique est utilisée pour le dénombrement des cellules somatiques dans le lait, ainsi que pour le dénombrement et le tri de la flore spécifique du yaourt à l'aide des sondes spécifiques.

Actuellement, cette gamme propose d'analyser la viabilité de ferments lactiques pour vérifier la qualité avant ensemencement mais aussi l'évolution au cours de sa conservation et, enfin, le suivi de fermentation lors de son utilisation.

Une autre application possible est la détection rapide des microorganismes dans les jus de fruits ou préparation de fruits, contaminés fréquemment par des levures. Le gain de temps obtenu par de cette méthode permet la mise en place d'un contrôle rapide, notamment en cours de fabrication, autorisant des actions correctives immédiates mises en place par un système HACCP ou un contrôle de la qualité des matières premières.

### 2.9.2.5. Évaluation de l'activité globale

• **Impédancemétrie**

Les méthodes classiques de dénombrement posent souvent à l'industriel des contraintes qui ne sont plus compatibles avec les performances de la production. Il est important d'avoir le résultat rapidement d'un contrôle de la qualité des matières premières afin de pouvoir libérer en toute sécurité les stocks de produits finis. A cet effet, des méthodes basées sur la mesure d'un signal lié à la présence ou à l'activité de microorganismes ont été développées. Le temps d'incubation étant court, elles raccourcissent ainsi les délais du contrôle indispensable dans le « process » de fabrication. L'impédancemétrie mesure, au cours de la croissance microbienne dans un milieu nutritif, une baisse de l'impédance par rapport au même milieu dépourvu de germes.

- **Dosage de l'ATP, l'ATP métrie**

Il s'agit d'une méthode rapide permettant à l'industriel de diminuer le délai de réponse des contrôles microbiologiques, ceci afin d'être efficace et pouvoir :

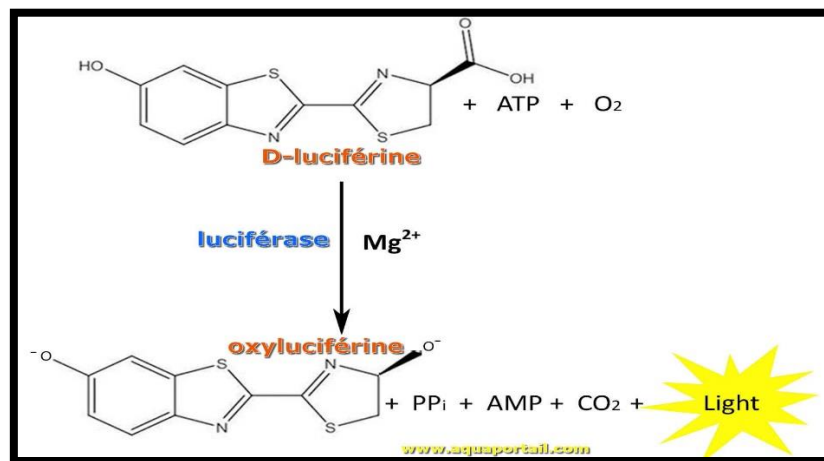
- intervenir au cours d'un « process » et éviter ainsi la fabrication de produits non conformes ;
- suivre une activité métabolique ;
- accepter ou refuser un lot très rapidement ;
- vérifier la conformité de l'hygiène des installations.

L'ATP (adénosine 5 triphosphate) est en relation directe avec l'activité de la cellule. La concentration en ATP intracellulaire est variable selon les types de cellules, étant donné leur capacités métaboliques différentes ainsi que la diversité de leurs tailles. La production d'ATP est arrêtée lors de la mort cellulaire et l'ATP qui préexistait est dégradé rapidement par les enzymes hydrolytiques (ATPases).

**-Principe du dosage**

Il existe diverses méthodes pour doser l'ATP, mais la technique de bioluminescence est la plus rapide, d'une grande sensibilité et relativement précise. Cette technique originale exploite la capacité qu'ont certains organismes vivants (poissons, méduses, lucioles, photobactéries) à émettre de la lumière de diverses couleurs, mettant en jeu une réaction enzymatique différente. En présence de  $Mg^{2+}$ , d'ATP et d'oxygène, la luciférine est oxydée sous l'action de la luciférase en oxyluciférine avec production de lumière. Le mécanisme de la réaction in vitro peut être présenté en deux étapes :

- activation de la luciférine LH, avec formation de luciféryl-adénylate et libération de pyrophosphate.
- oxydation de ce complexe en présence d'oxygène donnant l'oxyluciférine dans un état excité, avec décarboxylation. Le retour à l'état électronique stable de l'oxyluciférine s'accompagne d'une émission de lumière (figure 67)



**Figure 67. Oxydation de la luciférine sous l'action de la luciférase en oxyluciférine avec production de lumière**

### 2.9.2.6. Dénombrement indirect sur un milieu solide (estimation de la flore viable)

L'analyse microbiologique des aliments a pour objectif de contrôler : la qualité marchande des denrées alimentaires et la qualité hygiénique. Le but du dénombrement est de déterminer le nombre de microorganismes appartenant à un ensemble donné dans un volume donné soit en milieu liquide, soit en milieu solide. Les méthodes bactériologiques vont permettre de dénombrer certes, mais aussi de rechercher et identifier tous les microorganismes. Pour cela une étude quantitative de la flore est nécessaire :

-soit par un dénombrement de la flore totale (revivifiable)

-soit par un dénombrement d'un groupe bactérien correspondant à une contamination déterminée.

Il en est de même d'une recherche orientée comme les bactéries pathogènes. Cette technique repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou la surface d'un milieu gélosé favorable donne naissance à une colonie visible à l'œil nu, après incubation (figure 68). Le nombre de colonies correspond au nombre d'unités formant colonies (UFC) présent dans l'inoculum.

### a) Dilution de l'inoculum

Il s'agit de réaliser à partir de l'inoculum ou de la suspension mère de bactéries ou levures, une série de dilution décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ...), pour cela, des tubes de 9 ml d'eau physiologique stérile sont utilisés. Un (01) ml de chaque dilution est reporté de tube en tube (figure 68)

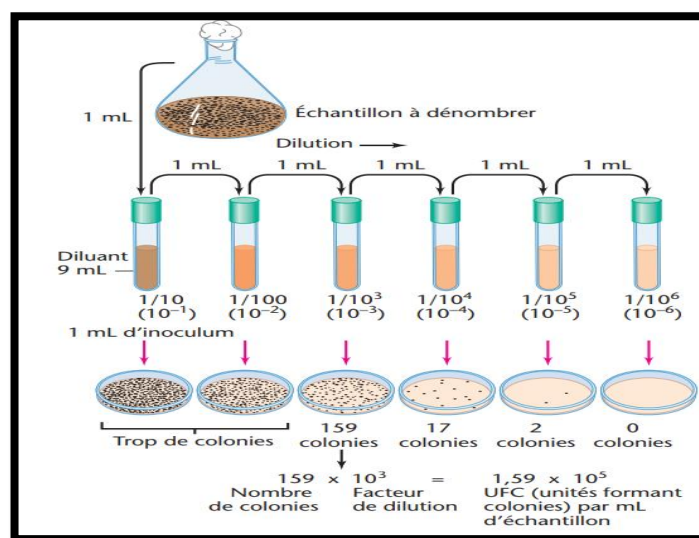
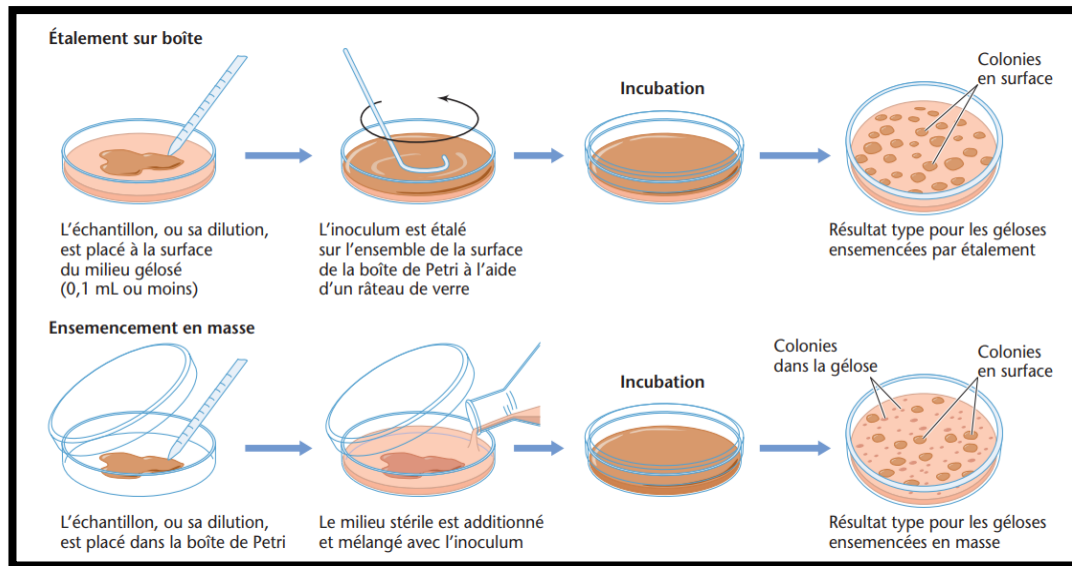


Figure 68. Réalisation des dilutions décimales à partir d'une suspension mère

### b) Ensemencement (figure 69)

- Culture dans la masse d'un milieu gélosé (incorporation)

Un volume de 1 mL de chaque dilution est déposé stérilement dans les boîtes de Pétri. Généralement 02 boîtes de Pétri par dilution sont ensemencées. Ensuite, sont versée dans chaque boîte de Pétri, environ 15 ml de milieu gélosé, maintenu en surfusion à  $45^{\circ}\text{C}$  au bain-marie. Une homogénéisation de la répartition des cellules dans la gélose est assurée en appliquant à chaque boîte de Pétri fermée, 06 mouvements circulaires de 150mm de diamètre environ, dans le sens des aiguilles d'une montre, puis 06 autres mouvements circulaires en sens inverse. Ensuite sont effectués 06 mouvements aller-retour de haut en bas et 06 autres de gauche à droite. Après refroidissement les boîtes sont incubées renversées. La température et la durée d'incubation varient selon le type germe à dénombrer.



**Figure 69. Dénombrement des cellules viables.**

- **Dénombrement en surface du milieu gélosé**

Il faut utiliser des boîtes préalablement coulées en milieu gélosé puis correctement séchées. Puis déposer à la surface du milieu gélosé, un volume connu, 0.1 mL par exemple. Ce volume peut être pipeter à l'aide d'une pipette graduée ou mieux, une pipette automatique. Il est ensuite réparti uniformément à la surface du milieu à l'aide d'un râteau. Après incubation, dénombrer les colonies qui se sont développées à la surface de la gélose.

Pour le dénombrement, il ne faut tenir compte que des boîtes de Pétri dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 (en surface et dans la masse).

Il faut effectuer la moyenne des 02 essais réalisés avec la même dilution puis multiplier le nombre obtenu par l'inverse de la dilution.

Pour éviter le développement de colonies en surface, il est possible d'utiliser la technique de la double couche de gélose.

- **Dénombrement par culture en profondeur d'un milieu gélosé**

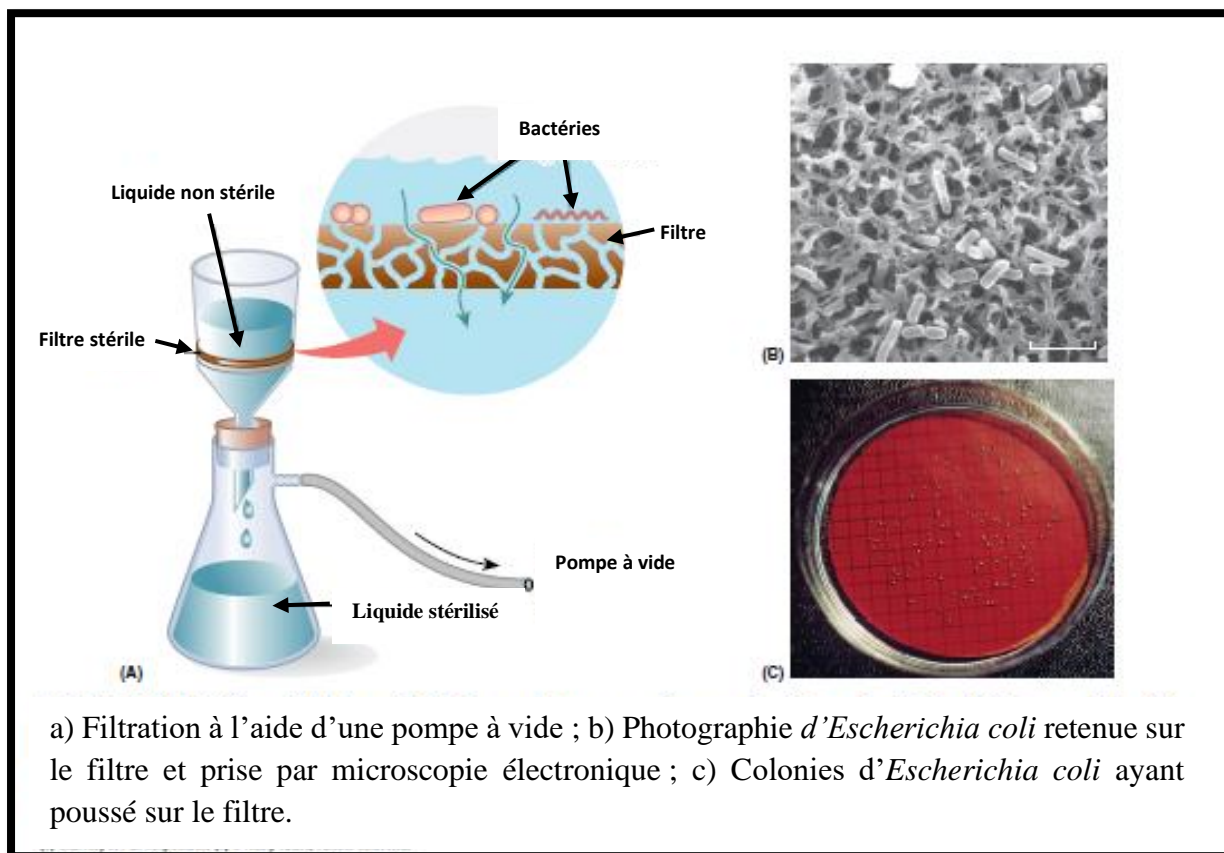
Cette méthodologie est utilisée pour les microorganismes anaérobies stricts ou pour des microorganismes à métabolisme fermentaire dont le développement est favorisé par l'anaérobiose. Elle est également pratiquée lorsque doivent être dénombrées dans un produit les spores de microorganismes anaérobies stricts. Cette méthode peut être appliquée la recherche et le dénombrement des bactéries d'anaérobiose des bactéries sulfito-réductrices, elles forment en anaérobiose, des colonies caractéristiques noires.

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. Les spores sont plus résistantes que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de déceler une pollution fécale ancienne ou intermittente et ce sont également des germes telluriques. Les formes végétatives sont d'abord détruites par chauffage à 80 °C, ensuite on procède à l'incorporation de l'échantillon à un milieu de base fondu (gélose viande-foie) additionné de sulfite de sodium et de sels de fer. L'incorporation se fait dans un tube afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air. De l'huile de vaseline est ajoutée en surface. Après solidification et

incubation, la présence de germes sulfito-réducteurs se traduit par un halo noir autour des colonies. La méthode utilise comme révélateur l'action réductrice du sulfite ou du bisulfite et des sels de fer. La présence des spores de bactéries sulfito-réductrices, entraîne la formation de sulfure de fer qui colore uniformément en noir les milieux liquides.

- **Dénombrement sur membrane filtrante**

Il consiste à faire passer un certain volume d'échantillon (liquide) à travers une membrane filtrante (millipore de diamètre connu) sur laquelle se trouvent donc retenues les bactéries recherchées. Le filtre est ensuite posé sur le milieu de culture gélosé pré-coulé spécifique pour le microorganisme. Après incubation à la température et, au temps convenable : les colonies sont dénombrées sur le filtre (figure 70).



**Figure 70.** Les bases de la filtration sur membrane.

Cette méthode à plusieurs avantages :

- utilisation d'un volume plus important d'échantillon d'où, une plus grande précision,
- une meilleure numération des bactéries,
- une identification plus facile des différentes espèces,
- Les méthodes d'analyse par filtration se prêtent très bien à l'analyse de l'eau, en particulier quand sa charge microbienne est très faible.

### 2.9.2.7. Numération, après une phase de multiplication, en milieu liquide

#### - Méthode de dénombrement des micro-organismes en milieu liquide (Méthode dite du nombre le plus probable, NPP).

La méthode NPP est très utilisée en contrôle microbiologique des aliments surtout pour le dénombrement des coliformes et des streptocoques. Elle permet d'étudier un caractère difficilement mis en évidence sur milieu solide comme la production d'un gaz. En utilisant des milieux peu sélectifs (présomption), elle permet d'effectuer un dénombrement avec une phase de réanimation, c'est-à-dire que le milieu est favorable pour le développement même des germes en mauvais état physiologique. Les tubes positifs sont alors repiqués sur un milieu plus sélectif (confirmation).

##### ➤ Principe générale

Les prises d'essais de l'échantillon ou de ses dilutions sont incorporées dans un milieu de culture liquide conçu pour permettre la croissance d'un micro-organisme ou de groupe de microorganismes. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble du milieu et, éventuellement, une modification visible (virage d'un indicateur de pH coloré). Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués de manière parfaitement aléatoire. L'estimation de la densité bactérienne est obtenue par application du principe de vraisemblance, à partir de réponses positives observées pour une ou plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne originelle dans des milieux de cultures liquides.

##### ➤ Protocole expérimental d'une dilution successive de facteur 10

La dilution  $10^{-2}$  sera effectuée en prenant 1mL de la dilution  $10^{-1}$  préalablement homogénéisée (vortex) qui sera ensuite introduit dans un tube contenant 9 mL de diluant. L'utilisation d'un tube par dilution entraîne une forte incertitude que des méthodes statistiques tentent de pallier par des essais multiples (2 ou 3 tubes par dilution). La seule manière de savoir si un micro-organisme est présent ou non dans l'inoculum par les techniques en milieu liquide sera de le mettre en évidence par un de ses caractères : trouble et production de gaz par exemple en bouillon lactose bile au vert brillant. Les tableau 2 et 3 présentent des exemples de résultats.

**Tableau 2. Exemple de résultats de culture sur milieu liquide**

Volume de l'inoculum : 1mL	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultat	+	+	+	+	-	-

D'après le tableau 1, Il y a au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^{-3}$ , on peut donc en déduire qu'il y a au moins  $10^3$  micro-organismes mais moins de  $10^4$  micro-organismes dans 1mL de produit pur.

**Tableau 3. Résultat de culture sur milieu liquide avec des essais multiples (3 tubes par dilution)**

Dilution	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultats	+++	+++	+++	++-	---	---
Chiffre égal à la somme des tubes positifs	3	3	3	2	1	0

Pour l'interprétation statistique des résultats de la méthode du NPP on utilise la table de Mac Grady (tableau 4). Il existe d'autres tables pour d'autres nombres de dilutions. Dans la ligne "chiffre égal à la somme des tubes positifs", choisir le nombre à 3 chiffres le plus grand possible et inférieur à 330 (meilleure répartition dans les dilutions). Se reporter à la table de Mac Grady pour 3 tubes de dilution afin de trouver le NPP correspondant au nombre 320, dans le cas de l'exemple (tableau 3), le NPP est de 15. Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution  $10^{-2}$  mL. Pour en déduire la concentration ou le nombre (N) en micro-organismes par mL de produit pur il faut utiliser cette formule :

$$N = \text{NPP} / V \text{ inoculum} * Fd$$

NPP= nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady

V inoculum= 1 mL

Fd c'est le facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique  $10^{-2}$

Dans cet exemple  $N = 15 / 0,01 = 15 \cdot 10^2$  micro-organismes par mL

**Tableau 4. Tables de Mac Grady pour 2 et 3 tubes de dilution**

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

Tableau 5. Tables de Mac Grady pour 5 tubes de dilution

5 tubes par dilution							
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

## 2.10. Méthodes de conservation des aliments

Il existe beaucoup de méthodes de conservation des aliments. Elles permettent soit d'éliminer totalement les micro-organismes, soit de ralentir fortement leur développement en les privant d'un élément qui leur est essentiel. Dans les deux cas, des dates (calculées à partir de normes) indiquent à partir de quand l'aliment présente un risque alimentaire, ou n'a plus un goût ou une qualité nutritive optimale.

### 2.10.1. La conservation par le froid

Il existe plusieurs techniques permettant de limiter le développement des bactéries.

#### a) La réfrigération

La réfrigération consiste à abaisser la température entre 0°C (pour les denrées les plus périssables : charcuterie, crèmes, desserts lactés...) à 10°C (pour les œufs, le beurre, les fruits, les liquides...). A de basses températures les bactéries et levures présentes dans les aliments seront privées de l'énergie qui constitue un élément important pour leur croissance, les bactéries continuent alors de se multiplier lentement étant donné que les métabolismes cellulaires sont ralentis. Ainsi les aliments peuvent être laissés dans le réfrigérateur pendant quelques jours.

#### b) La congélation

La congélation consiste à abaisser la température (-18°C en moyenne) d'un aliment de manière à ce que l'eau qu'il contient passe à l'état solide. En plus d'être privées d'énergie, les microorganismes sont également privés d'une grande partie d'eau qui est sous forme de cristaux de glace. La non disponibilité de cette eau pour les réactions biochimiques inhibe fortement les activités microbiennes. La cristallisation de l'eau est lente lors de la congélation car la diminution de la température est assez lente. L'eau contenue dans les cellules se transforme en gros cristaux susceptibles de faire éclater la membrane des cellules, d'où une altération de la texture et de la saveur des aliments.

#### c) La surgélation

La température de la denrée est abaissée très rapidement jusqu'à -18°C d'une manière homogène avec une vitesse de cristallisation de l'eau très rapide. Grâce à cette diminution rapide de la température de

minuscules cristaux se forment dans les cellules, ainsi ces dernières sont préservées de la destruction et la texture et la saveur sont aussi conservées.

### **2.10.2. La conservation par la chaleur**

Le traitement des aliments par la chaleur est très utilisé. Bien plus qu'inhibitrice du développement des bactéries, elle est destructrice de ces dernières.

#### **a) La Pasteurisation**

Cette technique consiste à soumettre le produit à des températures un peu inférieures à 100°C (en général 70 à 80°C selon les bactéries) puis à le refroidir rapidement. Une grande partie des bactéries est détruite par la chaleur importante. Cependant quelques-unes ayant résisté sous forme de spores demeurent présentes. La procédure est de ne pas chauffer à des températures trop élevées pour éviter la dénaturation totale des protéines et l'altération des arômes et de la qualité gustative du produit. Enfin, il est important de réfrigérer (à environ 4°C) le produit pasteurisé afin d'éviter la multiplication des bactéries qui n'auraient pas été détruites. Bien que la pasteurisation n'élimine pas la totalité des germes, elle permet tout de même une conservation plus longue de l'aliment. Ce dernier a donc une Date Limite de Consommation (DLC).

#### **b) La stérilisation**

La stérilisation est une technique visant à éliminer toute forme microbienne vivante, y compris les spores, grâce à des températures supérieures à 100°C (120°C en moyenne). Ces températures sont beaucoup plus élevées que pour la pasteurisation, la valeur nutritive et le goût du produit sont donc susceptibles d'être altérés. Il est alors important de choisir un traitement adapté selon la sensibilité du produit. Comme un produit stérile est exempt de germes, il n'a pas de DLC mais une Date Limite d'Utilisation Optimale (DLUO) (allant de quelques mois à plusieurs années). Au-delà de cette date, le produit ne constitue pas un danger pour le consommateur, cependant, les qualités gustatives et nutritionnelles ne sont plus assurées.

#### **c) Le traitement UHT**

Le traitement à UHT (« ultra haute température ») est une méthode de conservation consistant à chauffer instantanément le produit à une température très élevée (en général 140 à 150°C) pendant 1 à 5 secondes, puis à le refroidir tout aussi rapidement. Ce procédé, qui est une stérilisation, tue tous les micro-organismes. Ce du traitement étant de courte durée, il permet de n'altérer que faiblement le goût et la valeur nutritive du produit. Le lait est le principal produit qui est conservé par un traitement à UHT. Après l'emballage, sa DLUO est de trois mois.

#### **d) Tyndallisation**

Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant sérum, œuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration. C'est une méthode de stérilisation qui repose sur des chauffages discontinus à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas), suivis de refroidissements. On admet qu'au cours de ces périodes de chauffage discontinu, les bactéries perdent leur aptitude à sporuler. La tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1 heure, à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, permettant ainsi la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive.

### **2.10.2. Conservation sous atmosphère contrôlée**

#### **a) Conditionnement sous vide**

Afin d'éviter l'oxydation de la denrée ainsi que la croissance microbienne, la denrée est placée sous vide, ce qui permet de réduire considérablement la quantité d'air (oxygène) présent autour de celle-ci.

Les microorganismes se trouvant dans l'aliment se trouvent privées de dioxygène et ne parviennent plus à se développer normalement excepter pour quelques bactéries pouvant se développer sans oxygène.

#### **b) Conditionnement sous atmosphère modifiée**

Les aliments sont placés dans un emballage où l'air est remplacé par un gaz (ou mélange gazeux), ensuite ils sont emballés puis stockés à basse température. Le niveau d'oxygène étant réduit et celui de l'humidité maintenu, la croissance microbienne est inhibée. Le gaz ou mélange gazeux utilisé dépend du type de produit.

Le fait de ne laisser que très peu de dioxygène empêche le développement normal des bactéries. Cependant cette petite quantité est nécessaire pour que les cellules de l'aliment puissent respirer. Les 10 % de dioxyde de carbone jouent un rôle important. Lorsque ce gaz pénètre dans les cellules de l'aliment, il est partiellement transformé en acide carbonique qui est un bactéricide doux, il participe donc à l'élimination d'une partie des bactéries. Enfin, cette atmosphère est complétée par un gaz inerte, le diazote.

### **2.10.4. Conservation par élimination de l'eau, déshydratation.**

#### **a) Déshydratation et séchage**

Cette technique consiste à éliminer partiellement ou totalement l'eau contenue dans un aliment. L'eau n'est alors plus disponible pour les bactéries qui ne parviennent plus à proliférer. Par exemple, en séchant les fruits, on peut les conserver plus longtemps.

#### **b) Lyophilisation**

Le principe de ce procédé est de congeler un produit puis de le placer sous vide. Ainsi, l'eau qu'il contient passe rapidement de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide, c'est la sublimation. Cette élimination rapide de l'eau permet de bien conserver les saveurs, arômes et qualités nutritives. En absence totale de l'eau, aucune prolifération microbienne n'est possible. Le produit retrouve quasiment sa texture d'origine suite à une réhydratation. Cette méthode coûte cependant plus cher qu'un séchage ou une déshydratation.

#### **c) Le salage**

Le salage consiste à soumettre l'aliment à l'action du sel, soit en le recouvrant directement de sel (salage à sec), soit en le plongeant dans une solution salée (saumurage). C'est une technique surtout utilisée pour la conservation de la charcuterie et des poissons. Lorsque les ions salins (Cl et Na<sup>+</sup>) pénètrent dans un tissu (viande, poisson), ils vont se séparer et se lier chacun avec des molécules d'eau, avec lesquelles ils ont une forte affinité. Les molécules d'eau contenues dans le poisson seront donc fortement attirées par les ions et ne seront plus disponible pour les bactéries. Ces dernières étant privées d'eau, elles ne pourront plus se développer normalement.

### **2.10.5. Fumage ou fumaison**

Les aliments sont soumis à l'action des composés gazeux (fumée dégagée par la combustion de végétaux). Les viandes et les poissons sont conservés grâce à l'action combinée de la déshydratation et des agents antiseptiques contenus dans la fumée.

**2.10.6. Ajout de sucre, d'alcool ou de vinaigre**

Pour réduire leur activité de l'eau ( $A_w$ ), certains aliments (confiture, confiserie) sont additionnés de sucre (plongés dans un sirop de sucre). D'autres aliments sont préparés dans du vinaigre (cornichons).

**2.10.7. Conservation par additifs alimentaires**

Les additifs alimentaires (agents chimiques, acide ascorbique, nitrates ou nitrites) sont utilisés afin d'assurer aussi bien l'innocuité de l'aliment (inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes et de la production de toxines) que la stabilité organoleptique de l'aliment (inhibition des microorganismes d'altération).

**2.10.8. Conservation par fermentation**

La fermentation est réalisée par des microorganismes appropriés (bactéries lactiques ou levures). Ces derniers produisent des substances antimicrobiennes (acides organiques, bactériocines...) protégeant les aliments contre l'altération microbienne. La conservation par fermentation permet d'améliorer les qualités organoleptiques et nutritionnelles des matières alimentaires (yaourts, fromages, saucisson, pain etc.).

**2.10.9. Conservation par ionisation**

La conservation par ionisation (ou irradiation) consiste à exposer les produits alimentaires à l'action de rayonnements ionisants électromagnétiques (rayons gamma). Elle s'effectue par élimination des organismes pathogènes et d'altération : bactéries, champignons, insectes. Cette technique permet de retarder la germination et la maturation des produits végétaux (oignon, blé, fruits).

**2.10.10. Conservation par hautes pressions (Pascalisation)**

La pascalisation consiste à exposer certains aliments (jus de fruits, confitures, gelées, etc.) à des pressions élevées (100 à 500 MPa - 5 à 20 min) réduisant le nombre de microorganismes et l'activité de certaines enzymes dans les aliments traités.

**2.10.11. Conservation par microfiltration (stérilisation à froid)**

La microfiltration des aliments s'effectue à travers des membranes poreuses qui retiennent les microorganismes contenus dans les aliments à conserver.

**2.10.12. Biopréservation**

C'est une méthode biologique qui repose sur l'utilisation des souches bactériennes à action inhibitrice (compétition nutritionnelle et/ou production de métabolites inhibiteurs) dans les produits alimentaires à conserver. L'activité prédominante de ces souches permet la maîtrise de la croissance des microorganismes pathogènes et d'altération dans les aliments (produits de mer, produits carnés et laitiers).

## Références bibliographiques

- Audigié, C. I., Dupont, G., Zonszain, F. (1999).** Principes des Méthodes d'Analyse Biochimique, Tome 1. Bioscience et Techniques, France.
- Baird, R. et Hogjes, N. A. Denyer, S P (2005).** Handbook of microbiological quality control Pharmaceuticals and Medical Devices. Taylor & Francis e-Library
- Burgot, G et Burgot, G-L. (2011).** Méthodes Instrumentales d'Analyses chimiques et Applications. Techniques et Documentations, 3ème Edition, Lavoisier, Paris.
- Bonnefore, C. Guillet, F., Leyral, G., et Verne-Bourdais, E. (2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaire. Biosciences et Techniques, France.
- **Voet, D. et Voet J. G. (2005).** Biochimie, Edition Deboeck, Bruxelles.
- **Voet, D. et Voet J. G. (2011).** Biochemistry. Deboeck 4<sup>ème</sup> édition. Bruxelles. ISBN 13 978-0470-57095-1
- Friedrich ,Lottspeich and Joachim, Engels (2018).** Bioanalytics Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany
- **Tomasello, F. (2023).** Methods of Inoculation and Quantification for Collecting Data on Microbial Responses in Foods in Basic Protocols in Predictive Food Microbiology. ISBN 978-1-0716-3413-4 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3413-4>
- Sin, J-P. (2003).** Séparation et analyse de biomolécules, ellipses édition.Paris France.
- **Guiraud, J-P. (2003).** Microbiologie Alimentaire, Edition Dunod, Paris.
- Madigan, Bender, Buckley, Sattley, Stahl (2019).** Brock Biology of Microorganisms. 10<sup>ème</sup> édition. Pearson Education, UK.
- Pommerville, J. C. (2018).** Fundamentals of microbiology. 11<sup>ème</sup> édition, Burlington : Jones & Bartlett.
- Rouessac, A., Rouessac, F. Cruché, D., Duverger-Arfulso, C., Martel, A. (2004).** Analyse Chimique: Méthodes et technique instrumentales modernes. 7ème Ed. Dunod, Paris.
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. (2003).** Principes d'Analyse Instrumentale. Ed. De Book, Université, Bruxelles, Belgique.
- Steve, G. (2016).** Cours La chromatographie et l'électrophorèse : Chapitre 4.(disponible sur le lien [www.medatice-grenoble.fr](http://www.medatice-grenoble.fr))
- Stephen P. Denyer and Rosamund M. Baird (2007).** Monitoring Microbiological Quality: Application of Rapid Microbiological Methods to Pharmaceuticals in Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices second edition
- Amrouche, T. (2018).** Biochimie. Qualité et conservation des aliments, book, éditions européennes
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L. (2019).** Microbiology. 13<sup>ème</sup> édition, Boston: Pearson.
- Voet D. et Voet J. G. (2000).** Biochimie. 2ème Ed. De Book.
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M., Wolverton C. J. (2014).** Prescott's Microbiology. 9<sup>ème</sup> édition, New York: McGraw-Hill.

### Liens internet

- <https://accs.ens-lyon.fr/accs/logiciels/applications/winmdi/cytometr.htm>. (d'après olivier CLATRICE et Spencer BROWN, ISV, CNRS, Gif sur Yvette)
- [pharmacomedicale.org/pharmacologie/dosage-des-medicaments-suivi-therapeutique](http://pharmacomedicale.org/pharmacologie/dosage-des-medicaments-suivi-therapeutique)
- [pharmacologique/41-principes-des-methodes-de-dosage-notion-de-sensibilite-et-precision](http://pharmacologique/41-principes-des-methodes-de-dosage-notion-de-sensibilite-et-precision)
- <https://biotechnologies.enseigne.ac-lyon.fr/spip/spip.php?article237>

## **Références bibliographiques**

-<http://biotechnologie.over-blog.com/2014/11/methode-de-denombrement-des-micro-organismes-en-milieu-liquide-methode-dite-du-nombre-le-plus-probable.html>

-<https://www.fishersci.fr/shop/products/choice-ptfe-hydrophilic-syringe-filters/p-8650047>