

N° d'ordre : 2558

# THÈSE

PRÉSENTÉE À

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES ET  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par **Issam SEBTI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPECIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS

-----  
Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de  
cette bactériocine en gel d'agarose  
-----

Soutenue publiquement le 27 septembre 2002

Après avis de :

MM. Andrée Voilley,	Professeur ENSBANA, Université de Bourgogne	<b>Rapporteurs</b>
M J.B. MILLIERE,	Professeur ENSAIA, Université de Nancy	

Devant la commission d'examen formée de :

M B. DE JESO	Professeur, Université de Bordeaux 1	<b>Président</b>
M J.B. MILLIERE	Professeur ENSAIA, Université de Nancy	<b>Rapporteur</b>
Mme A. VOILLEY	Professeur ENSBANA, Université de Bourgogne	<b>Rapporteur</b>
Mme D. BLANC	MdC INSA, Université de Lyon 1	<b>Examineur</b>
Mme V. COMA	MdC, Université de Bordeaux 1	<b>Co-directeur</b>
M A. DESCHAMPS	Professeur, Université de Bordeaux 1	<b>Co-directeur</b>



« Aliment bien emballé tient les bactéries éloignées »  
Monique

## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans trois laboratoires de recherche dont l'Unité Sécurité Microbiologique des Aliments (USMA) et le Laboratoire de Chimie des Substances Végétales (LCSV) de l'université Bordeaux 1 et le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire (LRGIA) de l'IUT génie biologique de l'université Lyon 1.

Je remercie tout d'abord les professeurs Andrée Voilley de l'Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation et Jean Bernard Millière de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le professeur Bernard De Jeso de l'université de Bordeaux 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'avoir également présidé mon jury de thèse.

Je remercie également le professeur Alain Déschamps (directeur de l'USMA et co-directeur de thèse) et le professeur Alain Castellan (directeur du LCSV) de m'avoir permis de travailler au sein de leurs laboratoires, et d'avoir mis à ma disposition les moyens administratifs et techniques nécessaires pour réaliser efficacement ce travail.

Je remercie particulièrement la région Rhône-Alpes d'avoir assuré mon salaire de thèse et d'avoir supporté financièrement l'ensemble de ce projet de recherche.

Je remercie profondément madame Frédérique Ham-Pichavant et monsieur Patric Pardon du RACIO-Institut du pin pour leur soutien au niveau de la fabrication des films, de leur analyse par infra-rouge et par analyse thermique différentielle et pour leur aide précieuse tant à l'interprétation des résultats qu'à la correction de mon manuscrit de thèse.

Je remercie monsieur Abdessatar Hadj-Sassi, maître de conférences à l'université Bordeaux 1, pour son aide au niveau de l'étude des interactions protéines-lipides.

J'adresse mes vifs remerciements à monsieur Rémi Saurel, maître de conférences à l'IUT génie biologique de Bourg en Bresse, pour avoir suivi de près ce travail de thèse et pour m'avoir initié au génie des procédés et au transfert matière. Je le remercie pour son aide tant à l'interprétation des résultats qu'à la correction de mon manuscrit de thèse.

Je remercie madame Denise Blanc, anciennement maître de conférence à l'IUT génie biologique à Bourg en Bresse et aujourd'hui titulaire à l'INSA de Lyon, pour avoir coordonné à Bourg en Bresse les travaux sur la mise au point des études de diffusion et de leur traitement informatique. Je la remercie pour son aide précieuse tant à l'interprétation des résultats qu'à la correction de mon manuscrit de thèse.

Comment remercier madame Véronique Coma, maître de conférences à l'université Bordeaux 1 et co-directrice de ma thèse, dont la relation est passé rapidement de directrice-doctorant, à collègues de travail pour finir à amis. Je la remercie professionnellement pour sa rigueur scientifique, sa brillance intellectuelle, ses interprétations décisives, son encouragement à rédiger les publications scientifiques et humainement pour son sourire et sa joie de vivre. J'étais fier d'être son doctorant et j'envie ceux qui seront ses futurs thésards.

Mes remerciements se seraient pas complets si je ne précise pas que ce travail n'a pu avancer aussi loin que grâce à l'aide précieuse et à la pertinence de nombreux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer.

Ces remerciements n'oublient pas tous les collègues, qui ont faits que ce travail se passe dans de bonnes conditions et dans une bonne ambiance. Une pensée sincère pour Jérôme Leroux pour l'initiation au FTP !!!, pour Pascal Degraeve pour m'avoir fait découvrir la Bresse, le Jura et le ski de fond et Emmanuelle Goujon pour sa sensibilité, son amitié et ses petites histoires !!!.

Je veux enfin remercier ma famille, mes amis et surtout Céline Nicolas avec qui je partage ma vie, dont le soutien fut très important pendant des périodes difficiles et aussi pour la correction de ma thèse qu'elle avait du mal à déchiffrer !!!.

## Liste des abréviations

Bactéries	Unités
<i>A.</i> : <i>Aspergillus</i>	µg : Micro gramme ( $10^{-6}$ g)
<i>Bro</i> : <i>Brochothrix</i>	µm : Micro mètre ( $10^{-6}$ m)
<i>C.</i> : <i>Clostridium</i>	atm : Atmosphère
<i>E.</i> : <i>Escherichia</i>	cm ; Centimètre ( $10^{-2}$ m)
<i>Et</i> : <i>Enterococcus</i>	Da : Dalton
<i>L.</i> : <i>Listeria</i>	DO/h : Variation de Densité Optique par heure (vitesse de lyse bactérienne)
<i>Lc.</i> : <i>Lactococcus</i>	
<i>P.</i> : <i>Pseudomonas</i>	g : Gramme ou nombre de g (accélération = vitesse de centrifugation)
<i>S.</i> : <i>Staphylococcus</i>	
	h : Heure
	J : Joule
	j : Jour
	kb : Kilo base ( $10^3$ b)
	kDa : Kilo dalton ( $10^3$ da)
	kg : Kilo gramme ( $10^3$ g)
	kJ : Kilo Joule ( $10^3$ J)
	m : mètre
	mg : Milli gramme ( $10^{-3}$ g)
	min : Minute
	ml : Millilitre ( $10^{-3}$ litre)
	mM : Milli molaire (millimole par litre)
	mm : Millimètre ( $10^{-3}$ m)
	mmHg : Millimètre de mercure (pression)
	mmol : Milli mole ( $10^{-3}$ mol)
	mol : Mole
	MPa : méga Pascal ( $10^6$ Pa)
	mV : Milli volte ( $10^{-3}$ V)
	nm : Nano mètre ( $10^{-9}$ m)
	Pa : Pascal (pression)
	ppm : Partie par million
	rpm : Rotation par minute
	T°C : Température en degré Celsius
	UA : Unité Arbitraire (concentration en bactériocine)
	UI : Unité Internationale

$\theta$ :	Angle de contact (goniométrie)	FR :	Force à la Rupture ou Film Réticulé
$\Delta m$ :	Quantité d'eau ayant traversé le film	FRAS :	Film Réticule à base d'Acide Stéarique
$\Delta pH$ :	Gradient de protons	GAB :	Guggenheim-Anderson-DeBoer (équation)
$\Delta t$ :	Intervalle de temps	GRAS :	Generally Recognized As Safe
$\bar{e}$ :	Erreur moyenne	HACCP :	Hazard Analysis Critical Control Point
$\mu_{max}$ :	Taux de croissance maximale	HPC :	HydroxyPropylCellulose
A :	Allongement (déformation en %)	HPM :	Haut Poids Moléculaire
a, b :	Coordonnées chromatiques a (du vert au bleu) et b (du jaune au rouge) selon le référentiel $L^*a^*b$ de mesure des couleurs	HPMC :	HydroxyPropylMéthylCellulose
aa :	Aminoacide	HR :	Humidité Relative
ADN :	Acide désoxyribonucléique	IR en ATR :	Infra-Rouge en Attenuated Total Reflectance
amb :	ambiante (température)	L :	Luminescence selon le référentiel $L^*a^*b$
ARN :	Acide RiboNucléique	Log :	Logarithme
AS :	Acide stéarique	MRS :	De Man, Rogosa et Sharpe
ATD :	Analyse thermique différentielle	NF/EN ISO :	Norme Française/European Norm International Standard Organisation
ATP :	Adénosine TriPhosphate	Nis :	Nisine
$a_w$ :	Activité de l'eau	p :	Probabilité
BCA :	Acide BiCinchoninique	PE :	PolyEthylène
BPM :	Bas Poids Moléculaire	PEBD :	PolyEthylène Basse Densité
$C_{exp}$ :	Concentration expérimentale en nisine dans le gel d'agarose	PEG :	PolyEthylèneGlycol
$C_{ini}$ :	Concentration initiale en nisine dans la solution de diffusion	PHA :	PolyHydroxyAlcanoate
CIP :	Collection Institut Pasteur	PHB :	PolyHydroxyButyrate
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice	PHV :	PolyHydroxyValérate
CoA :	Coenzyme A	pI :	pH isoélectrique
$C_{red}$ :	Concentration expérimentale réduite en nisine dans le gel d'agarose	PLA :	Poly lactique Acide
$C_{sol}$ :	Concentration en nisine dans la solution de diffusion	PMF :	Protéines Myofibrillaires (de poisson)
CTVE :	Coefficient de Transfert à la Vapeur d'Eau	PVDC :	Chlorure de PolyVinylidène
D :	Coefficient de diffusion	S :	Surface
DGCCRF :	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes	T :	Température
DI50 :	Dose Infectieuse pour laquelle 50 % des individus sont infectés ou morts	t :	Temps
DLC :	Date Limite de Consommation	TB :	Tryptose Broth
DO :	Densité Optique	Tg :	Température de transition vitreuse
DS :	Degré de Substitution	TIA/TIAC :	Toxi-Infections Alimentaires/Collective
$E_a$ :	Energie d'activation	TTI :	Time Temperature Indicator
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide	UFC :	Unité Formant Colonie
EtOH :	Ethanol	v/v :	Volume par volume
FNRAS :	Film Non Réticulé à base d'Acide Stéarique	p/p :	weight to weight (masse/masse)
		WP :	Protéines du petit lait - lactosérum- (Whey Proteins)
		x :	Distance de diffusion
		$x_m$ :	Quantité d'eau
		Y :	Module de Young
		$\Delta\Psi$ :	Potentiel transmembranaire
		Fo :	Nombre de Fourier

## Liste des figures

Figure 1 : Structure du peptidoglycane et site d'action du lysozyme .....	11
Figure 2 : Représentation schématique de la nisine avec identification des charges positives (Sahl <i>et al.</i> , 1998) .....	14
Figure 3 : Mécanisme de synthèse de la nisine à partir des résidus cystéine, sérine et thréonine .....	15
Figure 4 : Opéron nisine de <i>Lactococcus lactis</i> 6F3 avec tous les gènes et les sites de restriction (Engelke <i>et al.</i> , 1994).....	15
Figure 5 : Modèle d'action en « douves de tonneau » de la nisine au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries Gram + (Havarstein <i>et al.</i> , 1995).....	16
Figure 6 : Conformation tridimensionnelle de la pédiocine PA-1 (Montville et Chen, 1998). 19	
Figure 7 : Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> selon la norme NF/EN ISO 11290-1 (1997) .....	25
Figure 8 : Cycle hypothétique de contamination par <i>L. monocytogenes</i> .....	26
Figure 9 : Les étapes du parasitisme intracellulaire de <i>L. monocytogenes</i> (selon Berche).....	28
Figure 10 : Fonctions sélectives des films comestibles et enrobages (Debeaufort <i>et al.</i> , 1998) .....	34
Figure 11 : Schématisation des températures de fusion et de transition vitreuse déterminées par ATD.....	38
Figure 12 : Structure chimique du PHA, PHB et PHV .....	43
Figure 13 : Structure chimique des PLA et schématisation de la polycondensation chimique	45
Figure 14 : Structure chimique de l'amylopectine et de l'amylose.....	49
Figure 15 : Formule théorique d'un polymère d'HPMC.....	53
Figure 16 : Structure chimique du chitosane.....	59
Figure 17: Coefficient de diffusion apparent à 25 °C de l'acide sorbique en fonction de la viscosité de la phase aqueuse du gel d'agar (A) ou en fonction de l' $a_w$ (B) (Guilbert <i>et al.</i> , 1985). .....	69
Figure 18 : Evolution de la diffusivité apparente de l'eau en fonction de la température pour différentes teneurs en eau (Biquet et Guilbert, 1986). .....	70
Figure 19 : Evolution du profil de diffusion du NaCl dans l'eau dans l'Emmental en fonction du temps de saumurage (Chamba, 1982). .....	70
Figure 20 : Procédé de fabrication de films à base d'HPMC.....	77
Figure 21 : Procédé de fabrication de films composites à base d'HPMC.....	78
Figure 22 : Schématisation d'une coupelle pour la mesure des CTVE.....	81
Figure 23 : Illustration de l'angle de contact mesuré par goniométrie.....	83
Figure 24 : Dispositif de traction (Quezada Gallo, 1999) .....	84
Figure 25 : Schéma de l'espace des couleurs selon le référentiel Lab .....	85
Figure 26: Principe de l'ATR en IRTF .....	87
Figure 27 : Principe de mesure de l'activité anti-microbienne des enrobages.....	88
Figure 28 : Principe du dosage des protéines au BCA.....	91
Figure 29 : Schéma du montage expérimental de la diffusion de la nisine dans le gel d'agarose .....	94
Figure 30 : Cinétiques de croissance de <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> et <i>S. aureus</i> en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	99
Figure 31 : Exemple d'inhibition de <i>L. innocua</i> en phase exponentielle de croissance par addition de nisine à 500 et 1000 UI.ml <sup>-1</sup> , en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.....	101

Figure 32 : Exemple d'inhibition de <i>L. innocua</i> en phase stationnaire de croissance par addition de nisine à 500 et 1000 UI.ml <sup>-1</sup> , en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.....	101
Figure 33 : Inhibition de <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i> en phase de latence, par addition à t = 0 de nisine aux concentrations égales à 100 ou 1000 UI.ml <sup>-1</sup> . L'inhibition est mesurée en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.....	106
Figure 34 : Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> après addition de 100 UI.ml <sup>-1</sup> de nisine à DO <sub>600nm</sub> = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.....	108
Figure 35 : Action de 100, 200 et 300 UI.ml <sup>-1</sup> de nisine sur des cultures de <i>L. monocytogenes</i> récupérées après une première action de 100 UI.ml <sup>-1</sup> de nisine et après reprise de la croissance. L'absorbance (600 nm) a été fixée à 0,6 avant addition de la nisine, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	109
Figure 36 : Action de 100 UI.ml <sup>-1</sup> de nisine sur des <i>L. monocytogenes</i> récupérées après une première soumission à la même concentration en nisine. Une pré-culture préalable est réalisée avant de tester à nouveau la nisine à 100 UI.ml <sup>-1</sup> additionnée à DO <sub>600nm</sub> = 0,6. Les tests sont réalisés en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.....	110
Figure 37 : Activité anti-bactérienne de la curvaticine pour des concentrations comprises entre 25 et 1000 UA.ml <sup>-1</sup> sur <i>L. monocytogenes</i> , à DO <sub>600nm</sub> initiale = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	113
Figure 38 : Activité anti-bactérienne de la pédiocine pour des concentrations comprises entre 100 et 1000 UA.ml <sup>-1</sup> sur <i>L. monocytogenes</i> , à DO <sub>600nm</sub> initiale = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	113
Figure 39 : Activité anti-bactérienne de la pédiocine ou de la curvaticine aux CMI de 250 UA.ml <sup>-1</sup> sur des bactéries de <i>L. monocytogenes</i> résistantes à 100 UI.ml <sup>-1</sup> de nisine. Les résultats sont calculés après addition des bactériocines à DO <sub>600nm</sub> = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	115
Figure 40 : Inhibition de <i>L. monocytogenes</i> en phase de latence, par addition à t = 0 des bactériocines seules ou en association nisine-curvaticine ou nisine-pédiocine aux concentrations suivantes : nisine (100 UI.ml <sup>-1</sup> ), pédiocine et curvaticine (250 UA.ml <sup>-1</sup> ). Les inhibitions sont réalisées en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation. ....	116
Figure 41 : Microscopie électronique à balayage (grossissement 1500) : (A) film HPMC, (B) film à l'acide stéarique, (C) film au méthyle stéarate .....	120
Figure 42 : Schéma de réaction de la cellulose en présence d'acide citrique et de dihydrogénophosphate de sodium (Zhou <i>et al.</i> , 1995).....	123
Figure 43 : Variation du rapport de surface des pics A1 (1735 cm <sup>-1</sup> ) sur A2 (948 cm <sup>-1</sup> ) suivant le nombre de moles de fonctions ester. Les points sont des moyennes de trois répétitions et leurs intervalles de confiance sont représentés par des barres verticales (p = 95 %).	125
Figure 44 : Isothermes de sorption de film témoin non réticulé et sans acide stéarique, de film composite et de film réticulé. Les droites ont été préalablement lissées par le modèle de GAB. ....	127
Figure 45 : Etude de la solubilité des films dans l'eau en fonction des teneurs en NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (facteur A) et en acide citrique (facteur B). Une régression linéaire multi-factorielle analyse les effets des facteurs A, B, AA, BB et AB (diagramme de Pareto).....	130
Figure 46 : Photographie des films témoins, réticulés et composites .....	133
Figure 47 : Dégradation de l'acide citrique (Zhou <i>et al.</i> , 1995).....	133
Figure 48 : Thermogrammes des films réticulés, composites à base d'acide stéarique et de films composites et réticulés à base d'acide stéarique (Mettler).....	134
Figure 49 : Microscopie électronique à balayage des bioemballages (Jeol 840A) . A- observation des coupes (grossissement x 1500), B- observation des surfaces (grossissement x 4000).....	136

Figure 50 : Spectre obtenu en analysant par IRTF par ATR des films traités 15 min à 190°C, incorporant $10^5$ UI.ml <sup>-1</sup> de nisine en absence d'acide citrique et de catalyseur, comparés à des films de même composition mais non traités.....	141
Figure 51 : Variation du pourcentage de nisine résiduelle en fonction de la teneur en acide stéarique et pour deux concentrations en nisine ( $10^3$ et $1,2.10^4$ UI.ml <sup>-1</sup> ). La nisine résiduelle est mesurée par kit BCA. Chaque valeur du graphique correspond à une moyenne de 3 répétitions et les intervalles de confiance sont schématisés par les barres verticales.....	147
Figure 52 : Variation du pourcentage en nisine résiduelle en fonction de la teneur en acide stéarique ou en stéarate de méthyle et pour une concentration initiale en nisine de $3.10^3$ UI.ml <sup>-1</sup> . La nisine résiduelle est mesurée par kit BCA. Chaque point du graphique correspond à une moyenne de 3 répétitions et les intervalles de confiance sont schématisés par les barres verticales. ....	148
Figure 53 : Enthalpie libre, calculée par ATD de cristaux d'acide stéarique purs, et ayant préalablement été mélangés au calcium en solution tampon pH 6,1. ....	150
Figure 54 : Variation de la quantité en nisine en fonction de la teneur en nisine initiale (hauteur totale de l'histogramme) et du pourcentage en acide stéarique. La nisine est dosée par BCA. Les valeurs sont des moyennes d'au moins 3 répétitions. ....	151
Figure 55 : Variation du diamètre d'inhibition de films imprégnés à $10^4$ UI.ml <sup>-1</sup> de nisine en fonction du temps et sur <i>M. luteus</i> . Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions et les barres verticales représentent les intervalles de confiance.....	157
Figure 56 : Spectres obtenus en analysant par IRTF en ATR des films réticulés, réticulés imprégnés et réticulés après désorption. ....	158
Figure 57 : Droite étalon du dosage par BCA de solution de nisine et de nisine extraite des gels d'agarose. Les droites sont des moyennes de 9 répétitions, et les intervalles de confiance sont représentés par les barres verticales. ....	162
Figure 58 : Influence des divers paramètres (température, temps et concentration en nisine dans la solution) sur la diffusion de la nisine dans un gel d'agarose à 3 %. Les données expérimentales sont représentés par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.....	164
Figure 59 : Variation du coefficient de diffusion Ln(D) en fonction de la température (1/T). .....	166
Figure 60 : Influence de la concentration en nisine dans la solution de diffusion (245 et 361 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose. Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.....	168
Figure 61 : Influence du temps (6 et 12 jours) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentration en nisine (245 et 361 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.....	169
Figure 62 : Influence de la teneur en matière lipidique (50 %) et de la nature en matière lipidique (acide stéarique, stéarate de méthyle et huile de coprah) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentrations en nisine comprises entre 161 et 371 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.....	174

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques applications alimentaires de cultures protectrices de bactéries lactiques (Rodgers, 2002).....	9
Tableau 2 : Quelques exemples d'utilisation autorisée en alimentaire de la nisine dans différents pays (Delves-Broughton, 1990).....	18
Tableau 3 : Quelques études relatives au caractère anti-microbien de la nisine (Breukink et De Kruijff, 1999).....	18
Tableau 4 : Epidémies de listériose survenues en France depuis 1990.....	28
Tableau 5 : Critères microbiologiques retenus pour l'appréciation de conformité (nombre de germes de <i>S. aureus</i> par gramme de produit alimentaire) - Réglementation française Arrêté du -21-16679.....	31
Tableau 6 : Quelques propriétés physiques et barrière de différentes catégories d'emballages (Mathlouthi, 1996).....	35
Tableau 7 : Propriétés requises pour les bioemballages pour quelques catégories de produits alimentaires (Amb : ambiante, j : jour, sem : semaine et a : année) (Carneiro <i>et al.</i> , 1998). x : identification des facteurs d'altération ; + : propriétés requises des matériaux ; selon leur degré d'importance.....	37
Tableau 8 : Variation du ratio HB-HV en fonction du substrat carboné utilisé (Doi et Segewa, 1990).....	43
Tableau 9 : Teneurs en amylose et en amylopectine d'amidons naturels.....	49
Tableau 10 : Comparatif des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau de quelques emballages synthétiques et bioemballages (Cuq <i>et al.</i> , 1995).....	51
Tableau 11 : Comparatifs des biopolymères par rapport aux polymères synthétiques sur la base des propriétés physiques, barrière et de coût de revient (Petersen <i>et al.</i> , 1999).....	52
Tableau 12 : perméabilités à 25 °C au dioxygène et au dioxyde de carbone de différents bioemballages, comparées au PET (Guilbert <i>et al.</i> , 1996).....	52
Tableau 13 : Constante de réactivité des trois groupements OH de la cellulose.....	53
Tableau 14 : Quelques études d'incorporation de molécules anti-microbiennes dans les emballages.....	58
Tableau 15 : Quelques exemples de coefficients de diffusion de molécules dans les gels polysaccharidiques.....	68
Tableau 16 : Quelques protocoles d'extraction de peptides hydrosolubles à partir de fromage.....	71
Tableau 17 : Micro-organismes, milieux et conditions de culture.....	73
Tableau 18 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i> en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Les résultats, obtenus sur TB en Erlenmeyer, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation, sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %)......	102
Tableau 19 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> et <i>S. aureus</i> en phases exponentielle et stationnaire de croissance. Les résultats, obtenus en milieu TB en tube, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation, sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %)......	104
Tableau 20 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur <i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> et de <i>M. luteus</i> . Les résultats, obtenus en milieu TB solide, correspondent à des diamètres de zone d'inhibition (mm) et sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %)......	105

Tableau 21 : Concentrations en pédiocine et en curvaticine (UA.ml <sup>-1</sup> ) déterminées sur <i>L. monocytogenes</i> par la technique en puits, en milieu TB agar, à 30 °C et au bout de 24 à 48 h d'incubation.....	112
Tableau 22 : CTVE (g eau .m <sup>-2</sup> . j <sup>-1</sup> .atm <sup>-1</sup> ) mesurés pour des films de 50 cm <sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 0-50 % d'HR et 23 °C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).....	119
Tableau 23 : CTVE (g eau.m <sup>-2</sup> . j <sup>-1</sup> .atm <sup>-1</sup> ) mesurés pour des films de 50 cm <sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 90 % d'HR et 38 °C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).....	121
Tableau 24 : Taux de réticulation déterminé par le dosage en retour. ....	124
Tableau 25 : CTVE (g eau .m <sup>-2</sup> . j <sup>-1</sup> .atm <sup>-1</sup> ) mesurés pour des films de 50 cm <sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 90 % d'HR et 38°C ou 50 % d'HR et 23°C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %). ....	126
Tableau 26 : Angle de contact θ mesuré à l'interface eau-film. Les valeurs sont des moyennes de 9 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %). ....	129
Tableau 27 : Propriétés physiques et physico-chimiques des différents films témoin, composite, réticulés et composite réticulés. Les résultats sont des moyennes de 9 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %). ....	132
Tableau 28 : Activité anti-bactérienne de solutions de nisine à 5.10 <sup>3</sup> UI.ml <sup>-1</sup> en tampon phosphate pH 6,1 50 mM, traitées thermiquement ou non et solubilisées dans différents teneurs en éthanol ou en tampon. Elle est mesurée par inhibition de <i>M. luteus</i> selon la technique en puits. Les données, correspondant à des diamètres d'inhibition (mm), sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).....	139
Tableau 29 : Activité anti-bactérienne de films à 10 <sup>5</sup> UI.ml <sup>-1</sup> ou de nisine en poudre, traités thermiquement 15 min à 190 °C, mesurée par inhibition en puits ou en disque de films sur <i>M. luteus</i> . Les données, correspondant à des diamètres d'inhibition, sont exprimées en pourcentage d'inhibition.....	140
Tableau 30 : Activité anti-bactérienne de films contenant 10 <sup>5</sup> UI.ml <sup>-1</sup> de nisine et différents pourcentages en acide stéarique. Les données à 0 % d'acide stéarique correspondent à des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les autres résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux films sans composé lipidique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %). ....	143
Tableau 31 : Activité anti-bactérienne sur <i>M. luteus</i> de films contenant différents teneurs en acide stéarique et en nisine. Les données à 0 % d'acide stéarique correspondent à des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les autres résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux films sans composé lipidique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).....	144
Tableau 32 : Activité anti-bactérienne sur <i>L. innocua</i> et <i>S. aureus</i> d'enrobages contenant 0 ou 15 % en acide stéarique et 5.10 <sup>3</sup> ou 10 <sup>4</sup> UI.ml <sup>-1</sup> en nisine, comparée à celle de solution de nisine. Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition par rapport aux boîtes témoins et sont la moyenne de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).....	145
Tableau 33 : Activité anti-bactérienne sur <i>M. luteus</i> de films contenant différents teneurs en acide stéarique ou en stéarate de méthyle et 5.10 <sup>3</sup> UI.ml <sup>-1</sup> de nisine. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition après dépôt de disque de films (mm). Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance. ....	149

Tableau 34 : Variation de la quantité en calcium résiduel en fonction de 3 concentrations en calcium initiales et en présence de 25 g.l <sup>-1</sup> d'acide stéarique. Le calcium résiduel est mesuré par absorption atomique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).	150
Tableau 35 : Interaction nisine-acide stéarique en présence de 8 ou de 80 mg.l <sup>-1</sup> de calcium. La nisine initiale est de (1,77 ± 0,20).10 <sup>5</sup> UI.ml <sup>-1</sup> et la nisine résiduelle est quantifiée par BCA. Les valeurs sont des moyennes de 6 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.	154
Tableau 36 : Activité anti-bactérienne sur <i>L. monocytogenes</i> de films contenant 0 ou 15 % en acide stéarique et 0 ou 80 mg.ml <sup>-1</sup> de calcium. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.	155
Tableau 37 : Activité anti-bactérienne sur <i>M. luteus</i> de films composites contenant 15 % en acide stéarique. Le pH de la solution filmogène est fixé à pH 3, 5 et 7 avant addition d'acide stéarique et de nisine à 10 <sup>4</sup> UI.ml <sup>-1</sup> . Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.	156
Tableau 38 : Activité anti-bactérienne sur <i>M. luteus</i> de films réticulés ou composites réticulés après 2 h d'imprégnation dans une solution à 10 <sup>4</sup> UI.ml <sup>-1</sup> de nisine, désorbés et de la solution de désorption. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films ou de test de solution de nisine en puits. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).	159
Tableau 39 : Coefficient de diffusion apparent de la nisine en gel d'agarose à 3 %. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.	165
Tableau 40: Influence de la concentration en nisine dans la solution de diffusion (245 et 361 µg.ml <sup>-1</sup> ) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.	168
Tableau 41: Influence du temps (6 et 12 jours) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentration en nisine (245 et 361 µg.ml <sup>-1</sup> ). Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.	170
Tableau 42 : Coefficient de diffusion apparent, simulé et identifié, de la nisine en gel d'agarose à 3, 6 et 8 %, à 10 °C et à 250-300 µg.ml <sup>-1</sup> . Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.	172

## Liste des publications et communications

### **PUBLICATIONS :**

COMA, V., SEBTI, I., PARDON, P., DESCHAMPS, A. , PICHAVANT, H. (2001).  
Anti-microbial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*.  
*Journal of Food Protection*, 64 (4), pp. 470 – 475.

SEBTI, I, COMA, V. (2002).  
Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds.  
*Carbohydrate Polymers*, 49(2), pp. 139-144.

COMA, V., SEBTI, I., PARDON, P., PICHAVANT, H., DESCHAMPS, A. (2002).  
Film properties from cross linking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid.  
*Carbohydrate Polymers*, sous presse.

SEBTI, I., PICHAVANT, H. , COMA, V. (2002).  
Edible bioactive fatty acid – cellulosic derivatives composites to food packaging applications.  
*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (15), pp. 4290-4294.

### **CONGRES AVEC COMMITE DE LECTURE ET PROCEEDINGS PUBLIES :**

SEBTI, I., PICHAVANT, F.H., PARDON, P., COMA, V. (2000).  
Active edible packaging materials based on cellulosic derivatives and bacteriocins incorporation.  
*Proceedings: Sixth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp*, Sept 3-6, Bordeaux, pp. 563-566.

SEBTI, I., DESCHAMPS, A. , COMA, V. (2001). Emballages alimentaires comestibles ou biodégradables à activité anti-*Listeria*. Journées AGORAL 2001, Dijon.  
*Publié dans: "Les outils biologiques dans les procédés et les techniques d'analyse"*.  
Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 427-432.

### **COMMUNICATIONS AVEC COMMITE DE LECTURE NON PUBLIEES :**

SEBTI, I, COMA, V., DESCHAMPS, A. (2001).  
Matrice cellulosique bio active anti-*Listeria monocytogenes* par incorporation de bactériocine.  
*Proceedings: 11° réunion du Club des Bactéries Lactiques*, Bordeaux, France.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>7</b>
<b>I Préservation - sécurité sanitaire des aliments</b>	<b>7</b>
I.1. Les acides carboxyliques et leurs sels	9
I.2. Les enzymes	10
I.2.1. Le système LPPT	10
I.2.2. Les lysozymes	11
I.3. Les bactériocines des bactéries lactiques	12
I.3.1. Définition	12
I.3.2. Classification	12
I.3.3. La nisine	13
I.3.3.1. Généralités	13
I.3.3.2. Déterminant génétique	15
I.3.3.3. Mode d'action	16
I.3.3.4. Propriétés physico-chimiques	17
I.3.3.5. Applications	17
I.3.4. La pédiocine	19
I.3.4.1. Généralités	19
I.3.4.2. Déterminant génétique	20
I.3.4.3. Mode d'action	20
I.3.4.4. Applications	20
I.3.5. La curvaticine	21
I.3.6. Association bactériocine / autres molécules	21
<b>II Caractères physiologiques et pathologiques des souches étudiées : <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>23</b>
II.1. Caractères généraux de <i>L. monocytogenes</i>	23
II.1.1. Caractères bactériologiques	23
II.1.2. Isolement et identification	24
II.1.3. Niches écologiques et conséquences en alimentaire	25
II.1.4. Pathologie Humaine	27
II.1.4.1. Toxi-infection alimentaire	27
II.1.4.2. Pathogénicité	28
II.2 Caractères généraux de <i>S. aureus</i>	29
II.2.1 Caractères bactériologiques	29
II.2.2 Isolement et identification	30
II.2.3 Niches écologiques et conséquences en alimentaire	30
II.2.4 Réglementation	31
II.2.5 Pathologie Humaine	32
II.2.5.1. Les toxines	32
II.2.5.2. Infections	32
<b>III Les bioemballages</b>	<b>34</b>
III.1 Formation et propriétés des bioemballages	37
III.1.1 Fabrication des films par voie humide (casting)	37
III.1.2 Température de transition vitreuse et cristallinité	38
III.1.3 Résistance des films à l'immersion dans l'eau	39

III.1.4 Plastifiants .....	39
III.1.5 Propriétés mécaniques.....	40
III.1.6 Propriétés barrière à la vapeur d'eau.....	41
III.2 Les polymères produits par les micro-organismes : exemple des polyesters .....	42
III.3 Les polymères produits par synthèse chimique à partir de dérivés naturels : Exemple de l'acide polylactique : PLA .....	44
III.4 Les Polymères à base de macromolécules d'origine naturelle: Exemple des hydrocolloïdes .....	46
III.4.1 Les biopolymères protéiques.....	46
III.4.2 Les biopolymères osidiques .....	48
III.4.2.1 L'amidon .....	48
III.4.2.2 La cellulose .....	50
III.4.2.3 Cas particulier des HydroxyPropylMéthylCellulose : HPMC .....	53
III.5 Les emballages actifs anti-microbiens .....	54
III.5.1 Généralités sur les emballages actifs.....	54
III.5.2 Cas particulier des emballages anti-microbiens .....	56
III.5.2.1 Effets anti-microbiens indirects .....	58
III.5.2.2 Emballage à base de polymères anti-microbien : exemple du chitosane .....	59
III.5.2.3 Bioemballages incorporant des bactériocines .....	60
IV Transfert de matière et modélisation .....	62
IV.1 Généralité sur le phénomène de diffusion.....	63
IV.2 Matrice simple pour l'étude de la diffusion .....	65
IV.3 Méthodes expérimentales pour la détermination du coefficient de diffusion .....	66
IV.4 Diffusion de molécules dans des systèmes hydrocolloïdes à forte teneur en eau .....	66
IV.5 Extraction des peptides des gels .....	71

## **MATERIELS ET METHODES**

I Caractéristique des souches bactériennes et sensibilités aux bactériocines étudiées.....	72
I.2 Matériels.....	72
I.2.1 Micro-organismes.....	72
I.2.2 Milieux de culture .....	72
I.2.3 Micro-organismes, milieux et conditions de culture.....	73
I.2.4 Solutions tampons et diluants.....	73
I.2.5 Les bactériocines .....	73
I.2 Méthodes .....	74
I.2.1 Pré-culture de 18h .....	74
I.2.2 Etude de l'effet anti-bactérien des bactériocines.....	74
I.2.2.1 Technique en milieu liquide .....	74
I.2.2.2 Technique en puits sur milieu solide (Blom <i>et al.</i> , 1997) .....	74
I.2.2.3 Mise en évidence et étude des résistants .....	75
I.2.2.4 Obtention de <i>L. monocytogenes</i> résistantes à la nisine .....	75
I.2.3 Production de bactériocines et concentration.....	75
I.2.3.1 Production de bactériocines .....	75

I.2.3.2	Concentration des bactériocines (méthode adaptée de Burianek et Yousef, 2000) .....	76
I.2.3.3	Détermination des concentrations en bactériocines en Unité Arbitraire par millilitre (UA.ml <sup>-1</sup> ) .....	76
<b>II</b>	<b>Etude des bioemballages .....</b>	<b>76</b>
II.1	Matériels.....	76
II.1.1	Produits.....	76
II.1.2	Appareillages.....	77
II.2	Méthodes .....	77
II.2.1	Fabrication des films par casting.....	77
II.2.1.1	Films homogènes à base d'HPMC .....	77
II.2.1.2	Films composites.....	78
II.2.1.3	Films réticulés et film réticulé composite .....	78
II.2.2	Etude du taux de réticulation.....	79
II.2.2.1	Dosage en retour des fonctions acides .....	79
II.2.2.2	Etude des fonctions ester par InfraRouge à Transformée de Fourier IRTF en transmittance .....	80
II.2.3	Etude de la sensibilité du film à l'eau liquide et vapeur .....	80
II.2.3.1	Détermination du Coefficient de Transfert à la Vapeur d'Eau : CTVE.....	80
II.2.3.2	Isotherme de sorptions .....	81
II.2.3.3	Goniomètre ou angle de contact.....	82
II.2.3.4	Résistance du film à l'immersion dans l'eau .....	83
II.2.4	Caractérisation physique des films.....	83
II.2.4.1	Epaisseur .....	83
II.2.4.2	Propriétés mécaniques.....	84
II.2.4.3	Couleur .....	85
II.2.4.4	Rugosité.....	85
II.2.4.5	Caractérisation des films par IRTF .....	86
II.2.4.6	Analyse thermique différentielle.....	87
<b>III</b>	<b>Etude des films ou enrobages anti-microbiens .....</b>	<b>88</b>
III.1	Matériels .....	88
III.2	Méthodes .....	88
III.2.1	Activité anti-microbienne des enrobages .....	88
III.2.2	Activité anti-microbienne des films : technique des disques .....	89
<b>IV</b>	<b>Etude des interactions nisine-acide stéarique ou stéarate de méthyle-ion calcium Ca<sup>2+</sup> .....</b>	<b>89</b>
IV.1	Matériels .....	89
IV.1.1	Produits.....	89
IV.1.2	Appareillages.....	90
IV.2	Méthodes .....	90
IV.2.1	Préparation des solutions d'ions calcium à 500 mg.l <sup>-1</sup> , et des ions sodium Na <sup>+</sup> et potassium K <sup>+</sup> .....	90
IV.2.2	Dosage des ions par absorption atomique .....	91
IV.2.3	Dosage de la nisine.....	91
IV.2.4	Interactions nisine-acide stéarique ou stéarate de méthyle-ion calcium en solution et dosage de la nisine ou du calcium résiduels .....	92
IV.2.5	Analyse thermique différentielle des cristaux d'acide stéarique.....	92
<b>V</b>	<b>Diffusion de la nisine dans un gel d'agarose .....</b>	<b>93</b>

V.1 Matériels.....	93
V.2 Méthodes .....	93
V.2.1 Formation du gel d'agarose :.....	93
V.2.2 Montage expérimental.....	93
V.2.3 Extraction de la nisine du gel et dosage :.....	95
V.2.4 Modèle de diffusion : .....	96
V.2.4.1Modèle du mur semi-infini.....	96
V.2.4.2Résolution du modèle.....	96
V.2.4.3Identification du paramètre D .....	97
VI Analyse statistique des données .....	98

## **RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE 1**

I Cinétique de croissance et caractérisation des souches .....	99
II Activité anti-bactérienne de la nisine : détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) .....	100
II.1 Activité anti-bactérienne en milieu liquide.....	100
II.2 Activité anti-bactérienne en milieu solide .....	105
II.3 Effet de la nisine à 100 ou 1000 UI.ml <sup>-1</sup> sur les bactéries en phase de latence .....	106
III Développement de bactéries résistantes à la nisine .....	107
III.1 Mise en évidence et étude de la résistance bactérienne .....	107
III.2 Production de curvaticine et de pédiocine et détermination des CMI sur <i>L. monocytogenes</i> .....	111
III.3 Activité anti-bactérienne de la pédiocine et de la curvaticine sur des bactéries <i>L. monocytogenes</i> résistantes à la nisine .....	114
IV Association nisine-curvaticine ou nisine-pédiocine et effet synergique .....	116
V Conclusion.....	117

## **RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE 2**

I Etude et amélioration des propriétés barrière à la vapeur d'eau des films composites émulsionnés ou réticulés .....	119
I.1 Films composites émulsionnés .....	119
I.2 Etude et amélioration des propriétés barrière à la vapeur d'eau des films réticulés .....	122
I.2.1 Mise en œuvre de la réticulation et calcul du taux de réticulation.....	122
I.2.2 Influence de la réticulation sur le CTVE.....	125
II Sensibilité des bioemballages à l'eau à l'état vapeur et liquide	127
II.1 Sensibilité des bioemballages à l'eau vapeur .....	127
II.2 Sensibilité des bioemballages à l'eau liquide .....	128
II.2.1 Angle de contact.....	128
II.2.2 Hydrosolubilité des films .....	129
III Caractérisation physique et physico-chimique des films .....	131
IV Conclusion.....	137

## **RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE 3**

I	Stabilité de la nisine dans les conditions de fabrication des films...	138
	.....	138
I.1	Stabilité de la nisine dans les conditions de fabrication des films homogènes .....	138
I.2	Stabilité de la nisine dans les conditions de réticulation .....	139
II	Activité anti-bactérienne des films composites .....	142
III	Activité anti-bactérienne d'enrobages composites .....	144
IV	Analyse des interactions entre la nisine et l'acide stéarique.....	146
IV.1	Etude des interactions entre la nisine et l'acide stéarique.....	146
IV.2	Modélisation des interactions entre la nisine et l'acide stéarique.....	151
IV.3	Réduction des interactions entre la nisine et l'acide stéarique.....	152
IV.3.1	Par ajout d'ions calcium.....	152
IV.3.2	Par diminution du pH.....	156
V	Activité anti-bactérienne des films réticulés imprégnés.....	156
VI	Conclusion.....	159

## **RESULTATS ET DISCUSSION : PARTIE 4**

I	Résultats préalables .....	161
I.1	Méthode d'extraction de la nisine du gel d'agarose .....	161
I.2	Etablissement des droites étalons .....	162
I.3	Détermination de la concentration d'équilibre dans le gel .....	163
I.4	Vérification de la condition à la limite .....	163
II	Identification du coefficient de diffusion apparent de la nisine en gel d'agarose et validation du modèle .....	164
II.1	Identification du coefficient de diffusion de la nisine en gel d'agarose .....	164
II.2	Validation du modèle de diffusion de la nisine en gel d'agarose.....	167
II.2.1	En fonction de la concentration en nisine dans la solution .....	167
II.2.2	En fonction du temps de diffusion .....	169
III	Etude de l'influence de la teneur en matière sèche sur la diffusion de la nisine en gel d'agarose.....	171
IV	Etude de l'influence de la teneur en matière lipidique sur la diffusion de la nisine en gel d'agarose .....	173
V	Conclusion.....	175

**CONCLUSION GENERALE** **177**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **181**

# INTRODUCTION

« Un aliment emballé en vaut deux »  
Céline

Des moyens aussi multiples que variés sont aujourd'hui à notre disposition pour limiter le risque de développement microbien dans les produits alimentaires : décontamination thermique, conservation à basse température, modification des propriétés physico-chimiques des aliments, incorporation d'additifs et de conservateurs, adoption des bonnes pratiques de production (HACCP, AMDEC, normes ISO, *etc.*), conditionnement sous atmosphère, *etc.* Les cas récents de toxi-infections alimentaires provoqués par des bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* ont montré que ces différentes actions restent toutefois insuffisantes ou inadaptées dans certaines situations. De plus, en France, la commercialisation d'un certain nombre de produits alimentaires consommés crus limite l'utilisation de bons nombres de ces moyens de décontamination.

La conservation de produits alimentaires par l'emballage - conditionnement est un domaine plein d'avenir. Le rôle de l'emballage dans la conservation des aliments est avant tout un rôle de barrière entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. Le type de protection à adopter sera fonction de la sensibilité du produit à tel ou tel type d'agression, dépendant des facteurs d'altération intrinsèques des aliments (activité de l'eau, pH, état physique, *etc.*) et des facteurs extrinsèques (humidité ambiante, température de stockage, *etc.*) responsables des risques de mauvaise conservation.

Pour répondre à la demande croissante d'amélioration de la qualité et de la sécurité des produits alimentaires, l'élaboration **d'emballages actifs ou intelligents** est un secteur en pleine expansion.

La technologie de conditionnement est de plus en plus souvent associée à une solution emballage contribuant par elle-même à la préservation de l'aliment conditionné. C'est ce que les Japonais et les Américains ont appelé "**emballages actifs**".

Un grand nombre de technologies sont déjà utilisées pour réaliser des emballages actifs ou intelligents, capables d'étendre la durée de vie des produits en agissant sur leur environnement, et de contrôler leur qualité par absorption d'oxygène et d'éthylène, libération de dioxyde de carbone, rétention d'eau vapeur ou liquide, témoins de températures, *etc.*

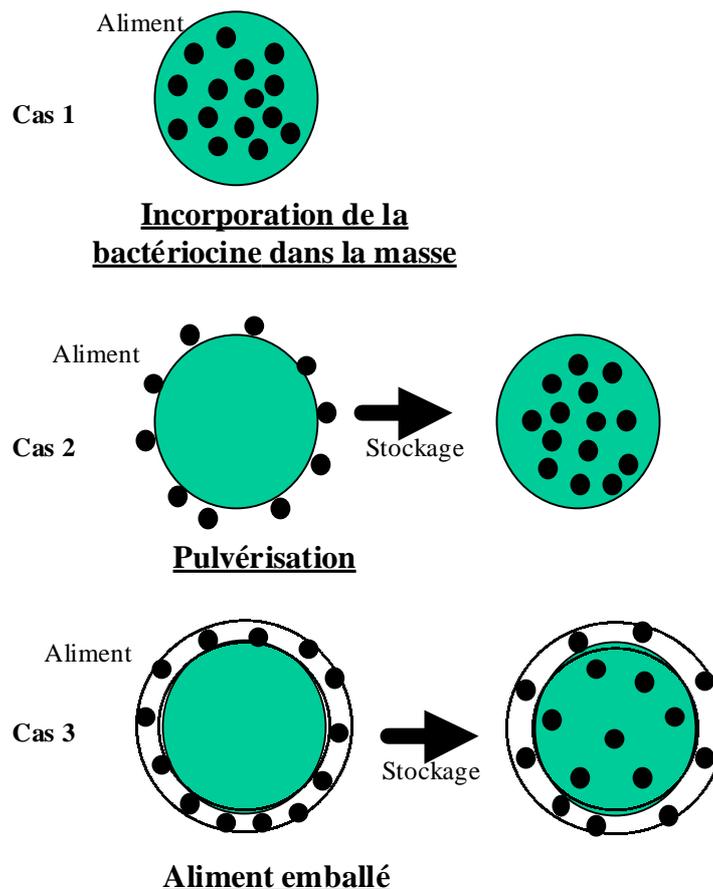
L'emballage peut également devenir anti-microbien : il s'agit alors non plus d'absorber des molécules mais d'en relâcher. L'emballage incorpore ainsi ces agents anti-microbiens et les libère de façon contrôlée dans le produit. Ces concepts, utilisés avec succès aux Etats-Unis, au Japon et en Australie, ont un développement limité en Europe à cause de restrictions légales et d'un manque de connaissance sur l'acceptation des consommateurs, sur l'efficacité de ces emballages, ainsi que sur leur impact économique et environnemental.

La production et l'utilisation en quantités continuellement croissantes « d'emballages plastiques » à base de macromolécules synthétiques, du fait notamment de leur efficacité, leurs propriétés particulièrement intéressantes et modulables et leur inertie vis à vis de l'aliment, posent aujourd'hui des problèmes importants de non renouvellement et de pollution de l'environnement. Les démarches de recyclage, aussi importantes soit-elles, sont insuffisantes pour répondre à cette pollution. L'étude d'emballages biodégradables, d'origine végétale ou microbienne, possédant des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau et aux gaz (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) proches des performances des emballages plastiques est une des voies à développer pour limiter cette pollution tant visuelle que chimique. Par ailleurs, de nombreux travaux récents ont montré que les films et enrobages comestibles et/ou biodégradables peuvent avoir un rôle important dans la maîtrise de la qualité et de la stabilité de nombreux aliments frais, transformés ou congelés. Divers matériaux glucidiques, protéiques et lipidiques, utilisés seuls ou en mélange ont été proposés pour la formulation de ces films ou enrobages. L'actualité scientifique et technique fait de plus en plus état de cette nouvelle famille de matériaux, auxquels on demande les performances d'un véritable emballage, tout en exigeant un caractère comestible ou biodégradable.

En réponse à ces deux problématiques, outre leur intérêt pour des raisons environnementales, les enrobages et films comestibles ou biodégradables peuvent être utilisés en tant que support d'agents anti-microbiens. L'incorporation de molécules actives dans la matrice d'un biomatériau permet de maîtriser leur désorption puis diffusion dans le produit alimentaire en ayant pour objectif le maintien de la concentration minimale inhibitrice en surface et à cœur de la denrée avec un faible taux d'incorporation initial.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse, dont l'objectif est ainsi d'élaborer et d'étudier des matériaux à base de dérivés cellulosiques et de bactériocines (nisine, pédiocine, curvaticine, *etc*) en tant qu'agent inhibiteur. Ces molécules sont des peptides à activité bactériostatique ou bactériolytique essentiellement dirigée contre les bactéries Gram positif. L'une des plus étudiées aujourd'hui est la nisine, bactériocine à spectre large autorisée en industrie agroalimentaire (E234), produite par la souche *Lactococcus lactis*. En association avec une matrice d'éther de cellulose, l'hydroxypropylmethyl cellulose (additif alimentaire E464), la nisine est utilisée dans le but de réduire la flore de surface de certains produits alimentaires, en particulier de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, micro-organismes posant un problème de santé publique.

A la différence d'incorporer la nisine directement dans l'aliment (utilisation d'une quantité importante - **cas 1**) ou, de la pulvériser à la surface de celui-ci (diffusion rapide à cœur du produit - **cas 2**), l'incorporation de la bactériocine dans un film présente l'intérêt d'une désorption progressive du film et d'une rétention partielle en surface, ce qui maintient une concentration minimale inhibitrice à la surface du produit alimentaire, région la plus sensible à l'attaque bactérienne (**cas 3**).



Dans ce travail, la synthèse bibliographique est organisée en quatre parties : molécules ou systèmes anti-microbiens, bactéries pathogènes, bioemballages et diffusion. Les agents couramment utilisés en protection et conservation des aliments sont présentés dans la première partie. Seules les molécules susceptibles d'entrer dans la composition d'un film sont présentées.

Sachant que l'objectif de nos films est d'être anti-bactérien, les caractéristiques physiologiques et pathologiques des bactéries cibles de cette étude, à savoir *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, sont présentées dans la deuxième partie.

En troisième partie, nous avons synthétisé les travaux de recherche qui tentent d'élaborer des bioemballages dont les caractéristiques, essentiellement barrière à la vapeur d'eau et mécaniques, sont optimisées pour approcher celles des emballages plastiques. Les travaux faisant référence aux bioemballages actifs anti-microbiens sont également présentés. Enfin, comme l'activité inhibitrice du matériau est surtout dépendante de la désorption de la nisine du film et de sa diffusion dans un système alimentaire, des modèles de diffusion moléculaire et d'identification des paramètres pouvant influencer le mécanisme de diffusion sont présentés dans la dernière partie de cette synthèse bibliographique.

En ce qui concerne l'étude des matériaux à base de dérivés cellulosiques associés à la nisine, nous avons préalablement testé l'activité inhibitrice de la nisine à l'état libre sur les souches cibles afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice pour chacune d'entre elles. *M. luteus*, montrant une forte sensibilité à la nisine, a été utilisé en tant que souche modèle.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à appréhender les relations compositions/structure des biomatériaux en relation avec leurs propriétés fonctionnelles, physiques et physico-chimiques. La nature (composés hydrophobes, ions calcium, *etc.*) et la structure (film composite émulsionné ou modifié chimiquement par réticulation) du film ont été étudiées dans le but d'élaborer des films mécaniquement résistants et barrière à la vapeur d'eau.

Dans un troisième temps, l'association bioemballage/bactériocine a été mise en œuvre. L'influence de la nature des composants et la méthode d'élaboration des bioemballages sur l'activité antibactérienne a été étudiée.

Enfin, la diffusion de la nisine dans une matrice simple à base d'agarose a été étudiée en analysant les effets de certains paramètres : matière sèche, matière lipidique, température et temps de diffusion sur la diffusivité de la nisine.

Cette thèse est une collaboration entre trois laboratoires universitaires, dont les thématiques de recherche sont complémentaires :

- ✓ Le Laboratoire de Chimie des Substances Végétales, centre de recherche en chimie moléculaire, Université Bordeaux 1, Bordeaux : biomatériaux actifs.
- ✓ Le Laboratoire de Recherche en Génie Industriel et Alimentaire, IUT Génie Biologique, Université Claude Bernard Lyon 1, Bourg en Bresse : génie des procédés et modélisation de diffusion.

- ✓ L'Unité Sécurité Microbiologique des Aliments, Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux, Université Bordeaux 1, Bordeaux : microbiologie alimentaire et biotechnologie.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

«Aux grands maux les grands remèdes »

## I Préservation - sécurité sanitaire des aliments

Depuis ces dix dernières années, dans le domaine de l'agroalimentaire, la sécurité sanitaire des aliments devient la priorité de nombreux programmes ou thématiques de recherche. La législation actuelle impose à l'industriel de mettre en place un certain nombre de mesures pour garantir la qualité et l'innocuité du produit alimentaire. Ces garanties sont de plus en plus difficiles à assurer avec un éloignement des centres de consommations par rapport aux centres de production. Cette « mondialisation » de l'aliment complique la tâche de l'industriel qui doit non seulement garantir un produit sain exempt de toute contamination bactérienne, mais également un aliment organoleptiquement stable pendant toute la durée de conservation. La multiplication du nombre de composants qui entrent dans la formulation du produit alimentaire et des procédés technologiques de fabrication, l'augmentation de la productivité et des durées de transport, les personnes qui deviennent de plus en plus fragiles et allergiques, le développement de bactéries résistantes à un certain nombre de molécules bactéricides, *etc.* rendent très difficile l'assurance de la qualité microbiologique des aliments.

Les dernières intoxications alimentaires par des bactéries pathogènes comme *Listeria* ou *Salmonella*, montrent bien cette difficulté de garantir un aliment totalement sain malgré une volonté et des prises d'initiatives accrues dans le domaine de la sécurité alimentaire humaine. Cette difficulté est due à une multiplication des sources de contamination primaires (air, sol, eau et matière première) et secondaires (homme et machines).

Premièrement, des outils comme l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) ont été mis en œuvre pour identifier des points dits critiques à l'origine de la contamination primaire des aliments et mettre en œuvre des actions correctives pour éliminer le risque et préventives pour l'éviter.

Des systèmes de nettoyage des canalisations et de surface de travail à base d'antiseptiques et de désinfectants, de filtration de l'air et de lampes ultraviolettes ont été utilisés pour détruire les germes responsables des risques de souillure des aliments.

Deuxièmement, la qualité microbiologique des produits alimentaires est fonction de l'efficacité des traitements thermiques de pasteurisation ou de stérilisation mis en œuvre et de la non rupture de la chaîne du froid pendant toute la durée de conservation de l'aliment.

La décontamination thermique par la chaleur humide (autoclave) ou sèche (Four) est mesurée en couple temps/T°C, et est fonction de la charge microbienne initiale, de la nature de la

denrée, de la thermorésistance de la bactérie, de la conception des appareils (surface d'échange), *etc.* Les différents traitements thermiques sont :

- ✓ Thermisation (63-65 °C / 15-20 s) : sans effet sur les bactéries pathogènes, elle diminue la charge globale en bactéries.
- ✓ Pasteurisation (Basse = 63 °C / 30 min, Haute = 72 °C / 15 s) : elle diminue le nombre de cellules végétatives et particulièrement les pathogènes. De ce fait, la date Limite de Consommation (DLC) du produit est améliorée. Cependant, le produit reste périssable et doit être conservé à basse température.
- ✓ Stérilisation (120 à 140 °C pendant quelques secondes pour le lait et plus de 30 min pour les conserves) : elle détruit toutes les bactéries et surtout les formes résistantes (spores). Le produit est stable et conservable à température ambiante.

La préservation des aliments est également obtenue par des moyens complémentaires comme la diminution de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) par séchage, salaison ou concentration, la mise en œuvre d'atmosphères modifiées pour contrôler les parts en dioxygène et en dioxyde de carbone, et des moyens chimiques comme l'acidification et l'utilisation d'anti-oxydants (Gould, 1995).

Enfin, des moyens naturels pouvant directement agir sur l'aliment comme les acides carboxyliques et leurs sels (acétique, propionique, lactique, benzoïque), les enzymes comme le lysozyme, des molécules complexes capables de fixer le fer indispensable à la croissance de certains microorganismes (lactoferrine, sidérophores, *etc.*), ou de certaines molécules biologiquement actives comme les bactériocines sont étudiés et pour certains déjà appliqués industriellement pour lutter contre les contaminants microbiens indésirables ou pathogènes des aliments. A ce niveau, les bactéries lactiques, qui sont utilisées habituellement en tant qu'agent technologique de fermentation, peuvent être utilisées en tant qu'agent de préservation des aliments (Bester et Lombard, 1990). En effet, l'activité anti-microbienne des bactéries lactiques est due à la production de nombreuses molécules dont principalement les acides carboxyliques, l'hydroperoxyde, les bactériocines, les alcools, le CO<sub>2</sub>, et les enzymes. Le caractère anti-microbien est d'autant plus efficace que ces bactéries lactiques sont capables de croître dans un environnement alimentaire défavorable, avoir une bonne stabilité dans les conditions technologiques de fabrication, de production et de conservation du produit

alimentaire, et de produire dans ces conditions les molécules inhibitrices en quantité suffisante. L'effet inhibiteur des bactéries lactiques est en fait un effet synergique entre l'ensemble des molécules anti-microbiennes, amélioré par la conservation à basse température. De plus, les bactéries lactiques inhibent la croissance de bactéries pathogènes par un effet de compétition par rapport au substrat (Nillson *et al.*, 1999).

Quelques applications alimentaires des bactéries lactiques sont présentées dans le Tableau 1.

<i>Bactéries lactiques</i>	<i>T°C</i>	<i>Inoculum (UFC.ml<sup>-1</sup>)</i>	<i>Souches pathogènes testées</i>	<i>Application</i>
<i>Lc. delbrueckii</i>	5	5x10 <sup>8</sup>	<i>Pseudomonas</i> spp	Viande
<i>P. cepacia</i>	3	10 <sup>9</sup>	<i>Pseudomonas</i> spp.	volaille
<i>Lc. Lactis</i>	7	5x10 <sup>7</sup>	<i>E. coli</i> 0157:H7	volaille
<i>Lc. delbrueckii</i>	5-7	10 <sup>8</sup>	<i>P. fragi</i>	lait
<i>P. cepacia</i>	3	10 <sup>9</sup>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Oeuf
<i>Et. faecium</i>	3	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	poisson
			<i>C. botulinum et perfringens</i>	
<i>Lc. bavaricus</i>	4-10	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	bœuf
<i>Lb. casei</i>	4-8	10 <sup>8</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	légume
<i>Leuconostoc sp</i>	5	10 <sup>6</sup> -10 <sup>7</sup>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	crevette
<i>Carnobacterium</i>	5	5x10 <sup>6</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	saumon
<i>Lb. plantarum</i>	15	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	<i>S. aureus</i>	Milieu de culture

**Tableau 1 : Quelques applications alimentaires de cultures protectrices de bactéries lactiques (Rodgers, 2002)**

Dans la suite de la synthèse bibliographique, quelques-unes de ces molécules à effet anti-microbien dirigé contre les bactéries pathogènes ou altérantes sont présentées.

### I.1. Les acides carboxyliques et leurs sels

Les acides carboxyliques saturés et leurs sels les plus couramment utilisés en tant qu'agents de conservation sont : acide formique (H-COOH) et formiate ; acide acétique (CH<sub>3</sub>-COOH), acétate et diacétate ; et acide propionique (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) et propionate. Ces acides,

ajoutés ou libérés par un processus de fermentation *in situ* dans le produit alimentaire, ont un rôle anti-bactérien du fait de l'acidification du milieu. Le diacétate est un inhibiteur de moisissures et de *Bacillus* intéressant en boulangerie. L'acide propionique, à 1 %, protège les fromages à pâte cuite contre l'attaque des moisissures (Bourgeois *et al.*, 1996).

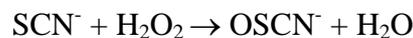
Au niveau des acides carboxyliques insaturés, l'acide sorbique (CH<sub>3</sub>-CH=CH-CH=CH-COOH) et ses sels sont de bons fongistatiques, à condition que les concentrations ne soient pas trop élevées, sinon, le sorbate devient une source en carbone métabolisable (Bourgeois *et al.*, 1996). Son action anti-microbienne est due à l'inhibition des déshydrogénases.

En ce qui concerne les acides carboxyliques aromatiques, l'acide benzoïque est surtout actif à pH inférieur à 4 sous sa forme non dissociée. Son mode d'action est encore mal connu, mais son spectre d'inhibition est surtout dirigé contre la croissance des levures (Bourgeois *et al.*, 1996). L'acide benzoïque est peu soluble dans l'eau et ce sont surtout les sels de sodium ou de potassium et les esters méthyliques et propyliques qui sont les plus utilisés.

## I.2. Les enzymes

### I.2.1. Le système LPPT

Le système LactoPéroxydase-Péroxyde-Thiocyanate est un système anti-microbien naturel du lait cru. La lactopéroxydase, en présence d'hydroperoxyde, catalyse l'oxydation du thiocyanate SCN<sup>-</sup> en ion hypothiocyanate OSCN<sup>-</sup> :



La forme OSCN<sup>-</sup> coexiste avec la forme neutre OSCNH d'autant plus que le pH est acide. Les ions sont de puissants oxydants qui attaquent préférentiellement les fonctions thiols des protéines-enzymes membranaires. L'activité de ce système a été démontrée sur plusieurs bactéries. Les Gram (-) restent cependant plus sensibles que les Gram (+) (Gaya *et al.*, 1991). Le système enzymatique résiste aux températures de pasteurisation du lait. Maintenu à basse température, la qualité sanitaire du lait et des produits dérivés est d'autant plus assurée.



### I.3. Les bactériocines des bactéries lactiques

#### I.3.1. Définition

Les bactériocines sont définies comme des molécules de nature protéique, synthétisées par voie ribosomique et douées d'une activité bactéricide ou bactériostatique (Tagg *et al.*, 1976, 1992). Parmi leurs caractéristiques communes, ces molécules sont synthétisées dans la cellule sous forme de polypeptides ou de précurseurs de polypeptides, qui subiront un processus de maturation au cours de leur transport vers le milieu extérieur (Cenatiempo *et al.*, 1996). Le spectre d'activité est plus ou moins large, quelques fois limité aux espèces phylogénétiquement proches des bactéries productrices. Parmi les bactéries lactiques productrices, sont recensés les lactobacilles, les lactocoques, les pédiocoques, les leuconostokes et les carnobactéries (Jack *et al.*, 1995).

#### I.3.2. Classification

La première classification fut élaborée par Klaenhammer en 1988. Elle séparait les bactériocines des bactéries lactiques en deux groupes, selon l'étendue de leur spectre d'inhibition. Sa classification fut réactualisée en 1993, suite au développement des méthodes biochimiques et génétiques, se basant alors sur la structure et le mode d'action des bactériocines. Jack *et al.* (1995), Nes *et al.* (1996) et Sahl et Bierbaum (1998) ont apporté de nouvelles données qui ont remis en cause les classes IIc et IV citées par Klaenhammer.

- Classe I : les lantibiotiques (2 sous classes Ia et Ib): leur taille est inférieure à 5 kDa. Ils contiennent entre 19 et 50 acides aminés inhabituels, modifiés post-traductionnellement comme la lanthionine, la 3-méthyl lanthionine, la 2,3-didéhydroalanine ou encore la 2,3-didéhydrobutyrine qui interviennent dans la formation de ponts thioether. La classe Ia, avec la nisine (*Lactococcus lactis*), regroupe des aminoacides thermostables, hydrophobes et cationiques. La classe Ib regroupe des aminoacides globulaires non chargés ou portant des charges nettes plutôt négatives.
- Classe II : Thermostables et de nature hydrophobe, leur taille n'excède pas 10 kDa.

Les bactériocines de la classe IIa ont en commun d'une part le fait de posséder une activité anti-*Listeria* à l'instar de la pédiocine (*Pediococcus acidilactici*). D'autre part, elles ont toutes la séquence en acides aminés suivante YGNGVXC (où X est un acide aminé variable) localisée en position N terminale. Il n'est pas clairement établi que ce motif a un rôle direct dans le caractère anti-*Listeria*, mais il semble que cette séquence soit un signal de reconnaissance de la cellule cible.

La classe IIb regroupe des bactériocines qui ont besoin de mettre en commun au minimum 2 petits peptides pour aboutir à un ensemble biologiquement actif. La lactococcine, plantaricine ou encore la lactacine entrent dans cette catégorie.

Les classes IIc (comprenant les bactériocines activées par les thiols) et IId sont encore peu ou mal étudiées.

- Classe III : Ce sont des protéines thermosensibles, de taille supérieure à 10 kDa. A ce jour, seule l'helvéticine, bactériocine de 37 kDa produite par *Lactobacillus helveticus* a été étudiée (Tagg, 1992).
- Classe IV : Très controversée, cette classe rassemblerait des bactériocines de haut poids moléculaire composées d'une partie protéique et d'une autre lipidique ou glucidique.

### **I.3.3.La nisine**

#### I.3.3.1. Généralités

Elle a été découverte dans les années 1920. Elle est produite par *Lactococcus lactis* spp *lactis*. Le terme nisine est issu de l'anglais N Inhibitory Substance. En 1988, elle a été reconnue GRAS par la Food and Drug Administration et est utilisée en tant qu'agent de conservation (E234) dans l'industrie alimentaire.

C'est un polypeptide thermostable de 3488 Da, composé de 34 acides aminés appartenant à la classe Ia des lantibiotiques (Figure 2).



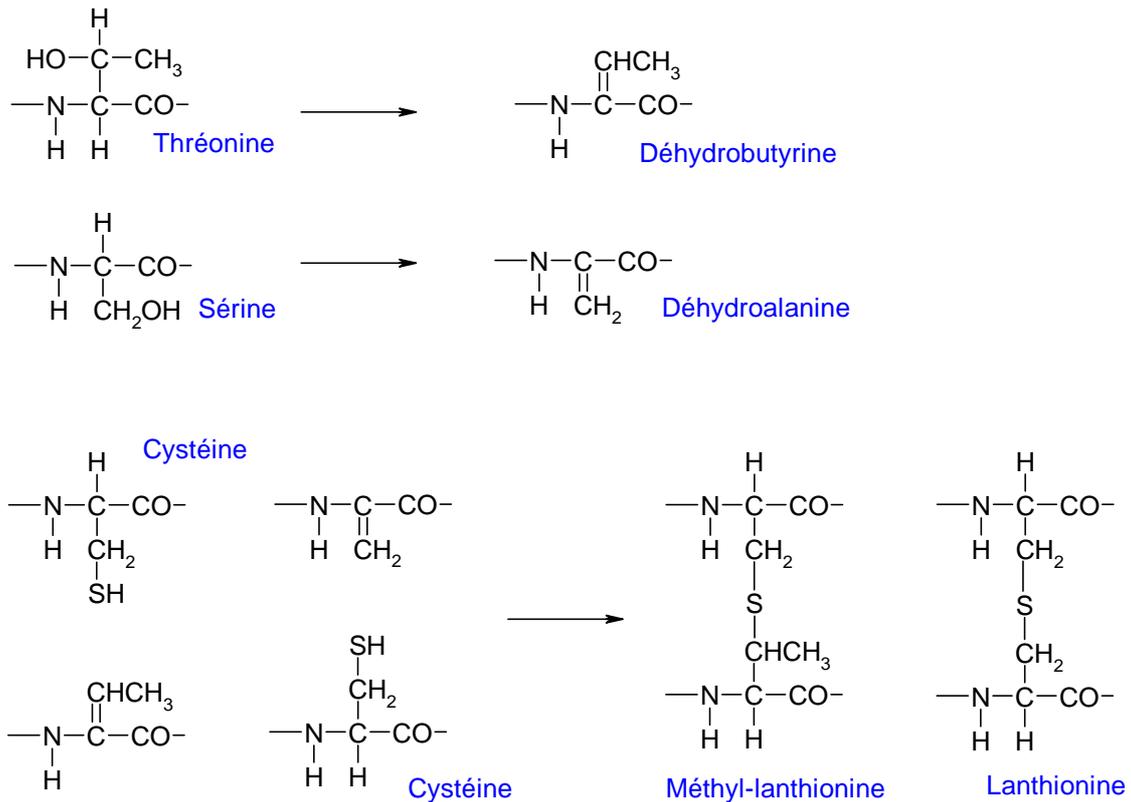


Figure 3 : Mécanisme de synthèse de la nisine à partir des résidus cystéine, sérine et thréonine

### I.3.3.2. Déterminant génétique

Le gène codant pour la nisine est organisé en opéron, d'une taille de 11 kb (Figure 4).

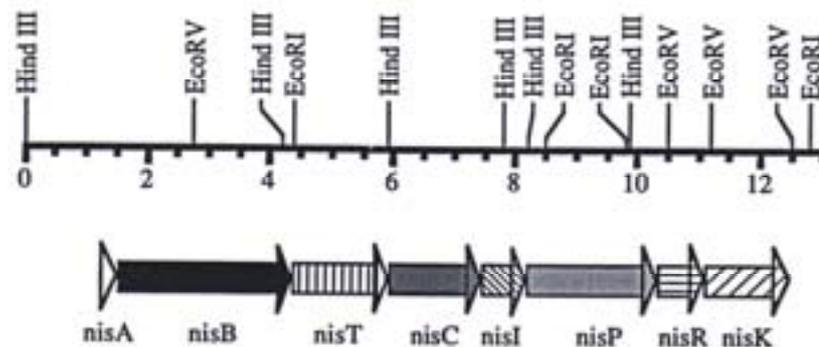


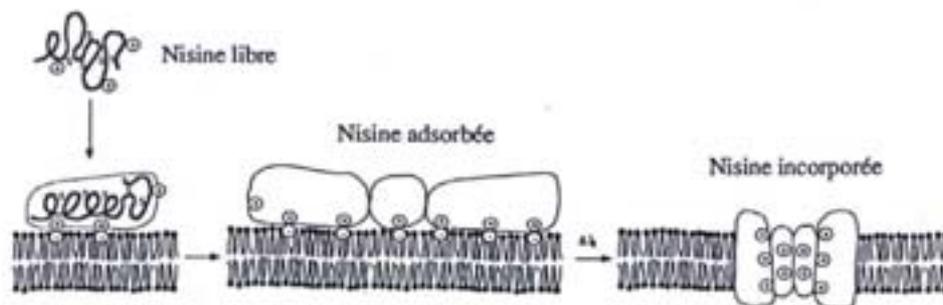
Figure 4 : Opéron nisine de *Lactococcus lactis* 6F3 avec tous les gènes et les sites de restriction (Engelke *et al.*, 1994)

C'est un transposon conjugatif associé à celui de l'utilisation du saccharose (Engelke *et al.*, 1994). Le gène *nisA* est un gène de structure. *nisB* et *nisC* sont impliqués dans la modification chimique et la sécrétion de la nisine (Kuipers *et al.*, 1993). Le gène *nisT* est certainement impliqué dans le transport de la nisine ou de son précurseur à travers la membrane

cytoplasmique (Havarstein *et al.*, 1995). Le gène *nisP* code pour une protéase à sérine probablement impliquée dans le clivage de la séquence signal. Les gènes *nisR* et *nisK* codent pour un complexe protéique de régulation, associé à une histidine-kinase. Le gène *nisI* code pour une lipoprotéine de 245 aminoacides, de 27,8 kDa responsable de l'immunité de la souche envers la nisine. Elle serait probablement localisée dans la couche externe de la membrane cytoplasmique.

#### I.3.3.3. Mode d'action

La nisine agit par formation de pores au niveau de la membrane des cellules cibles Gram + (Abee, 1995). Le mécanisme s'effectue en deux étapes. Il implique la création d'interactions électrostatiques entre substance inhibitrice et surface bactérienne (Figure 5). Ces liaisons sont possibles grâce à la charge nette positive du peptide et à la présence de phospholipides membranaires chargés négativement de la cellule cible (Martin *et al.*, 1996). Les bactériocines s'insèrent ensuite dans la membrane cellulaire lipidique grâce à leur partie hydrophobe, y forment des agrégats de structure oligomérique, débouchant sur la perméabilisation de la membrane par formation de pores transmembranaires : il y a alors libération d'ions  $K^+$ , d'acides aminés, d'ATP et dissipation de la force proton motrice des cellules cibles, suivie de la mort cellulaire (Driessen *et al.*, 1995).



**Figure 5 : Modèle d'action en « douves de tonneau » de la nisine au niveau de la membrane cytoplasmique des bactéries Gram + (Havarstein *et al.*, 1995)**

Le caractère "voltage-dépendant" de l'étape de formation des pores a été mis en évidence grâce à l'utilisation de vésicules lipidiques préalablement chargées en acides aminés marqués et sur lesquelles différents potentiels de membrane ont été appliqués (Sahl *et al.*, 1987). L'addition de nisine provoque l'efflux des acides aminés accumulés lorsque le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi$ ) minimal de -80 mV requis est atteint.

#### I.3.3.4. Propriétés physico-chimiques

La nisine a un pH isoélectrique  $pI = 8-9$ . Son activité, dépendante du pH, diminue lorsque le pH augmente et atteint son maximum à pH 5,8. A  $pH > pI$ , la nisine forme des multimères par des interactions inter-moléculaires responsables de la perte de l'activité biologique (Liu *et al.*, 1990). La nisine est plus soluble dans l'eau à pH bas qu'à pH proche de la neutralité. Sa solubilité passe de 57 à 0,25 mg.ml<sup>-1</sup> lorsque le pH varie de 2 à 8. De la même façon, on observe que la nisine se conserve mieux à 4 °C qu'à 20 °C (Hurst, 1981). Sa thermostabilité est aussi fonction du pH. En fait, l'activité résiduelle de la nisine reste stable à pH 2 après un traitement de 30 min à 120 °C. Par contre, elle est inactivée à hauteur de 40 % à pH 5 et à température ambiante, de 90 % à pH 6,8 et à 100 % à pH 7 (Driessen *et al.*, 1995). Les cinq ponts thioether semblent à l'origine de sa thermostabilité ainsi que de sa résistance aux enzymes, sauf à l' $\alpha$ -chymotrypsine. Dans les gammes de pH 2-8 et de températures 20, 37 et 75 °C, un optimum de thermostabilité est obtenu à pH 3, avec une stabilité à la température qui augmente avec la diminution du pH (Rollema *et al.*, 1995).

La nisine présente un caractère amphiphile avec une partie C-terminale plutôt hydrophile et une partie N-terminale plutôt hydrophobe (Breukink et De kruijff., 1999). Les aminoacides de la partie C-terminale sont responsables des interactions électrostatiques avec la membrane des cellules cibles. La partie N-terminale s'insère dans la membrane lipidique par l'intermédiaire des interactions hydrophobes pour former les pores et induire l'activité anti-microbienne de la nisine.

#### I.3.3.5. Applications

La nisine est aujourd'hui utilisée dans plus de 50 pays, dont les Etats-Unis, la Chine ou encore l'Angleterre (Tableau 2).

Pays	Produits	Quantités autorisées (UI.kg <sup>-1</sup> )
Abu Dhabi	Lait et fromage	Aucune limite
Etats-Unis	Variables par produits	Variables par produits
Belgique	Fromage	10 <sup>5</sup>
Czechoslovaquie	Fromage	2. 10 <sup>5</sup>
Danemark	Fromage	8. 10 <sup>6</sup>
France	Fromage	Aucune limite
Italie	Légumes en conserve, fromage	10 <sup>5</sup>
Mexique	Tout aliment	Sans limite

**Tableau 2 : Quelques exemples d'utilisation autorisée en alimentaire de la nisine dans différents pays (Delves-Broughton, 1990)**

Quelques études de l'activité anti-microbienne de la nisine contre des bactéries altérantes ou pathogènes sont présentés dans le Tableau 3.

Produits	Quantité (UI.kg <sup>-1</sup> )	Inhibition microbienne
Fromage	10 <sup>5</sup> -2,5x10 <sup>5</sup>	Germination de <i>Clostridium</i>
Fromage	5x10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup>	Production de toxines de <i>Clostridium botulinum</i>
lait	2x10 <sup>4</sup> -4x10 <sup>4</sup>	Germes totaux
Œufs liquides	2x10 <sup>5</sup>	Spores de <i>B. subtilis</i>
Produits à base de farine	1,5x10 <sup>5</sup>	Spores de <i>B. subtilis</i>
Poissons	2x10 <sup>7</sup>	Germination de <i>Clostridium</i>
Fromage	8x10 <sup>5</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Lait écrémé	5x10 <sup>4</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Kimchi	10 <sup>5</sup>	Lactobacilles
viande	4.10 <sup>5</sup>	<i>Bro. thermosphacta</i>

**Tableau 3 : Quelques études relatives au caractère anti-microbien de la nisine (Breukink et De Kruijff, 1999)**

### I.3.4. La pédiocine

#### I.3.4.1. Généralités

Très étudiée, la pédiocine est produite par *Pediococcus acidilactici*. Elle appartient à la classe IIa des bactériocines. La bactériocine comporte 44 acides aminés avec 2 ponts disulfures et de séquence peptidique :

KYYGNGVTCTGKHSCSVDWGWKATTCIINNGAMAWATGGHQQGNHKC

Une conformation tridimensionnelle fait apparaître en région N terminale une organisation en feuillets  $\beta$  qui rappelle une forme de « peigne à cheveux » et qui confère à la bactériocine un caractère amphiphile (Figure 6). La lysine et l'histidine respectivement en position 11 et 12 portent des charges positives responsables du caractère cationique de la molécule. Le pI entre 8 et 11 fait que la bactériocine est positivement chargée à pH acide ou proche de la neutralité. Les résidus valine (7 et 16), cystéine (9 et 14), et tryptophane (18) donnent une région N-terminale hydrophobe probablement responsable de l'insertion de la bactériocine dans la membrane de la cellule cible (Chen *et al.*, 1997).

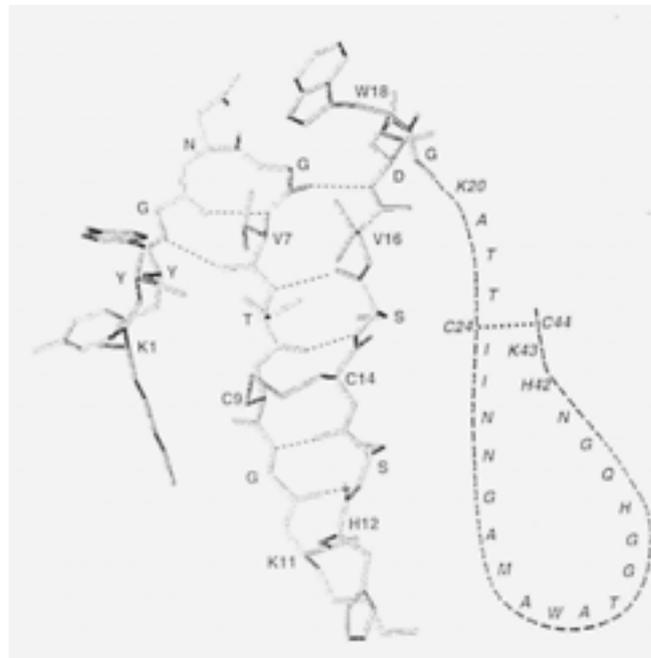


Figure 6 : Conformation tridimensionnelle de la pédiocine PA-1 (Montville et Chen, 1998).

#### I.3.4.2. Déterminant génétique

Le déterminant est plasmidique. De façon similaire à la nisine, il est organisé en opéron, avec un système de production de la bactériocine, de régulation, d'immunité et de transport. Ce système de transport ABC s'organise en 3 parties majeures :

- ✓ une partie centrale riche en hélice  $\alpha$  qui s'insère dans la membrane du fait d'un caractère hydrophobe, pour y créer un canal transmembranaire
- ✓ deux parties N et C terminales respectivement destinées à hydrolyser le pré-peptide en peptide d'une part et l'ATP d'autre part.

La synthèse de la pédiocine, comme généralement la synthèse des bactériocines, est régulée par un système de régulation répression qui met en jeu 3 facteurs de régulation : un facteur d'induction, une protéine de régulation réponse et d'une histidine protéine kinase (Nes *et al.*, 1996 ; Havarstein *et al.*, 1995).

#### I.3.4.3. Mode d'action

De la même façon que la nisine, la pédiocine, par interaction avec les lipides membranaires, forme des pores transmembranaires et dissipe complètement le gradient de protons  $\Delta pH$  et partiellement le potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi$ ) des cellules cibles. La perte de la force proton motrice, responsable des synthèses d'ATP, de la phosphorylation des protéines et en général des transports actifs, induit alors la mort cellulaire. L'action de la pédiocine provoque des fuites d'acides aminés et d'ions, mais pas d'ATP comme observé avec la nisine (Chen et Montville, 1995).

La nature des acides aminés apparaît primordiale dans l'activité anti-*Listeria* de la pédiocine. En effet, les acides aminés aromatiques sont essentiels. La substitution par l'arginine du tryptophane en position 18 réduit de moitié l'activité anti-bactérienne (Miller *et al.*, 1998). D'autre part, les résidus cystéine de par leur charge positive sont indispensables pour maintenir une bonne activité anti-*Listeria* de la pédiocine.

#### I.3.4.4. Applications

Les applications de la pédiocine sont aussi nombreuses que la nisine. L'activité antimicrobienne de la pédiocine est même plus importante que la nisine pour des produits de type viande (Baccus-Taylor *et al.*, 1993). Plusieurs études ont montré une activité inhibitrice de la pédiocine sur *L. monocytogenes*, *S. aureus*, les cellules végétatives de *B. cereus* et de *C. botulinum* et *perfringens* (Holzapfel *et al.*, 1995).

L'efficacité de la pédiocine a été également améliorée par un couplage avec les hautes pressions pour inhiber *S. aureus* ou le couplage avec des agents émulsifiants comme le Tween 80 pour limiter la croissance des *Listeria* (Cleveland *et al.*, 2001).

### **I.3.5. La curvaticine**

La curvaticine est une autre bactériocine, encore mal connue, appartenant à la classe des IIa. Elle a été extraite de *Lactobacillus curvatus* en 1993 (Sudirman *et al.*, 1993). Son poids moléculaire est de 4-5 kDa, avec un nombre d'acides aminés de 35 à 45 (Garver et Muriana, 1994). La curvaticine présente un large spectre d'activité sur *S. aureus*, *B. cereus* et sur plusieurs souches de lactobacilles. La curvaticine est insensible à la catalase et est détruite totalement par la chymotrypsine et partiellement par la trypsine. Elle est inactive à pH 7 et est dénaturée à pH inférieur à 3. La bactériocine est thermostable à pH 3 ou 7 après 4 h de traitement à 80 °C et perd 40 % de son activité à pH 9 (Garver et Muriana, 1994). Son mode d'action est identique à celui de la nisine ou de la pédiocine.

### **I.3.6. Association bactériocine / autres molécules**

Pour améliorer l'activité anti-bactérienne et pour limiter les phénomènes de résistance, ou encore pour lutter contre les bactéries Gram (-) insensibles aux bactériocines de bactéries lactiques, les bactériocines ont été associées à d'autres composés pour améliorer les durées de conservation des aliments.

La combinaison nisine-pédiocine a démontré une amélioration significative de l'activité antimicrobienne sur plusieurs bactéries Gram (+) comme *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes* par rapport à l'utilisation de la nisine ou de la pédiocine seule (Hanlin *et al.*, 1993).

De la même façon, l'inhibition de *L. monocytogenes* par la nisine associée à la sakacine (bactériocine de *Lactobacillus sakei*) est plus importante qu'avec la nisine seule (Katla *et al.*, 2001). Dans ce cas, autant l'incorporation de la sakacine directement que l'introduction de la culture de *Lb. sakei* productrice de la sakacine présentent, par rapport à l'utilisation de la nisine seule, un effet anti-bactérien qui augmente les temps de conservation du saumon.

L'effet dans un premier temps du lysozyme, suivi de l'action de la nisine, montre que les bactéries Gram (-) sont lysées par la nisine. Le nombre de *Campylobacter jejuni*,

*Pseudomonas fluorescens* ou encore *Salmonella enterica* est diminué de l'ordre de 6 log sous l'action de la nisine dès que le lysozyme à une concentration de 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  est utilisée (Carneiro *et al.*, 1998). De la même façon, un agent chimique chélatant tel que l'EDTA provoque une désorganisation de la membrane externe des bactéries Gram (-) pour permettre l'action de la nisine. La diminution du pH indispensable à l'action de l'EDTA permet en parallèle d'améliorer l'effet de la nisine (Boziaris et Adams, 1999).

L'étude de l'effet anti-microbien sur *L. monocytogenes* et *S. aureus* de la nisine en fonction des paramètres température, pH et concentration en NaCl montre clairement qu'un effet synergique est engendré quand la température et le pH diminuent et que la concentration en NaCl augmente (Thomas *et al.*, 1996).

L'utilisation de tensioactifs : stéarate et palmitate de saccharose améliore l'activité anti-microbienne de la nisine sur *L. monocytogenes*. Pendant que le tensioactif seul ne montre aucun effet bactéricide, le couplage de ces deux composants diminue synergiquement l'effet de la nisine. Les tensioactifs, probablement via des interactions entre le pôle hydrophobe et les lipides des membranes cibles, désorganisent la membrane externe des bactéries et amplifient l'effet de la nisine. Cependant, l'activité sur des bactéries Gram (-) n'a pas pu être mise en évidence (Thomas *et al.*, 1998).

Le couplage de la nisine avec la carvacrole, composé phénolique présent dans les huiles essentielles de thym, a permis d'augmenter l'activité anti-microbienne de la nisine sur des cellules végétatives de *B. cereus*. Dans cette étude, 3  $\text{mmol.l}^{-1}$  de carvacrole n'induit aucun effet, tandis que cette même concentration additionnée en nisine diminue significativement la viabilité de *B. cereus*. Un pH 6 au lieu de 7, avec une conservation à 8 au lieu de 30 °C, améliore les propriétés anti-microbiennes et augmente la stabilité microbiologique du produit alimentaire (Periago et Moezelaar, 2001).

## II Caractères physiologiques et pathologiques des souches étudiées : *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*

### II.1. Caractères généraux de *L. monocytogenes*

#### II.1.1. Caractères bactériologiques

*L. monocytogenes* est un bacille aéro-anaérobie à Gram positif, de 0,5 à 2,0 µm de longueur sur 0,4 à 0,5 µm de diamètre, ni encapsulé, ni sporulé. *L. monocytogenes* est catalase (+) et super oxyde dismutase (+), ce qui lui permet de s'adapter à des conditions défavorables en dégradant le peroxyde d'hydrogène et les radicaux super oxyde  $O_2^-$  en eau et oxygène (Buchanan et Klawitter, 1990)

La bactérie est mobile grâce à des flagelles péritriches en culture à 20-25 °C et immobile en culture à 37 °C.

*L. monocytogenes* se différencie des autres espèces du genre *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* et *L. grayi*) par les tests hémolyse (+), test de Camp sur *S. aureus* (+), Camp test sur *Rhodococcus equi* (-), D-xylose (-), L-rhamnose (+), Ribose (-) et Mannitol (-) (Rocourt *et al.*, 2000).

Les techniques de sérotypage ont identifié 12 sérovars pour *L. monocytogenes* sur la base de 15 antigènes somatiques de paroi O de 1 à 15 et de 5 antigènes flagellaires H de a à e : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7. Les sérovars 1/2a, 1/2b et 4b sont retrouvés dans les principaux cas de listériose.

En laboratoire, *L. monocytogenes* est cultivée sur des milieux de cultures riches tels que cœur-cerveille ou peptone additionnée d'extrait de levure. L'esculine et le citrate de fer stimulent la croissance. Le fer est un facteur déterminant de croissance (Phan-Thanh et Gordon, 1997).

La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C. La tolérance varie entre -2 °C avec un taux de croissance  $\mu_{\max}$  de 0,009 h<sup>-1</sup> et 45 °C avec un  $\mu_{\max}$  de 1,080 h<sup>-1</sup> (Bajard *et al.*, 1996). *L. monocytogenes* n'est pas ou peu thermo-résistante. 60 °C est une température suffisante pour une destruction totale et rapide. Toutefois, la composition du milieu, le pH et l'état physiologique sont autant de paramètres qui modifient sa thermosensibilité (Breand *et al.*, 1998). La bactérie s'adapte au stress thermique en modifiant la

composition biochimique de sa membrane. Le rapport en acides gras saturés sur insaturés varie en fonction de la température pour moduler la fluidité membranaire.

La bactérie se multiplie entre pH 4,6 et 9,6 avec un optimum à pH 7,1. La bactérie est détruite à pH supérieur à 10 ou à pH inférieur à 4. Cependant, la réponse au stress surtout alcalin est démontrée dans de nombreux cas (Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998).

Les pH acides ont un effet anti-bactérien contre *L. monocytogenes* qui varie selon la nature de l'acide carboxylique utilisé. La sensibilité de *L. monocytogenes* aux acides peut être classée selon l'ordre décroissant suivant : acide acétique, acide lactique, acide citrique, acide malique et acide chlorhydrique (Sorrels *et al.*, 1989).

L'activité de l'eau ( $a_w$ ) minimale est de 0,90. L'halophilie de *L. monocytogenes* ne dépasse pas en général 10-11 % en NaCl (Vasseur *et al.*, 1999). L'adaptation à des valeurs d' $a_w$  plus faibles résulte d'une adaptation des bactéries à des stress osmotiques induisant des phénomènes de plasmolyse importants. La réponse au stress est différente : elle peut être primaire, en accumulant des ions cationiques sodium ou potassium (Salt-in-cytoplasm), ou en incorporant des molécules organiques dites compatibles ou osmo-protectrices de type sucre (tréhalose), acides aminés et dérivés (glutamate, proline) ou ammoniums quaternaires et dérivés sulfonium (Glycine bêtaïne) (Kempt et Bremer, 1998).

Face à l'effet des hautes pressions, *L. monocytogenes* résiste moins par rapport à *E. coli*, *Salmonella Enterica* ou *S. aureus*. Une dose de 2 kGy suffit pour détruire la bactérie (Osterholm et Potter, 1997).

Enfin, les désinfectants couramment utilisés en industrie agroalimentaire tels que les dérivés chlorés, iodés ou les ammoniums quaternaires utilisés à des concentrations respectives de 100 ppm, 25-45 ppm ou 100-200 ppm suffisent pour inhiber la bactérie.

### **II.1.2. Isolement et identification**

En France, la réglementation en vigueur impose une absence totale de la bactérie dans 25 g de produits alimentaires à la production. Un nombre de germes inférieur à 100 bactéries dans 25 g ne doit pas être dépassé au moment de la consommation du produit, c'est à dire à la date limite de consommation.

La complexité des matrices alimentaires constitue la principale difficulté des méthodes de détection, d'isolement et de dénombrement. Les normes NF/EN ISO 11290-1 pour la détection, NF/EN ISO 11290-2 pour le dénombrement et la norme NF V08055 pour la routine

nécessitent aujourd'hui 4 à 5 jours pour rechercher *L. monocytogenes*. Ces méthodes restent tout de même difficiles et lourdes à mettre en œuvre avec un enrichissement primaire et secondaire en bouillon Fraser et un isolement sélectif sur Palcam ou Oxford (Figure 7).



Figure 7 : Recherche de *Listeria monocytogenes* selon la norme NF/EN ISO 11290-1 (1997)

La souche *Listeria monocytogenes* est ensuite confirmée par les tests hémolytique (+), Camp test sur *S. aureus* (+) et l'assimilation du rhamnose et non du xylose.

Par ailleurs, l'AFNOR a validé un certain nombre de techniques dites rapides pour rechercher *L. monocytogenes*. Celles-ci s'appuient soit sur des milieux de culture spécifiques (Rapid'L.Mono®, Sanofi diagnostic Pasteur, BioRad), soit sur des tests immunoenzymatiques (Vidas Listeria®, Biomérieux), soit encore sur des tests génétiques par hybridation des acides nucléiques (PCR Genetrak®, Diffchamp).

### II.1.3. Niches écologiques et conséquences en alimentaire

*L. monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire communément rencontrée dans les eaux, les sols et particulièrement dans la végétation en stade avancé de décomposition. Le sol est une source primaire de contamination, avec essentiellement les sols agricoles recevant du matériel végétal en décomposition et des déjections animales par épandage (Fenlon, 1999).

*L. monocytogenes* est retrouvée dans les excréments d'animaux sains comme malades, principalement d'herbivores, mais également de porcs, de volailles, de chiens ou de chats.

Par ailleurs, la bactérie peut survivre plusieurs semaines dans les sols ou eaux usées.

Dans l'environnement domestique, 20 % des échantillons analysés sont positifs. *L. monocytogenes* est isolée à plus de 17 % sur les torchons de cuisine, 10 % dans les salles de bains, 2 % sur les brosses à dents et 2,5 % en réfrigérateur. Dans ces cas, le nombre de bactéries dépasse les 100 à 1000 germes par cm<sup>2</sup> (Beumer *et al.*, 1996).

Dans les filières agroalimentaires, les élevages industriels de porcs et de volailles montrent une faible contamination par *L. monocytogenes* (2 à 7 % de cas positifs). Cependant, le sérovar 4b est souvent dominant (Adesiyun et Krichnam, 1995).

En industrie de transformation des viandes, selon les méthodes d'échantillonnage, de recherche et d'isolement mises en oeuvre, les écart-types sont trop élevés pour permettre des conclusions majeures. Cependant, il apparaît clairement que l'amplification est réelle entre l'élevage (2 à 7 % de cas positifs) et la découpe (36 % de cas positifs pour des épaules ou colliers de porc par exemple). Les surfaces de travail et les machines ont été identifiées comme source de contamination dans 70 à 100 % des cas (Radas *et al.*, 1999).

En production laitière, là où la bactérie est le plus souvent mise en évidence, 0,3 à 14 % de cas positifs sont identifiés dans le lait cru. Le lait traité thermiquement est en théorie exempt de toute contamination (aucune étude significative). En terme d'amplification, la transformation laitière affiche des résultats similaires aux autres filières de transformation (Ryser, 1999).

Le cycle hypothétique de contamination par *L. monocytogenes* illustre comment les différents habitats et réservoirs contribuent à la progression de la bactérie (Figure 8) (Brackett, 1988).

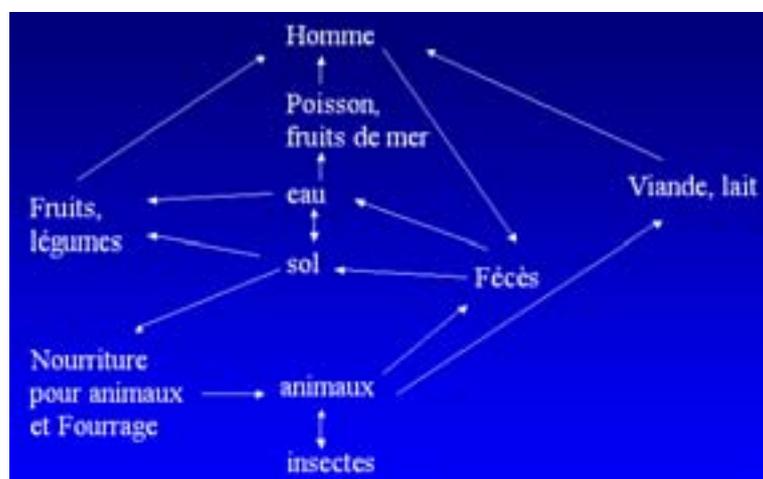


Figure 8 : Cycle hypothétique de contamination par *L. monocytogenes*

## II.1.4. Pathologie Humaine

### II.1.4.1. Toxi-infection alimentaire

Les toxi-infections alimentaires sont à 95 % d'origine microbienne. Si en terme de fréquence, *L. monocytogenes* vient après *Salmonella cholerasuis* (75 %), *Clostridium perfringens* (5-7 %), *S. aureus* (5-7 %) et *Bacillus cereus*, en terme de dangerosité, elle se situe juste après *Salmonella cholerasuis* et avant *E. coli*. Les causes d'intoxications sont par ordre d'importance : la mauvaise réfrigération, la consommation d'aliments crus ou insuffisamment cuits, la consommation de produits périmés et enfin la consommation d'aliments souillés par des surfaces de travail ou les outils mal désinfectés.

Les aliments incriminés, principalement mis en cause dans les intoxications à *L. monocytogenes* sont les produits carnés (16 %) avec plus de 45 % pour la charcuterie, les produits de la mer (10 %) et le lait et produits dérivés (8 %) (plans de surveillance DGCCRF 1993-1996).

Les risques de la maladie sont très variables et sont fonction autant de la nature du microorganisme que de l'état physiologique de la personne intoxiquée. Les personnes à risque sont principalement les personnes immunodéprimées, enceintes ou encore les populations trop jeunes ou trop âgées.

Les symptômes sont souvent diarrhée, crampe abdominale, nausée et fièvre pour les cas bénins, pour induire des septicémies ou méningites pour les cas les plus graves.

La listériose est en France aujourd'hui une maladie à déclaration obligatoire (Décret n° 98-69 du 13 mars 1998). Mais l'épidémiologie reste difficile et largement sous-estimée, car elle ne prend en compte que les personnes hospitalisées ou diagnostiquées. Les derniers cas de toxi-infections alimentaires engendrés par *L. monocytogenes* en France et depuis 1990 sont résumés dans le Tableau 4 (Goulet *et al.*, 1998 et presse non publiée).

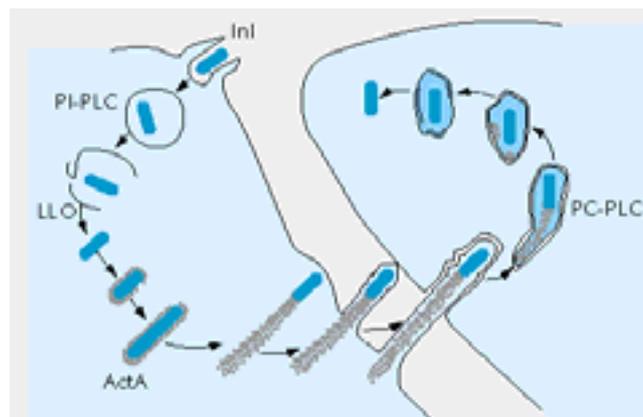
Année	Nombre de cas (décès)	Produits incriminés	Nombre d'UFC.g <sup>-1</sup>
1992	279 (88)	Langues de porc en gelée et charcuterie	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
1993	38 (12)	Rillettes	10 <sup>1</sup> -10 <sup>4</sup>
1995	36 (8)	Brie	-
1997	14 (-)	Livarot	-
1999	3 (2)	Epoisses	-
1999	10 (-)	Rillettes	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>
1999-2000	32 (-)	Langues de porc en gelée et charcuterie	-

**Tableau 4 : Epidémies de listériose survenues en France depuis 1990**

Les cas de mortalité varient généralement entre 25 et 30 %. Le nombre de germes par gramme est calculé sur des prélèvements à la distribution et chez le consommateur.

#### II.1.4.2. Pathogénicité

Une bactérie est pathogène lorsque celle-ci est susceptible d'induire une maladie après infection de l'hôte. La pathogénicité se mesure en dose infectieuse DI50 où 50 % des sujets infectés sont malades ou morts. Le pouvoir pathogène est très dépendant des facteurs de virulence : adhésion sur membrane intestinale, invasion, acquisition de nutriments, appauvrissement des réserves de l'hôte et production de toxines (Figure 9).



**Figure 9 : Les étapes du parasitisme intracellulaire de *L. monocytogenes* (selon Berche)**

Inl : internaline    LLO : listériolysine O    PI-PLC : phosphatidyl-inositol phospholipase C    ActA : actine A

- ✓ La porte d'entrée de l'infection, chez l'homme, est le plus souvent le tube digestif à la suite de l'absorption d'aliments contaminés. Les bactéries entrent en contact étroit avec les cellules hôtes grâce à une protéine de 80 kDa appelée l'internaline (Gaillard *et al.*, 1991). Cette protéine, exposée à la surface de la bactérie, interagit avec des récepteurs de type E-cadhérine présents sur les cellules et induit un processus s'apparentant à la phagocytose.
- ✓ À l'intérieur des cellules, les bactéries se trouvent dans le compartiment phagosomal. Elles s'en échappent par destruction de la membrane du phagosome du fait de l'action synergique de la listériolysine O (une exotoxine hémolytique) et d'une phosphatidylinositol phospholipase C produites par la bactérie. Les bactéries accèdent ainsi au cytoplasme et se multiplient dans cet environnement favorable.
- ✓ Dans le cytoplasme, *L. monocytogenes* acquière les nutriments en puisant dans les réserves de la cellule hôte. Pour assurer le fonctionnement de sa chaîne d'oxydoréduction et disposer surtout du  $Fe^{2+}$ , qui est présent dans le cytoplasme soit sous forme ferrique  $Fe^{3+}$  soit associé aux protéines de transport, *L. monocytogenes* secrète des molécules de type cathécoles ou phénolates et des sidérophores qui soit entrent en compétition avec les protéines de transport par une meilleure affinité vis à vis du fer, soit transforment le fer  $Fe^{3+}$  en fer  $Fe^{2+}$  assimilable par la bactérie.
- ✓ La multiplication bactérienne intra cytoplasmique s'accompagne d'une polymérisation de l'actine à la surface des bactéries créant une « comète » d'actine qui favorise la propulsion des bactéries à l'intérieur de la même cellule et hors de la cellule pour en infecter d'autres comme les fibroblastes et les hépatocytes. *L. monocytogenes* peut se disséminer par voie sanguine et infecter le système nerveux central et le placenta (Tilney *et al.*, 1990).

## II.2 Caractères généraux de *S. aureus*

### II.2.1 Caractères bactériologiques

Ce sont des coques de 0,8 à 1  $\mu m$  de diamètre, Gram positif, qui se regroupent généralement en grappes de raisin. *S. aureus* est immobile et non sporulé (Leclerc *et al.*, 1995).

Aérobic anaérobic facultatif, *S. aureus* se cultive sur des milieux ordinaires et s'accommode à de grandes variations de températures de pH. Les températures minimales et maximales de

développement sont respectivement de 6 à 8 °C et de 45 °C. Ses températures optimales de croissance se situent entre 30 et 37 °C. Le germe se multiplie facilement à des pH variant entre 4,0 et 9,8, même s'il affectionne plutôt les pH légèrement acides. Il peut se développer dans des milieux dont l' $a_w$  est de 0,86 et tolère des concentrations en NaCl de l'ordre de 10 à 15 %.

*S. aureus* est catalase (+), oxydase (-), nitrate réductase (+) et fermente le glucose et le mannitol (Prescott *et al.*, 1995).

Une série de 23 phages est utilisée pour classer l'espèce en différents lysotypes. Les souches de *S. aureus* appartiennent principalement aux lysotypes I, II, III et IV.

De nombreuses souches sont toxigènes et produisent les entérotoxines staphylococciques A à E, les toxines exfoliatives A et B (dermatite exfoliatrice du nourrisson) et la toxine du choc toxique staphylococcique. Le syndrome du choc toxique est une affection polyviscérale. Seule une multiplication importante de *S. aureus* entérotoxigène ( $>10^5$  germes par gramme) permet une production d'entérotoxines en quantité notable dans l'aliment pour provoquer une intoxication.

De nombreuses souches sont multirésistantes à la méthicilline et à la vancomycine.

*S. aureus* est sensible à de nombreux désinfectants : hypochlorite de sodium à 1 %, solutions d'iode et d'alcool, glutaraldéhyde et formaldéhyde (Leclerc *et al.*, 1995).

### **II.2.2 Isolement et identification**

Le milieu d'isolement le plus employé en bactériologie alimentaire est le milieu de BAIRD PARKER amélioré par l'ajout de plasma de lapin (test coagulase). C'est un milieu riche et complexe comprenant 3 agents sélectifs (tellurite de potassium, glycine et chlorure de lithium), un activateur de croissance (le pyruvate de sodium) et un agent protecteur contre l'effet toxique du tellurite (le jaune d'œuf).

Sur ce milieu, les colonies de staphylocoques pathogènes apparaissent noires après 24 heures à 37 °C (réduction du tellurite), brillantes et bombées.

### **II.2.3 Niches écologiques et conséquences en alimentaire**

Les aliments souvent contaminés par les Staphylocoques sont principalement les pâtisseries à la crème, les crèmes glacées, les aliments traités tels que les jambons, les pâtés et les

rillettes ; les salades de pomme de terre, de volaille et de thon ; les produits cuits contaminés après cuissons (viandes hachées, poissons, tranches de charcuterie) ; les produits à teneur en eau réduite (salaisons, poissons séchés et fumés, lait en poudre) ; les fromages à la suite d'une acidification insuffisante du caillé et enfin les ovoproduits, mayonnaise et produits laitiers (Leclerc et *al.*, 1995).

Pour contrer son développement, la cuisson complète des aliments est la seule solution. De plus, le port obligatoire de gants et de masques évite la contamination des aliments par des opérateurs porteurs sains.

Les modes de transmission sont nombreux : contact avec les porteurs qui hébergent l'organisme dans les fosses nasales (30-40 % de la population) ; contact avec les écoulements de lésions ou les sécrétions purulentes ; transmission de personne à personne ; ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine staphylococcique (les aliments peuvent être contaminés par les mains des personnes qui les manipulent) et transmission de la mère à l'enfant pendant l'accouchement.

#### II.2.4 Réglementation

Au niveau de la réglementation française, *S. aureus* est dénombré et ses toxines dosées. Les critères microbiologiques varient selon la nature de l'aliment et le type de conservation (Tableau 5). Cependant, il faut  $5.10^5$  à  $5.10^6$  de germes par gramme d'aliment et 3,5 µg d'entérotoxines consommés pour déclencher les troubles. Chez les sujets les plus sensibles, 100 ng pourraient être suffisants.

<b>Viande crue</b>	100	<b>Légumes cuits</b>	10	<b>Viandes cuites</b>	10	<b>pâtes</b>	500
<b>Poisson cuit</b>	10	<b>Mayonnaise</b>	10	<b>Potages</b>	10	<b>Pâtisserie</b>	100
<b>Crudités</b>	500	<b>Desserts</b>	10				

**Tableau 5 : Critères microbiologiques retenus pour l'appréciation de conformité (nombre de germes de *S. aureus* par gramme de produit alimentaire) - Réglementation française Arrêté du –21-16679**

## II.2.5 Pathologie Humaine

### II.2.5.1. Les toxines

L'entérotoxine de *S. aureus* est une exotoxine protéique, inodore, incolore et thermostable. Elle résiste à l'ébullition pendant 30 min. Mais sa résistance à la chaleur dépend de plusieurs facteurs (sérotipe, concentration, degré de pureté, nature du milieu, *etc.*).

En industrie agroalimentaire, les entérotoxines ne sont pas complètement inactivées dans les conditions normales de cuisson ou de pasteurisation.

Les entérotoxines résistent à l'action d'enzymes protéolytiques du tube digestif : trypsine, chymotrypsine, papaine et pepsine.

Ce sont des protéines globulaires formées d'une seule chaîne polypeptidique dont le poids moléculaire est compris entre 28 000 et 35 000 daltons.

Les entérotoxines sont faiblement antigéniques. 7 entérotoxines différentes sont identifiées et appelées A, B, C1, C2, C3, D, E1 et TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1 "anciennement F"). Les entérotoxines C1, C2 et C3 possèdent le même site antigénique majeur et sont souvent regroupées sous la dénomination d'entérotoxine C (Bourgeois *et al.*, 1996).

La production d'entérotoxines B et C est contrôlée par des plasmides et s'effectue principalement à la fin de la phase stationnaire de croissance, tandis que la production des entérotoxines A, D et E est sous contrôle chromosomique et survient essentiellement pendant la phase logarithmique de croissance. Quelques heures (3 à 4 h) à température ambiante sont nécessaires pour que les staphylocoques se multiplient suffisamment et produisent des entérotoxines dans les aliments.

Une souche de staphylocoque peut produire 2 ou 3 sérotypes en même temps. Le gène de structure des entérotoxines est chromosomique. Cependant, certaines souches ne produisent l'entérotoxine B qu'en présence d'un plasmide qui pourrait être porteur de gènes de régulation ou d'expression (Leclerc *et al.*, 1995).

Les plus fréquemment impliqués dans les Toxi-Infections Alimentaires (TIA) (80 % des cas) sont les entérotoxines A (65 % en France) puis la décroissance D, C et B. Le biotype B serait la deuxième cause de TIAC en France (20 %).

### II.2.5.2. Infections

L'intoxication alimentaire se caractérise par une survenue subite et brutale de nausées sévères, de crampes, de vomissements, de diarrhées et de céphalées qui durent habituellement 1 à 2

jours. Les infections profondes englobent la méningite, l'arthrite septique et la pneumonie. Les intoxications entraînent la perte de mobilité et la destruction nucléaire des leucocytes. La bactérie libère aussi des enzymes comme la coagulase, la fibrinolysine, la désoxyribonucléase, la hyaluronidase et la pénicillinase. Dans l'organisme, la coagulase entraîne la formation d'un caillot endoveineux de fibrine, protégeant le germe de la phagocytose et induisant la prolifération microbienne.

### III Les bioemballages

Afin de réduire le volume de déchets de matériaux d'emballage synthétiques à base de polymères d'origine pétrochimique qui posent un problème environnemental, l'élaboration de nouveaux emballages comestibles ou biodégradables à usage alimentaire constitue une alternative très intéressante en complément au recyclage.

Le rôle des emballages est de protéger l'aliment des attaques du milieu extérieur (microbiologiques, physico-chimiques, chimiques, *etc.*) et de garantir, notamment par un effet barrière, les qualités organoleptiques de l'aliment pendant sa conservation (Figure 10).

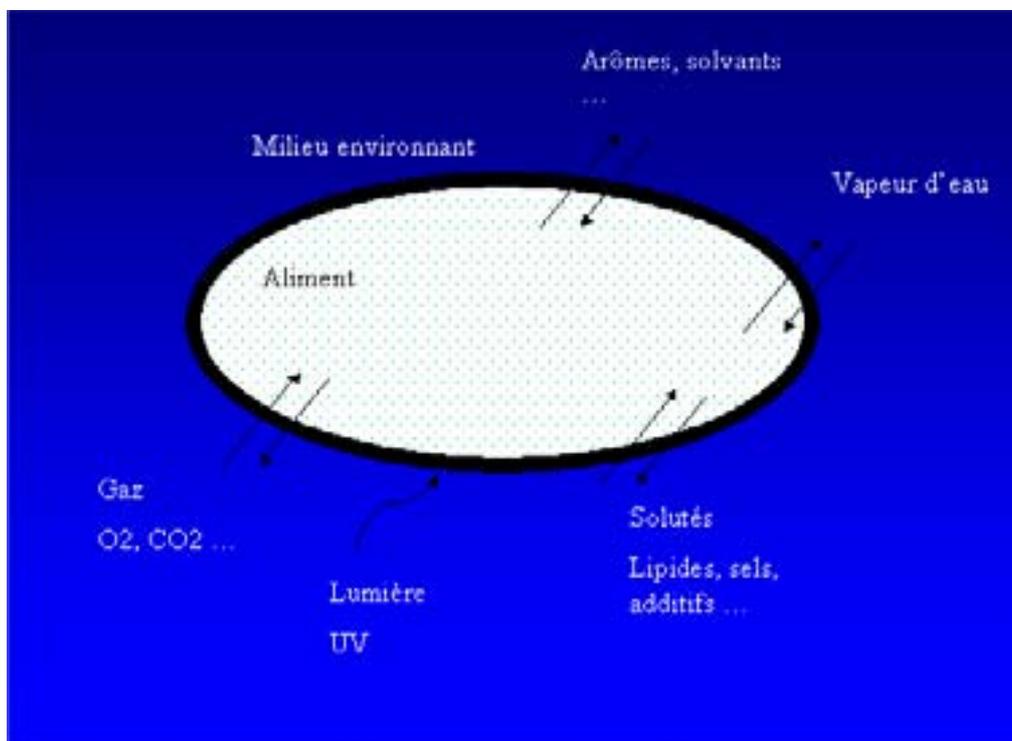


Figure 10 : Fonctions sélectives des films comestibles et enrobages (Debeaufort *et al.*, 1998)

A la différence des nombreux emballages synthétiques utilisés aujourd'hui, les emballages comestibles ou biodégradables sont constitués de macromolécules renouvelables, d'origine naturelle végétale ou animale, appelées biopolymères, tels les polysides (celluloses et dérivés, amidons et dérivés, *etc.*), les protéines (gélatine, gluten, *etc.*), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, *etc.*) et les polyesters (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate PHB ou valérate PHV, poly(acide lactique), *etc.*).

Les biopolymères potentiellement utilisés en tant que matrice comestible ou biodégradable peuvent ainsi être classés en trois catégories :

- Polymères produits par des microorganismes
- Polymères produits par synthèse chimique à partir de dérivés naturels
- Polymères à base de macromolécules d'origine naturelle

D'une façon générale, un film comestible est défini comme une fine couche de matériel comestible formé sur un aliment sous forme d'enrobage ou entre plusieurs compartiments d'un produit alimentaire composite (Quezada gallo, 1999). Dans le cas où le bioemballage ne fait pas partie intégrante de l'aliment et n'est pas ingéré en même temps que ce dernier mais élaboré à partir de biomolécules, il sera alors qualifié de biodégradable dans la mesure où sa bioassimilation a été évaluée.

Le rôle principal de films ou enrobages comestibles est de limiter les migrations de vapeurs d'eau, de dioxygène, de dioxyde de carbone, d'arômes, *etc.*, d'améliorer l'intégrité mécanique de l'aliment et d'être éventuellement le support d'ingrédients ou d'additifs alimentaires (Quezada Gallo, 1999).

Les performances des emballages à base de biopolymères restent cependant inférieures à celles des emballages synthétiques. Les principales propriétés physiques et physico-chimiques des différents matériaux d'emballages sont présentées dans le Tableau 6.

	<i>Propriétés mécaniques</i>	<i>Propriétés optiques</i>	<i>Solubilité dans l'eau</i>	<i>Propriétés barrière à la vapeur d'eau</i>
<b>Polymères synthétiques</b>	+	Transparent	<i>Non</i>	+
<b>polyosides</b>	+	Transparent	Oui	-
<b>protéines</b>	+	Transparent	oui ou non	-
<b>composés lipidiques</b>	+ ou -	Opaque	Oui	+
<b>polyesters</b>	+ ou -	Transparent- opaque	Oui ou non	+

**Tableau 6 : Quelques propriétés physiques et barrière de différentes catégories d'emballages (Mathlouthi, 1996)**

Les emballages basés sur les polyosides et les protéines présentent de bonnes propriétés autant mécaniques (force à la rupture et pourcentage d'élongation) qu'optiques

(transparence). Toutefois, leur sensibilité à l'eau (hydrosolubilité et propriété barrière à la vapeur d'eau médiocre) est le principal handicap de ces biopolymères.

Les emballages à base de polymères lipidiques et de polyesters sont opaques avec des propriétés mécaniques médiocres. Mais ces emballages présentent de bonnes propriétés barrière à la vapeur d'eau dues à leur caractère relativement hydrophobe.

Enfin et quelle que soit la catégorie, les biopolymères sont peu stables montrant une sensibilité à la dégradation microbienne, à l'oxydation (rancissement pour les composés lipidiques), et à l'humidité relativement importante.

Pour améliorer les performances des biopolymères en tant que matrice d'un bioemballage, plusieurs voies sont possibles :

- Mélanger les biopolymères aux polymères synthétiques pour augmenter la biodégradation ou biofragmentation (Colonna, 1992) : le PE est additionné par exemple d'amidon natif pour améliorer l'assimilation par les microorganismes (Savary, 1992).
- Associer les polymères osidiques ou protéiques à des composés lipidiques pour diminuer la sensibilité à l'humidité : l'utilisation de matières grasses (acides gras et dérivés) a vu plusieurs applications en films multicouches ou mono-couches par application de Cire (Cagri *et al.*, 2001), d'huiles de paraffine ou de palme hydrogénées (Quezada Gallo *et al.*, 2000), ou encore de mélange d'acides stéarique-palmitique (Kamper et Fennema, 1985).
- Utiliser uniquement les biopolymères et améliorer les propriétés physiques par modification enzymatique ou chimique.

Parallèlement à l'ensemble des propriétés physiques et physico-chimiques présentées ci-dessus, le bioemballage doit être en accord avec les exigences spécifiques du produit qu'il protège. En plus de sa propriété barrière à la vapeur d'eau qui conditionne les phénomènes de déshydratation ou de réhydratation des aliments, les bioemballages doivent par exemple posséder de bonnes propriétés barrière au dioxygène pour les aliments sensibles à l'oxydation. La spécificité des emballages en fonction de l'exigence du produit alimentaire est présentée dans le Tableau 7 (Carneiro *et al.*, 1998).

	Paramètres déterminant la conservation du produit					Composition en CO <sub>2</sub> requise	Propriétés barrière requises			
	T °C	temps	microbiologique	couleur	oxydation		O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Lumière
Viande	0-5	6-14j	x	x		20-30 %	++	++	++	
Poissons			x			40-60 % et diazote	++	++	+	
Poissons gras	0-5	1-7j	x		x		++	++	+	
Œufs	2-12	25j-4sem	x							
Lait	2-5	8j-...	x		x		++		++	++
Fromage	5	1j-8sem	x		x		++	+	++	+
Fruits et légumes	0-25	>1sem	x		x	Peu de dioxygène	++	++	++	++
Céréales	Amb	>1a			x		++	+	++	

**Tableau 7 : Propriétés requises pour les bioemballages pour quelques catégories de produits alimentaires (Amb : ambiante, j : jour, sem : semaine et a : année) (Carneiro *et al.*, 1998). x : identification des facteurs d'altération ; + : propriétés requises des matériaux ; selon leur degré d'importance**

### III.1 Formation et propriétés des bioemballages

#### III.1.1 Fabrication des films par voie humide (casting)

La formation des films à base d'hydrocolloïdes par voie humide se fait par coacervation d'une solution filmogène. La coacervation repose sur la séparation du matériau filmogène de la phase solvant par précipitation ou changement de phase sous l'effet du traitement thermique et de l'élimination par évaporation du solvant. La formation du film est le résultat de l'augmentation de la concentration en polymère, entraînant l'agrégation des molécules et la formation d'un réseau tridimensionnel. Ce procédé, parfaitement maîtrisé et appliqué en laboratoire, nécessite l'étalement de la solution filmogène en couche mince (casting). Les systèmes solvants utilisés pour la préparation des solutions filmogènes sont généralement à base d'eau et d'éthanol (Kamper et Fennema, 1984, 1985). Les propriétés des films formés par voie humide sont dépendantes des conditions de fabrication : humidité relative, vitesse et température de séchage (Debeaufort et Voilley, 1995).

A la différence des films multicouches, comportant une couche du biopolymère et une autre lipidique par exemple (Debeaufort *et al.*, 2000), les films composites incorporant différentes matières grasses pour améliorer les coefficients de transfert à la vapeur d'eau, peuvent être également obtenus en provoquant l'émulsion des lipides dans la solution filmogène avant formation du film (Cagri *et al.*, 2001 ; García *et al.*, 2000).

Deux autres voies de formation de film par voie humide se font soit par coacervation complexe, soit par coagulation thermique (gélification). La coacervation complexe consiste à mélanger deux hydrocolloïdes de charges électrostatiques opposées. L'interaction électrostatique forme des complexes multimériques de haut poids moléculaire qui finissent par précipiter. La gélification thermique est une dénaturation des hydrocolloïdes sous l'action de la température qui induit leur précipitation (agar, ovalbumine, gélatine).

### III.1.2 Température de transition vitreuse et cristallinité

Un polymère présente une zone amorphe caractérisée par une température de transition vitreuse ( $T_g$ ), ou partiellement cristalline caractérisée par une température de fusion (Figure 11).

Le phénomène de transition vitreuse sépare deux domaines où le film présente des structures et donc des propriétés nettement différentes. Au dessous de la  $T_g$ , le matériau est rigide, au dessus, il adopte un comportement viscoélastique voir liquide.

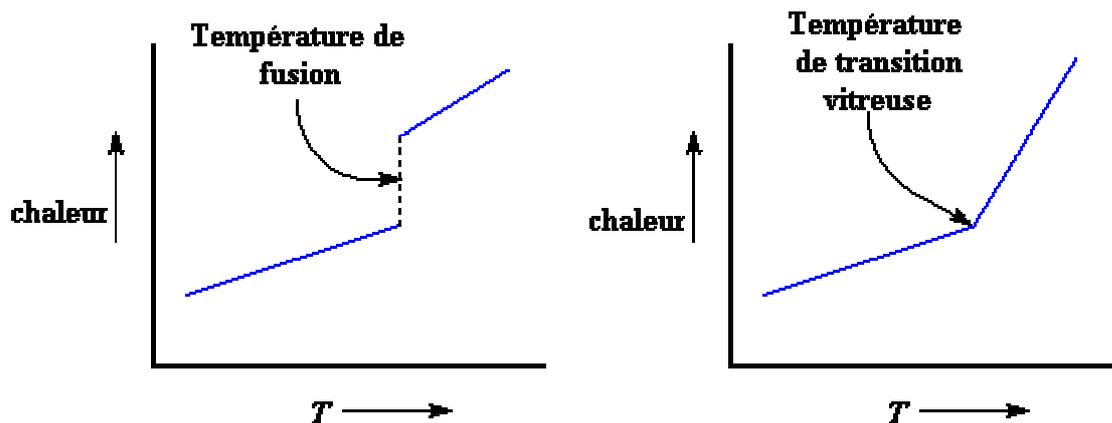


Figure 11 : Schématisation des températures de fusion et de transition vitreuse déterminées par ATD

La cristallinité d'un polymère est son aptitude à former des zones cristallines constituées par un empilement régulier et organisé de chaînes du polymère, liées entre elles par des liaisons

hydrogène et des interactions de Van der Waals. Un matériau peut être partiellement cristallin, avec des zones cristallines dites cristallites bien organisées et noyées dans un ensemble amorphe ou vitreux. La densité du matériau est fonction du taux de cristallinité, de même que les propriétés barrière du film aux gaz et aux vapeurs d'eau. Pour les matériaux cristallins ou semi-cristallins, la température de fusion illustre le passage d'une structure solide cristalline à une structure désorganisée liquide (Figure 11). La taille des cristallites influence aussi les qualités mécaniques des matériaux.

### **III.1.3 Résistance des films à l'immersion dans l'eau**

La résistance des films à l'immersion dans l'eau dépend de la nature et de la densité des interactions stabilisant le réseau. Un film est soluble lorsque les interactions entre les molécules du film possèdent une énergie inférieure à celle que peuvent donner avec l'eau les fonctions polaires libres du film non impliquées dans le réseau. La solubilité du film diminue aussi avec l'importance du nombre de liaisons covalentes qui figent le film et empêchent sa déstructuration.

La solubilité dans l'eau est une propriété importante qui conditionne l'application potentielle des matériaux. Des films à faible solubilité dans l'eau sont nécessaires pour la protection d'aliment à forte  $a_w$ . Les films hydrosolubles sont intéressants pour des applications dans les domaines des emballages comestibles ou micro-encapsulation.

De façon générale, les bioemballages sont relativement hydrosolubles et cette propriété peut être diminuée par mise en œuvre de liaisons intermoléculaires covalentes (Zhou *et al.*, 1995) ou par association de polymères à solubilité différente et addition de composés hydrophobes.

### **III.1.4 Plastifiants**

Les plastifiants ont essentiellement la fonction d'améliorer les propriétés mécaniques. Le plastifiant augmente ainsi la souplesse du polymère. C'est une substance à faible volatilité destinée à réduire les liaisons hydrogène inter-chaînes, conduisant à une plus grande flexibilité et extensibilité des matériaux (Banker, 1966). Les plastifiants les plus utilisés sont les phtalates, les diesters, dérivés époxydés d'acides gras, les polyadipates de glycol, *etc.* Les plastifiants diminuent les énergies d'activation de la diffusion de vapeurs, ce qui diminue l'efficacité barrière des enrobages. Le PEG, sorbitol, glycérol sont couramment utilisés

comme plastifiants dans les bioemballages à base de cellulose (Debeaufort et Voilley, 1995 ; Kim et Ustunol, 2001).

L'eau est le plastifiant le plus répandu des matériaux à caractères hydrophile, l'HR ambiante influencera donc ses propriétés mécaniques et barrière.

### **III.1.5 Propriétés mécaniques**

Pour maintenir son intégrité, un film d'emballage doit être capable de résister aux contraintes imposées pendant le transport, le stockage et la distribution des produits alimentaires. Les propriétés mécaniques dépendent de l'influence des interactions, de leur probabilité d'établissement et des énergies mises en jeu. Ces qualités mécaniques sont largement associées à la distribution et à l'intensité des interactions inter et intra chaînes. Des phénomènes de coopération se mettent en place pour une stabilité thermodynamique suffisante. D'une manière générale, lorsque les liaisons covalentes stabilisent le réseau ou lorsque la densité d'énergie est importante, les films sont résistants et rigides. Au contraire, lorsque les interactions sont en majorité de faible énergie, les films sont largement déformables et plastiques. Des films résistants à la rupture et flexibles (déformation plastique suffisante) sont généralement souhaitables pour les bioemballages. Les propriétés mécaniques dépendent aussi des conditions de fabrications (vitesse de séchage, température), de leur composition (plastifiants, lipides) et de la nature des solvants (Yang et Paulson, 2000; Debeaufort *et al.*, 2000 ; Kestler et Fennema, 1989).

Dans n'importe quel polymère, deux types de forces sont mises en jeu : des forces de cohésion (entre les molécules du polymère) et des forces d'adhésion (entre le film et l'aliment). Le degré de cohésion influence les propriétés du film, comme la résistance mécanique, la flexibilité, la perméabilité, *etc.* La cohésion dépend de la structure chimique du film, de la procédure de fabrication, la présence de plastifiants, d'agents de réticulation et de l'épaisseur finale du film. La cohésion du film est favorisée par la taille longue des chaînes du polymère (Guilbert *et al.*, 1996).

### III.1.6 Propriétés barrière à la vapeur d'eau

La perméabilité à la vapeur d'eau est un paramètre déterminant pour garantir les qualités organoleptiques du produit alimentaire et lutter contre les phénomènes de déshydratation ou de réhydratation. Le transfert de vapeur d'eau est décrit par des lois faisant références aux trois étapes qui régissent la perméation d'un composé à travers une membrane: adsorption du perméant sur le matériau, diffusion à travers le film sous l'action d'un gradient de concentration et enfin désorption.

A l'état stationnaire, pour une température et une différence de pression partielle constante, le flux de perméat est décrit par la loi de diffusion de Fick (Crank, 1975) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D \frac{\partial C}{\partial x} \right) \quad (1)$$

où **D** est le coefficient de diffusion apparent et  $\frac{\partial C}{\partial x}$  représente le gradient de concentration à travers un différentiel d'épaisseur  $x$ .

Le phénomène de sorption dépend de la solubilité. On définit un coefficient de solubilité **S** qui décrit la dissolution d'un perméant dans un polymère. Elle constitue une caractéristique thermodynamique du système perméant-polymère. A l'équilibre thermodynamique, si la solubilité est indépendante de la concentration du perméant absorbé, la pression partielle **p** de la vapeur d'eau et sa concentration **C** dans le film sont reliées par la loi de Henry (Redl *et al.*, 1996) :

$$C = S \times p \quad (2)$$

avec **S** : coefficient de solubilité et **p** : pression partielle de la vapeur d'eau

Si **D** et **S** sont indépendants de la concentration du perméant dans le film, la perméabilité à la vapeur d'eau (**Pm**) s'écrit :

$$Pm = D \times S \quad (3)$$

avec **S** : coefficient de solubilité et **D** : coefficient de diffusion

En supposant  $D$  et  $S$  constant, les équations 1, 2 et 3 donnent :

$$Pm = \frac{\Delta Q \cdot e}{\Delta t \cdot A \cdot (p_1 - p_2)} \text{ avec } CTVE = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot A}$$

Où  $\Delta Q$  est la quantité de vapeur d'eau (g) qui traverse un film de surface  $A$  ( $m^2$ ) et d'épaisseur  $e$  (m) pendant un intervalle de temps  $\Delta t$  (s) sous une différence de pression partielle ( $p_1 - p_2$ ).

La perméabilité n'est une propriété universelle du film que dans la mesure où les lois de Fick et de Henry s'appliquent, lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre le film et le perméant. Dans la plupart des films à base de biopolymères,  $D$  et  $S$  sont dépendants de la différence de pression partielle. Une augmentation de la pression partielle de vapeur d'eau augmente par exemple le transfert de vapeur d'eau en raison de l'hydrophilie du matériau.

Le caractère hydrophile des bioemballages explique leurs propriétés barrière à la vapeur d'eau médiocres. L'utilisation de lipides (acides gras et dérivés) sous forme d'émulsion ou de bicouches permet d'augmenter leur hydrophobicité et par la même réduire leur CTVE (Cagri *et al.*, 2001 ; Quezada Gallo *et al.*, 2000 ; Kamper et Fennema, 1985). L'efficacité des composés lipidiques dépend de leur caractère hydrophobe (longueur des chaînes alkyles), de leur degré d'insaturation et de leur point de fusion (plus il est bas, et plus le transfert de vapeur d'eau est importante).

### III.2 Les polymères produits par les micro-organismes : exemple des polyesters

Les PolyHydroxyAlcanoates (PHA) sont produits par *Alcaligenes eutrophus* ou *Pseudomonas oleovorans* (Figure 12). Ces bactéries, cocco-bacilles, aérobies, chimio-organotrophes, produisent le monomère en état de stress créé par un excès en source de carbone et par un manque en l'un des nutriments essentiels suivants : diazote, sulfate, phosphate, fer, magnésium ou potassium (Timm et Steinbüchel, 1990). Dans la cellule, l'accumulation de PHA apparaît sous forme d'inclusion ou de granules dans le cytoplasme. En moyenne, les inclusions de PHA contiennent 40 % d'eau, 2 % de protéines et 0,5 % de lipides. Plusieurs inclusions peuvent apparaître au sein de la même cellule, et la quantité en PHA peut atteindre

98 % de la masse sèche dans certaines conditions de croissance d'*A. eutrophus* (De Smet et Eggink, 1983).

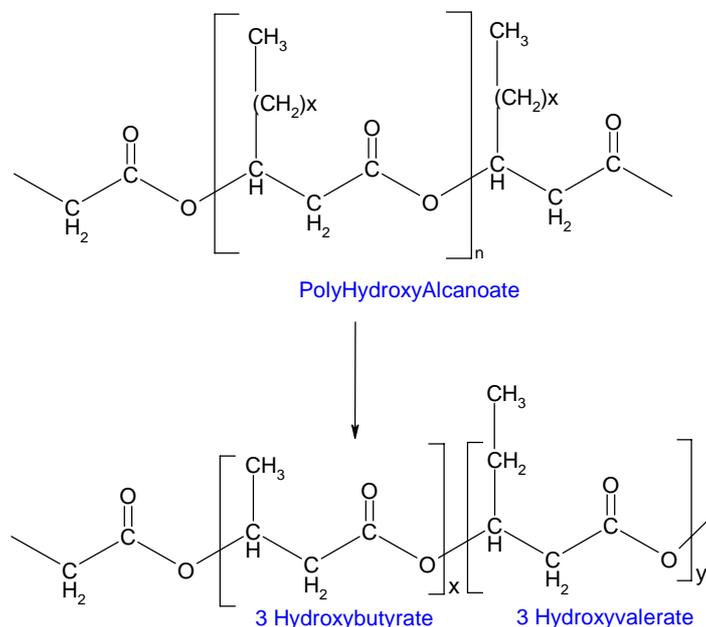


Figure 12 : Structure chimique du PHA, PHB et PHV

La voie de synthèse des PHA est aujourd'hui bien connue. Deux molécules d'acétyl-CoA peuvent être condensées en acétoacétyl-CoA, qui sera réduit en 3hydroxybutyryl-CoA puis polymérisé en PHB sous l'action d'une polymérase (Holmes, 1987).

La maîtrise des conditions de fermentation permet d'obtenir et de moduler les parts en HydroxyButyrate (HB) et en HydroxyValerate (HV). La présence simultanée de glucose et d'acide propionique aboutit à la production de copolymères Poly(3-HB-3-HV). Selon la nature du substrat carboné utilisé, quelques exemples de ratios entre PHB et PHV sont présentés dans le Tableau 8. Ces ratios conditionnent les propriétés physiques du film.

Source de carbone	Quantité (g.l <sup>-1</sup> )	PHA ( % p/p matière sèche)	PHA-composition ( %)	
			3HB	3HV
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	20	35	100	0
<b>CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COOH</b>	20	31	69	31
<b>CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH</b>	20	51	25	75
<b>OH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OH</b>	15	17	70	30

Tableau 8 : Variation du ratio HB-HV en fonction du substrat carboné utilisé (Doi et Segewa, 1990)

A ce jour, seul le poly(3HB) et poly(3HV) ont été obtenus industriellement.

Les films à base de PHA ont d'excellentes propriétés filmogènes. Ils sont non hydrosolubles et sont facilement industrialisables du fait d'un procédé de fabrication similaire au polyéthylène ou polypropylène.

La seule limite à leur utilisation est actuellement leur coût, du fait de l'étape de purification après réaction dans le fermenteur.

L'HB donne des films durs et rigides, alors que l'HV améliore l'élasticité et la sensation au toucher (Petersen *et al.*, 1999). Le caractère hydrophobe des PHA, supérieur à celui des films osidiques ou protéiques, donne de bonnes propriétés barrière à la vapeur d'eau.

A notre connaissance, les films à base de PHA n'ont pas vu à ce jour des applications en alimentaire, et ce malgré une potentialité liée à des propriétés barrière et mécaniques supérieures aux autres bioemballages. De plus, le mode de fabrication des PHA peut être aisément adaptable en industrie par extrusion. Par contre, en application médicale, les films à base de PHB sont déjà utilisés car ils sont non toxiques, compatibles avec les tissus et le sang et surtout biodégradables. Des films de 100 µm ont ainsi été utilisés comme patch gastro-intestinal. Le film à base de PHB natif se dégrade naturellement dans l'organisme de 50 % au bout d'un an (Freier *et al.*, 2002).

### III.3 Les polymères produits par synthèse chimique à partir de dérivés naturels : Exemple de l'acide polylactique : PLA

Les PLA sont des biopolymères renouvelables, obtenus par simple polymérisation de l'acide lactique. Celui-ci peut être obtenu par fermentation ou synthèse chimique. La fermentation est très utilisée du fait d'une abondance du substrat carboné utilisé, l'amidon, mais elle présente un surcoût lié, comme pour les PHA, à la phase de purification. La fermentation peut être homofermentaire en libérant totalement du lactate ou hétérofermentaire en libérant en plus du CO<sub>2</sub> et de l'éthanol.

La synthèse chimique produit des mélanges racémiques D et L, qui ne présentent toutefois aucune différence au niveau des propriétés physiques du film (Lalla et Chung, 1990).

La cinétique de réaction de polymérisation est favorisée par la formation d'un intermédiaire lactide en présence d'oxyde de zinc et à fortes températures (135 °C, 6 h), suivie de l'ouverture du cycle et de la polymérisation (Lalla et Chung, 1990) (Figure 13).

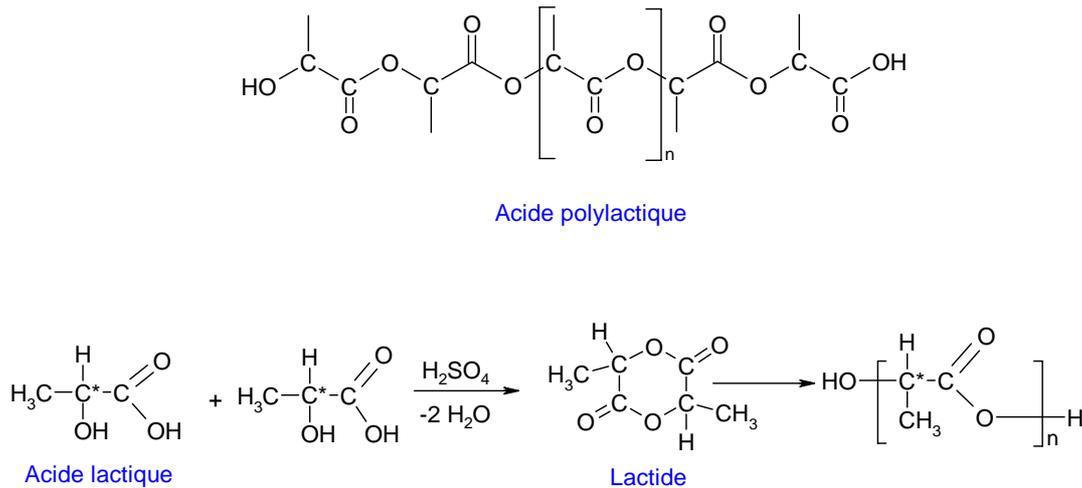


Figure 13 : Structure chimique des PLA et schématisation de la polycondensation chimique

Le lactide favorise la polymérisation pour atteindre des chiffres élevés avoisinant les  $250\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Les films à base de PLA ont de bonnes propriétés mécaniques et thermoplastiques. Ils sont hautement cristallins. Les températures de fusion sont de l'ordre de  $190\text{ °C}$  et les PLA ont une température de transition vitreuse comprise entre  $55$  et  $60\text{ °C}$ .

Dans un mélange de polymères de PLA de haut et bas poids moléculaires, respectivement HPM et BPM, les BPM jouent le rôle de plastifiant et diminuent la température de transition vitreuse. Les ratios HPM/BPM permettent de moduler les propriétés mécaniques et de contrôler la biodégradation qui augmente avec la part des BPM (Mauduit *et al.*, 1996).

Généralement, les forces à la rupture et l'allongement sont respectivement de  $50 \text{ MPa}$  et  $2\%$ . Cependant, l'association PLA-caprolactone réduit les forces à la rupture à  $20 \text{ MPa}$  et améliore l'allongement d'un facteur 100, donnant des films très flexibles.

La copolymérisation permet aussi de baisser la température de transition vitreuse en dessous de  $7\text{ °C}$ , et même à  $-9\text{ °C}$  quand le poids moléculaire est réduit de  $50\%$  (de  $44700$  à  $21800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Viljanmaa *et al.*, 2002).

Leur biocompatibilité trouve de multiples applications dans le biomédical (Freier *et al.*, 2002).

En alimentaire, l'enrobage de morceaux de viandes par des solutions à  $2\%$  de PLA incorporant de la nisine, a permis de diminuer la population de *L. monocytogenes* de  $0,5$  à  $1 \text{ log}$  (Ariyapitipun *et al.*, 2000).

Conn *et al.* (1994) ont étudié la potentialité des films à base de PLA en application alimentaire, en analysant en particulier l'effet toxicologique des molécules du film qui peuvent migrer vers le produit alimentaire. Parmi ces composés, acide lactique, acide lactoylactique (dimère), trimer et lactide sont les seules molécules susceptibles de migrer du film vers l'aliment. Retrouvé à des valeurs inférieures à 0,018 ppm dans différents modèles alimentaires testés, l'extrapolation à l'homme montre que l'on ne dépasse pas  $0,054 \text{ mg.j}^{-1}$  par personne, qui correspond à 0,25 % des valeurs réglementant l'acide lactique en tant qu'additif en utilisation alimentaire. Les auteurs ont conclu donc à la non toxicité des films à base de PLA.

### III.4 Les Polymères à base de macromolécules d'origine naturelle: Exemple des hydrocolloïdes

Seuls seront traités dans ce travail les matériaux d'emballage à base d'hydrocolloïdes (protéines ou polysaccharides), les composés lipidiques étant utilisés dans cette étude que sous forme d'émulsion dans la phase aqueuse.

Les hydrocolloïdes ont globalement de mauvaises propriétés barrière à la vapeur d'eau. Par contre, la propriété barrière au dioxygène et au dioxyde de carbone ainsi que les propriétés mécaniques sont globalement satisfaisantes (Greener-Donhowe et Fennema, 1994).

#### III.4.1 Les biopolymères protéiques

Les polymères protéiques possèdent un large potentiel en terme de liaisons et de configuration à l'origine de leur diversité fonctionnelle (Guilbert et Graille, 1994).

Le gluten a été très étudié en raison de sa disponibilité et de son prix de revient très compétitif. Dispersé dans un solvant approprié, étalé et séché, le film de gluten est transparent, rigide et insoluble dans l'eau. La barrière à l'eau reste faible, supérieure à  $1,05 \text{ g.mm.cm}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{mmHg}$  à  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  et sous une différence de pression partielle de 32-0 mmHg. L'addition de composés tels que des cires végétales a permis d'approcher les valeurs de perméabilité du polyéthylène (Gontard, 1991).

A partir du même matériau de base, des films possédant des propriétés fonctionnelles très différentes peuvent être obtenus en jouant sur les conditions de fabrication du film, la nature

des solvants et sur la concentration des additifs. L'addition de 20 % (p/p gluten) de lipides améliore les propriétés barrière du film à la vapeur d'eau (Redl *et al.*, 1996).

Les protéines myofibrillaires de poisson (PMF) peuvent être également utilisées en tant que matrice. Le pH et la concentration en protéines ont un effet majeur sur la structure des films. Avant la formation des films, les propriétés rhéologiques des solutions filmogènes sont très dépendantes du pH et de la concentration en protéines. Le pH modifie les charges et module les interactions électrostatiques entre protéines, ce qui modifie les liaisons intra et inter moléculaires. Un pH de 3 et une concentration en protéines de 2 % permettent d'obtenir des films avec de bonnes résistances mécaniques et de bonnes propriétés barrière à la vapeur d'eau (Cuq *et al.*, 1995).

La fabrication de films à base de protéines de lait est une des applications les plus étudiées. La solubilité des protéines dans l'eau, leurs propriétés émulsifiantes et nutritionnelles les rendent intéressantes. Maynes et Krochta (1994) ont amélioré la fabrication de ces films en limitant surtout la cristallisation du lactose encore présent dans le mélange de protéines de lait par addition de sorbate de potassium et par ultrafiltration. Les films ainsi obtenus ont des pourcentages d'élongation équivalents à ceux du chlorure de polyvinylidène (PVDC) et des valeurs de perméabilité à la vapeur d'eau de  $42 \times 10^{-11} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ .

Les protéines de petit lait ou de lactosérum (Whey Protéines WP) contenant plus de 75 % de lactoglobuline et environ 20 % en lactalbumine, les caséines (Siew *et al.*, 1999 ; Mauer *et al.*, 2000), et les gélatines sont autant d'autres biopolymères bien étudiés (Yang et Paulson, 2000 ; Sobral *et al.*, 2001a ; 2001b). Des films avec 11 % en WP et avec des ratios lipide/WP variant de 0,4 à 4 présentent des propriétés différentes selon le procédé de fabrication utilisé : enduction des lipides sur le film protéique ou émulsion directe des lipides dans la solution filmogène. Dans les deux cas, l'addition de lipides réduit de 50 à 70 % les valeurs du Coefficient de Transfert à la Vapeur d'eau (CTVE). Une trop forte agitation tend à augmenter les CTVE. En émulsion, le lipide joue un rôle de plastifiant, et permet d'élever les forces à la rupture (Anker *et al.*, 2002). Les films à base de WP sont hydrosolubles. L'incorporation de plastifiants dans les films selon les ratio WP : Glycérol (=1 : 0,7) réduit la solubilité dans l'eau de 30 %. Cette diminution de la solubilité est fonction de la nature du plastifiant et de sa concentration (Kim et Ustunol, 2001). L'hydrosolubilité des films à base de WP peut être modulée après action thermique. Alors que des films natifs sont parfaitement solubles dans l'eau, un traitement thermique de 70 °C pendant 20 min réduit de plus de 90 % la solubilité

des films. La température dénature les protéines. Les aminoacides hydrophobes et les cystéines initialement présentes et à l'origine au cœur de la molécule, sont déplacés vers la surface de la protéine réduisant ainsi les interactions potentielles avec l'eau (Perez-Gago et Krochta, 2001).

Les conditions de fabrication des films, et particulièrement l'épaisseur, déterminent les propriétés des films à base de protéines myofibrillaires. L'opacité relativement faible pour les films protéiques augmente avec l'épaisseur. Une relation linéaire montre que la force à la rupture augmente avec l'épaisseur. Le CTVE varie faiblement avec l'épaisseur avec tout de même un optimum à 10  $\mu\text{m}$  (Cuq *et al.*, 1996).

L'utilisation de plastifiants hydrophiles agit sur les liaisons moléculaires de faible énergie responsables de la rigidité et de la non flexibilité du biopolymère. Le sorbitol améliore la flexibilité et la plasticité du film, tout en diminuant les forces à la rupture. Les plastifiants hydrophiles augmentent l'élasticité du film en diminuant les liaisons hydrogène intermoléculaires (Cuq *et al.*, 1997).

### **III.4.2 Les biopolymères osidiques**

#### III.4.2.1 L'amidon

L'amidon, très abondant, renouvelable, biodégradable et peu cher peut être extrait des céréales, du riz et des pommes de terre avec des rendements moyens de 60 %. C'est un mélange d'amylose, unités glucose unies par des liaisons  $\alpha$ -1,4, linéaire et souvent en configuration hélicoïdale et d'amylopectine très ramifiée. L'amylopectine contient une partie linéaire formée d'unités glucose liées en  $\alpha$ -1,4, mais également des ramifications faisant intervenir des liaisons  $\alpha$ -1,6 toutes les 25 unités glucose en moyenne (Figure 14).

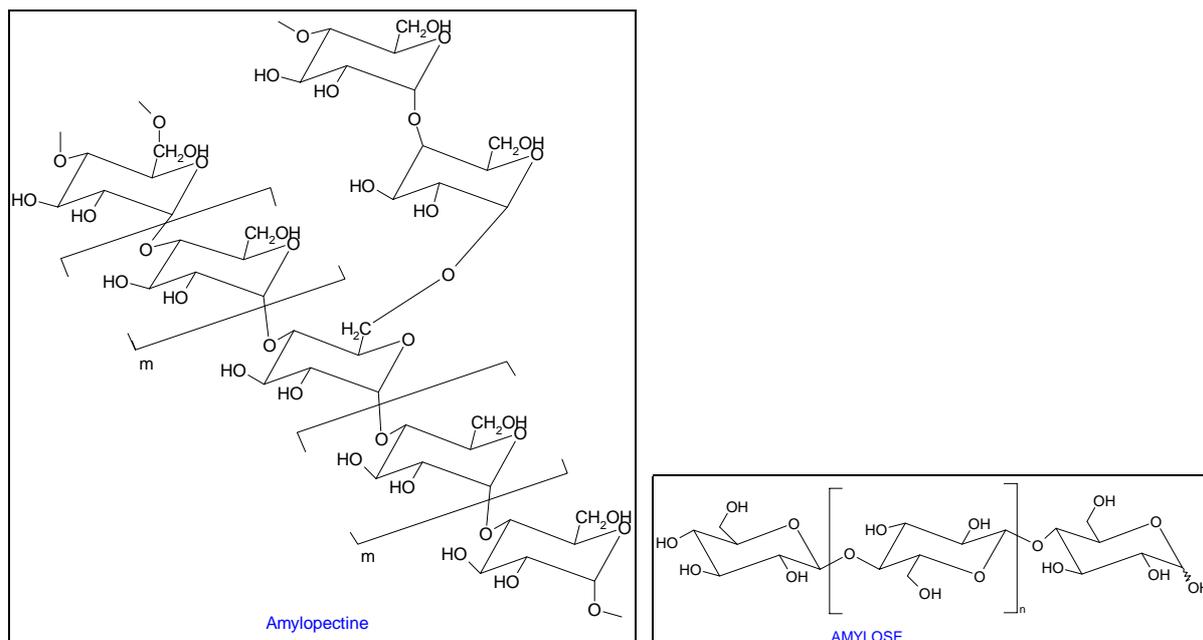


Figure 14 : Structure chimique de l'amylopectine et de l'amylose

La part dans le mélange de chacun des deux constituants varie avec l'origine végétale (Tableau 9).

	<i>Amylose</i> (%)	<i>Amylopectine</i> (%)
<i>Pomme de terre</i>	23	77
<i>Blé</i>	20	80
<i>Riz</i>	15 à 35	65 à 85
<i>Maïs</i>	25	75
<i>Banane</i>	17	83

Tableau 9 : Teneurs en amylose et en amylopectine d'amidons naturels

Les films sont transparents et thermoplastiques. La cristallinité du matériau est due à l'amylose et aux régions linéaires de l'amylopectine, qui s'organisent en hélice engendrée par des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre fonctions hydroxyles. La région ramifiée de l'amylopectine constitue plutôt une structure amorphe (Mathlouthi, 1996). Les propriétés filmogènes de l'amidon sont fonction du poids moléculaire moyen, des parts en amylose/amylopectine et donc du ratio cristallin/amorphe (Maynard, 1999).

La résistance mécanique des films d'amidon est intéressante, mais avec des propriétés barrière aux gaz modérées. L'amidon est surtout utilisé pour faire des emballages rigides et de

courte durée de vie du fait de sa sensibilité à l'humidité. Les amidons natifs trouvent des applications en agroalimentaire (boîtes à œufs, films de paillage agricole, colle, *etc.*). La compagnie « futur pop » commercialise par exemple 20 % moins cher des flocons qui remplacent les morceaux de polystyrène non biodégradables utilisés comme matériaux de calage de produits sensibles aux chocs.

Mais ce n'est qu'après modification physique, chimique ou enzymatique que l'amidon trouve ses principales applications : cosmétiques, colles, agroalimentaire (épaississant), bioemballages, *etc.*

Les films à base d'amidon sans plastifiant présentent des perméabilités aux gaz (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>) élevées avec par exemple des valeurs supérieures à 30x10<sup>-9</sup> cm<sup>3</sup>.m<sup>-1</sup>.sec.Pa<sup>-1</sup> dans le cas du CO<sub>2</sub> à 20 °C et 64 % d'humidité relative. L'addition de plastifiants, en diminuant l'hétérogénéité du film (craquelures, pores, *etc.*) réduit de plus du 2/3 le coefficient de transfert aux gaz, tandis que l'addition de lipides n'induit aucun changement significatif. Pendant le stockage, les plastifiants peuvent interagir avec la matrice polymérique et réorganiser l'ensemble pour voir apparaître une certaine recristallisation du film au bout de 60 jours, signe d'un début de dégradation, et donc de perte des propriétés filmogènes (García *et al.*, 2000).

#### III.4.2.2 La cellulose

C'est un homopolymère linéaire composé d'unités D-anhydrogluco-pyranose unies par des liaisons glucosidiques β-1,4. Il est également qualifié de polymères de cellobiose : deux unités glucose. La structure cristalline de la cellulose est due à une organisation en hélice maintenue vraisemblablement par des liaisons hydrogène entre l'hydrogène en (OH)<sub>3</sub> et l'oxygène en (OH)<sub>5</sub>, et entre l'hydrogène en (OH)<sub>2</sub> et l'oxygène en (OH)<sub>6</sub>. La cellulose est thermostable avec une température de dégradation supérieure à 230 °C.

Pour améliorer sa solubilité dans l'eau et lui conférer des propriétés filmogènes, la cellulose peut être estérifiée ou étherifiée au niveau des fonctions hydroxyles libres pour aboutir à certains dérivés cellulosiques comme l'acétate de cellulose, méthyl ou éthyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, ou hydroxypropylmethyl cellulose, relativement bien étudiés (Debeaufort et Voilley, 1995 ; Hjærtstam et Hjertberg, 1999 ; Ayranci et Tunc, 2001; De la Cruz *et al.*, 2001 ; Turham *et al.*, 2001).

Les dérivés de cellulose sont souvent solubilisés dans des mélanges eau/éthanol pour diminuer les temps de séchage du film. La formation des films est effectuée par casting (De la

Cruz *et al.*, 2001; Turham *et al.*, 2001) ou par pulvérisation sur surface plane (Hjærtstam et Hjertberg, 1999). Le procédé de fabrication, la composition de la solution filmogène et la nature de l'émulsion et de l'émulsifiant déterminent les propriétés physiques du film (Debeaufort et Voilley, 1995). L'hygroscopie des films de méthyl cellulose varie en fonction du taux de substitution des fonctions hydroxyles de la cellulose (Hjærtstam et Hjertberg, 1999). L'hygroscopie dépend également de la température et de la nature du substituant sur la fonction OH (De la Cruz *et al.*, 2001). Enfin, l'addition de lipides augmente le caractère hydrophobe du film et réduit le coefficient de transfert à la vapeur d'eau (Ayranci *et al.*, 2001).

Les films à base d'HPC, proche des films à base d'HPMC présentent une force à la rupture très proche de celle des films de PEBD et un pourcentage d'élongation performant au niveau des bioemballages (Tableau 10). Le caractère hydrophile du film HPMC explique ses propriétés barrière à la vapeur d'eau médiocres. L'utilisation de matières grasses (acides gras et dérivés) sous forme d'émulsion ou en bicouches permet d'augmenter le caractère hydrophobe du film et par la même réduire son CTVE (Cagri *et al.*, 2001 ; Quezada Gallo *et al.*, 2000 ; Kamper et Fennema, 1985). L'efficacité des composés lipidiques dépend de leur caractère hydrophobe (longueur des chaînes alkyles), de leur degré d'insaturation et de leur point de fusion : plus il est bas, et plus le transfert de vapeur d'eau est important.

	<b>Force à la rupture (MPa)</b>	<b>Elongation ( %)</b>	<b>CTVE (mol.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup>)</b>
Polyethylene haute densité	26	300	0,010 (38°C, 97-00 %HR)
Polyethylene basse densité	13	500	0,05 (38°C, 95-00 %HR)
MethylCellulose	56	18	5,23 (30°C, 11-00 %HR)
HydroxyPropylCellulose	15	33	2,89 (30°C, 11-00 %HR)
Film protéique	17	23	3,91 (25°C, 100-00 %HR)

**Tableau 10 : Comparatif des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau de quelques emballages synthétiques et bioemballages (Cuq *et al.*, 1995)**

Globalement, les films à base de cellulose modifiée ont des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau intéressantes comparées aux films synthétiques. Le coût de revient des films à base de dérivés cellulosiques reste compétitif (Tableau 11).

<i>polymère</i>	<i>Barrière à l'humidité</i>	<i>Propriétés mécaniques</i>	<i>Prix de revient estimé (€/kg<sup>-1</sup>)</i>
<i>Cellulose</i>	++	++	1,5-3
<i>Amidon</i>	++	++	2-4
<i>Protéines</i>	++	++	1-8
<i>PHA</i>	+	++	10-12
<i>PLA</i>	++	++	2-4
<i>Polyéthylène</i>	++++	++	1-2

**Tableau 11 : Comparatifs des biopolymères par rapport aux polymères synthétiques sur la base des propriétés physiques, barrière et de coût de revient (Petersen *et al.*, 1999)**

Les propriétés barrière aux gaz (dioxygène et dioxyde carbone) des films à base de dérivés cellulosiques sont aussi très intéressantes (Tableau 12).

<b>Film</b>	<b>Perméabilité à l'O<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>.m<sup>-1</sup>.j.<sup>-1</sup>.atm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Perméabilité à l'O<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>.m<sup>-1</sup>.j.<sup>-1</sup>.atm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Humidité relative (%)</b>
Pectine	57	-	87
Pectine	259	4132	96
Chitosane	91	1553	93
Gluten	190	4750	91
Protéine de poisson	169	2156	92
HMPC	47	180	52
Méthyl cellulose en bicouche avec de la cire	4	27	42
Méthyl cellulose en mono couche avec incorporation d'acide palmitique	79	-	100
PET	1	-	100

**Tableau 12 : perméabilités à 25 °C au dioxygène et au dioxyde de carbone de différents bioemballages, comparées au PET (Guilbert *et al.*, 1996)**

### III.4.2.3 Cas particulier des HydroxyPropylMéthylCellulose : HPMC

L'HPMC est un dérivé de cellulose particulièrement utilisé en industrie agroalimentaire en tant que gélifiant E464, additif alimentaire de la famille des agents de texture. Ces agents de charge sont habituellement classés en quatre groupes : émulsifiants, stabilisants, épaississants et gélifiants.

L'HPMC est un éther de cellulose non ionique (Figure 15).

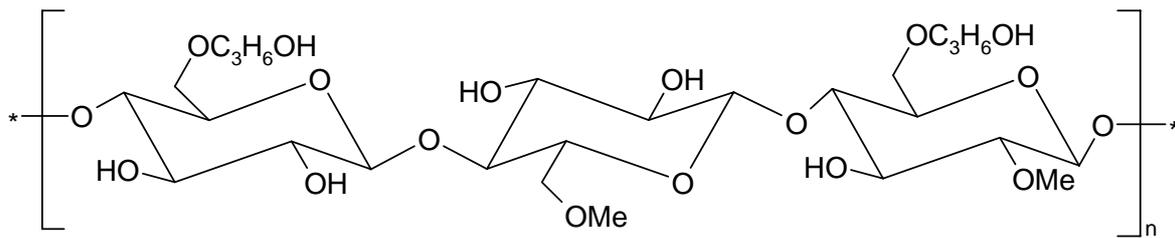


Figure 15 : Formule théorique d'un polymère d'HPMC

Chaque motif comporte 3 groupements OH libres en position 2, 3 et 6 qui ont une réactivité chimique différente (Tableau 13).

<i>réactif</i>	<i>Position</i>		
	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<i>Chlorure de méthyle</i>	1,45	1	1,5
<i>Chlorure d'éthyle</i>	3	1	10
<i>Acide chloroacétique</i>	2	1	2,5

Tableau 13 : Constante de réactivité des trois groupements OH de la cellulose

La production des éthers de cellulose passe par une activation de la cellulose en milieu très basique NaOH, avant introduction des substituants sous forme d'oxyde de méthyle ou d'hydroxypropyle. Le degré de substitution (DS) est exprimé en pourcentage par rapport à la cellulose et est calculé comme suit :

$$DS_{(OCH_3)} = \frac{\%OCH_3}{31} \times \frac{162}{100 - (\%OC_3H_6OH/1,29 + \%OCH_3 \times 0,45)}$$

$$DS_{(OC_3H_6OH)} = \frac{\%OC_3H_6OH}{75} \times \frac{162}{100 - (\%OC_3H_6OH/1,29 + \%OCH_3 \times 0,45)}$$

Le DS de l'HPMC Culminal® d'Hercules est de 1,60-1,80 avec des  $DS_{(OCH_3)}$  de 20-30 % et des  $DS_{(OC_3H_6OH)}$  de 2-25 % par rapport au poids de cellulose.

L'HPMC est hygroscopique, soluble dans tous les solvants polaires et présente une température de dégradation supérieure à 220 °C.

La solubilité des HPMC dépend du taux de matière sèche, de la température et de la vitesse d'agitation. Mais elle reste indépendante du pH. L'augmentation de la vitesse et la diminution de la température améliore la solubilité. L'élévation de la température entre 10 et 40 °C diminue la solubilité de 16 %. Au-delà d'une certaine température (> 50-60 °C), l'HPMC flocule et forme un gel. Ceci est attribué à l'augmentation des interactions hydrophobes provoquées par la diminution des couches d'hydratation aux alentours des chaînes polymériques. La réversibilité est obtenue dès l'abaissement de la température.

Les premières études de l'utilisation de l'HPMC pour former un film datent de 1984-1985 (Kamper et Fennema, 1984 ; 1985). La sensibilité à l'eau du film a été diminuée par introduction directe dans la solution filmogène d'un mélange acide stéarique-palmitique. Testé sous forme de film séparant divers ingrédients d'un produit alimentaire hétérogène (Pizza), l'HPMC a limité les phénomènes d'hydratation d'un des constituants à faible  $a_w$  (pâte) (Kamper et Fennema, 1985).

### III.5 Les emballages actifs anti-microbiens

#### III.5.1 Généralités sur les emballages actifs

Le premier à avoir utilisé en 1984 le terme « emballage actif » a été le professeur Ted Labuza, professeur des sciences et technologies des aliments (Université du Minnesota, USA). Depuis, les travaux portant sur la conservation des denrées par l'intermédiaire de l'emballage sont en plein essor et tentent d'associer emballage biodégradable et emballage actif.

Jusqu'à présent, la fonction primaire de l'emballage était la protection du produit vis-à-vis de son milieu environnant. La législation imposait une inertie parfaite entre le produit et l'emballage. Aujourd'hui, les emballages actifs remplissent une nouvelle fonction destinée à

suivre et à améliorer la conservation des produits alimentaires. Dans ce cadre là, l'interaction entre produit et emballage est recherchée.

L'emballage actif, ou encore fonctionnel ou interactif, est défini comme « *un emballage qui offre plus qu'une simple protection. Il interagit avec l'aliment et dans certains cas répond à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même* » (Gontard, 2000).

Un emballage peut être actif dès le moment où il a la faculté de sélectionner, de libérer progressivement, d'adsorber, d'absorber ou de transformer un composé ou un gaz. Les propriétés nouvelles que remplissent les emballages actifs sont par exemple :

- ✓ Limiter la perméabilité aux gaz et à la vapeur d'eau
- ✓ Libérer des arômes
- ✓ Produire et libérer une énergie (emballage auto refroidissant ou autochauffant)
- ✓ Améliorer la préparation des aliments (suscepteurs)
- ✓ *etc.*
- ✓ absorber l'O<sub>2</sub> (molécule oxydante) ou libérer du CO<sub>2</sub> anti-microbien
- ✓ libérer des molécules anti-microbiennes (bactériocine, acide organique, *etc.*)
- ✓ renseigner sur l'histoire thermique de l'emballage pendant sa conservation (TTI)

Les emballages actifs peuvent être classés en trois catégories : préparateurs, indicateurs et interactifs (Gontard, 2000 ; Coma, 2001a).

- **Les emballages préparateurs**

Qualifiés également « d'emballages cuisiniers », ils n'offrent d'utilité qu'au moment de la consommation de l'aliment. Leur action est surtout liée aux conditions de préparation des aliments.

On retrouve les emballages auto-chauffants et auto-refroidissants. La mise au point de suscepteurs, destinés au chauffage par micro-ondes, a beaucoup participé au développement de ce genre d'emballage. Le suscepteur permet de transformer partiellement en surface la puissance micro-onde électro-magnétique en énergie thermique, ce qui améliore nettement l'homogénéité du chauffage en évitant les points chauds et permet aux réactions de brunissement de Maillard d'intervenir comme lors d'un procédé de cuisson classique.

- **Les emballages indicateurs**

Ils donnent des informations sur le produit lui-même et sur ses conditions de conservation. Les plus connus sont les indicateurs temps/température pour les produits frais, dont la couleur varie selon l'histoire thermique du produit conditionné. Ils valident d'une part le procédé thermique de décontamination et informent d'autre part le consommateur sur d'éventuelles ruptures de la chaîne du froid. Les TTI "Time Temperature Indicator" sont basés sur des réactions souvent enzymatiques dont la vitesse de réaction est dépendante de la température (Nielsen, 1997). La « puce fraîcheur » est une application de ce concept, utilisée avec succès par les magasins Monoprix en France.

- **Les emballages interactifs**

Ils agissent de façon contrôlée sur l'aliment ou son environnement. Leur objectif est de préserver l'aliment tout au long de sa conservation. L'emballage prend en compte les phénomènes de détériorations naturelles des aliments : oxydation, dégradation des vitamines, brunissement, perte d'arômes, prolifération de micro-organismes indésirables, *etc.*

Ils pourront par exemple absorber le dioxygène, limiter la perméabilité à la vapeur d'eau, laisser diffuser des molécules nutritionnelles préalablement encapsulées, absorber l'éthylène, hormone de croissance de certains fruits et légumes, *etc.*

### **III.5.2 Cas particulier des emballages anti-microbiens**

Les emballages anti-microbiens peuvent prendre plusieurs formes :

- Effet anti-microbien indirect des emballages par absorption d'O<sub>2</sub> par exemple ou d'eau.
- Utilisation de films à activité anti-microbienne propre comme le chitosane.
- Adsorption à la surface du film ou incorporation dans le film de molécules anti-microbiennes comme certains additifs, conservateurs, vapeur d'éthanol, *etc.*

Encapsulées, les vapeurs d'éthanol sont libérées progressivement pour atteindre une concentration avoisinant les 0,5 % suffisante pour bloquer toute croissance bactérienne ou fongique. Ethicap<sup>®</sup> ou Frettek<sup>®</sup> sont deux applications de ce type de dispositifs (Gontard, 2000; Appendini et Hotchkiss, 2002).

Un autre exemple est celui des ions Argent. Ces derniers peuvent être fixés au niveau d'un matériau inorganique microporeux : la zéolithe, et être libérés progressivement. Une fine couche de zéolithe fixant des ions Argent à la surface d'emballages multicouches va permettre d'inhiber les bactéries aéro-anaérobies se développant préférentiellement à la surface du produit alimentaire (Ishitani, 1995). Le mécanisme d'action de l'ion Argent est étroitement lié à l'interaction avec les fonctions thiol (-SH) des aminoacides tels que la cystéine. L'ion  $\text{Ag}^+$  réagit avec les fonctions SH libres des protéines membranaires et des enzymes pour inhiber leur activité biologique. Dans de nombreux cas, ce ralentissement du métabolisme a été corrélé à une fuite d'ions  $\text{K}^+$ , signe d'un endommagement important de la membrane microbienne (Phillips, 1952).

Deux brevets ont été déposés ces cinq dernières années, relatif à la fabrication, composition et traitement de surface de films anti-microbiens (Wilhoit, 1996 ; 1997).

Parmi les molécules anti-microbiennes pouvant potentiellement être utilisées pour obtenir des films bioactifs, on retrouve les bactériocines de bactéries lactiques dont la nisine et la pédiocine, ou les molécules équivalentes obtenues par synthèse chimique, les acides organiques dont l'acide citrique, phosphorique ou propionique et les agents chélatants, séquestrants et surfactants dont l'EDTA (Tableau 14).

Les matériaux anti-microbiens ont généralement pour objectif d'augmenter la phase de latence et de réduire le taux de croissance des microorganismes afin de prolonger la durée de vie du produit. Parallèlement, une activité anti-microbienne contre les souches pathogènes permet de diminuer le risque d'apparition d'un problème de santé publique.

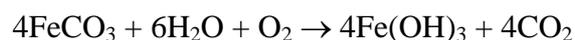
<i>Molécule anti-microbiennes</i>	<i>Micro-organisme inhibé</i>	<i>Films</i>	<i>Références</i>
Fongicides ( Benomyl, imazalil)	Moisissures	-	Halek <i>et al.</i> , 1983 Weng <i>et al.</i> , 1992
Chitosane	Moisissures, <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i>	-	Chen <i>et al.</i> , 1996 Valenta <i>et al.</i> , 1998 Coma <i>et al.</i> , 2001b
Epices Huiles essentielles (hinokitiol)	Moisissures et bactéries	-	Lee <i>et al.</i> , 1998
Acide carboxylique (propionique, sorbique, acétique, lactique, malique) et leurs sels	Moisissures <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Protéine de lait, cellulose et dérivés	Wang, 2000 Cagri <i>et al.</i> , 2001
Bactériocines (nisine, pédiocine, lactinine)			Wilhoit, 1997 Ming <i>et al.</i> , 1997
Enzymes (lysozyme, Glucose oxydase)	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Lc. Lactis</i> , <i>Lb. Plantarum</i> , <i>E. coli</i>	Cellulose et dérivés, protéine de blé,	Padgett <i>et al.</i> , 1998 Siragusa <i>et al.</i> , 1999 Orr <i>et al.</i> , 1999
Agents chélatants (EDTA)			Scannell <i>et al.</i> , 2000 Wang, 2000

**Tableau 14 : Quelques études d'incorporation de molécules anti-microbiennes dans les emballages**

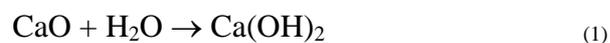
### III.5.2.1 Effets anti-microbiens indirects

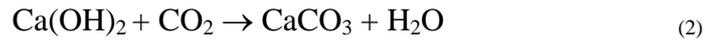
Un emballage absorbeurs de dioxygène est capable de fixer le dioxygène de façon irréversible par réaction chimique ou biochimique. L'absence de dioxygène limitera la prolifération de micro-organismes aérophiles ou aéro-anaérophiles et protégera aussi l'aliment des oxydations.

A titre d'exemple, l'inclusion de carbonate ferreux peut libérer du CO<sub>2</sub>, molécule anti-microbienne, tout en absorbant l'O<sub>2</sub> résiduel, molécule oxydante :



L'inclusion d'oxyde de calcium au sein de l'emballage permet au contraire de contrôler l'humidité ambiante (1) ou de piéger le CO<sub>2</sub> (1 et 2) :

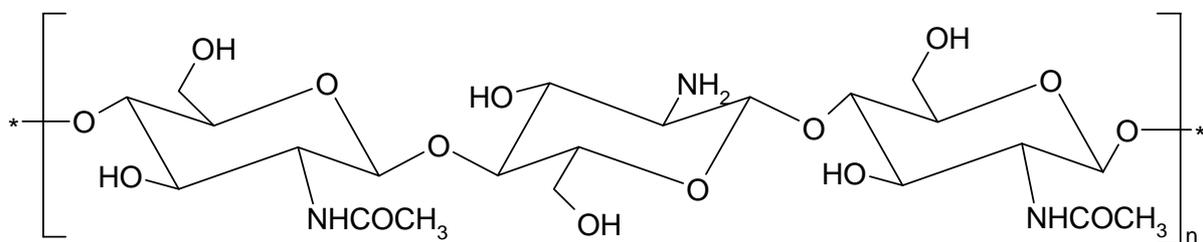




La société Standa est actuellement la principale entreprise en France à produire des absorbeurs de dioxygène (ATCO).

### III.5.2.2 Emballage à base de polymères anti-microbien : exemple du chitosane

Le chitosane est un dérivé déacétylé de la chitine, constituants de la paroi des crustacés, des insectes, de certaines moisissures et algues. Après traitement à la soude la chitine permet d'obtenir un copolymère linéaire  $\beta$  (1-4) d'unités N-acétyl D-glucosamines et de D-glucosamines, à différents taux d'acétylation. On parle de chitosane à partir de 60 % de déacétylation. (Figure 16).



**Figure 16 : Structure chimique du chitosane**

Le polymère est cationique à pH acide et pourvue d'une activité anti-microbienne essentiellement antifongique (Chen *et al.*, 1996 ; Appendini et Hotchkiss, 2002). Certaines études ont montré une activité anti-*Listeria* par lyse cellulaire (Coma *et al.*, 2001b).

L'activité anti-microbienne serait due essentiellement à la charge nette positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (Chen *et al.*, 1996). L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Cuq *et al.*, 1995 ; Shahidi *et al.*, 1999). Le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers (Shahidi *et al.*, 1999).

Les propriétés physico-chimiques ont été étudiées. L'association chitosane-laurate diminue le coefficient de transfert à la vapeur d'eau du film (Wong *et al.*, 1992). L'association chitosane-EDTA avec mise en œuvre d'une phase de neutralisation à la soude permet, outre un caractère anti-microbien, d'obtenir des films incolores avec une bonne stabilité à la dégradation microbienne (Valenta *et al.*, 1998).

### III.5.2.3 Bioemballages incorporant des bactériocines

Peu de travaux ont étudié l'effet anti-microbien de bactériocines incorporées au sein de bioemballages, et encore moins l'étude de leur activité anti-*L. monocytogenes*.

Certains auteurs ont toutefois étudié l'adsorption de bactériocines sur des emballages synthétiques dont l'élaboration est bien maîtrisée.

Ainsi, Siragusa *et al.* (1999) ont adsorbé la nisine sur des films plastiques à base de polyéthylène, et ont étudié l'effet anti-bactérien du film déposé sur des carcasses de viande, pour contrer la prolifération de *Lb. helveticus* et *Brochothrix thermosphacta*. Conservées à 4°C, les carcasses en présence du film incorporant la nisine ont vu une réduction significative de la population bactérienne de plus de 2 log par rapport aux carcasses témoins non traitées.

De même, Wang (2000) a montré que l'association de 3 % de sorbitol, 3 % de lactate de sodium et de 100 mg.kg<sup>-1</sup> de nisine adsorbés sur des films de polyéthylène pouvait contribuer à la conservation de sauce chinoise stockées à 20 °C.

L'association nisine - pédiocine permet de lutter contre la prolifération de *L. monocytogenes*. Les bactériocines associées au froid (4 °C) ont permis de conserver des viandes artificiellement contaminées plus de 12 semaines, avec une absence totale de bactéries pathogènes pendant cette conservation (Ming *et al.*, 1997).

En ce qui concerne l'association bioemballages-bactériocine, des films à base de protéines de maïs et de nisine ont été fabriqués et leur effet anti-microbien appliqué à un lait préalablement contaminé par *L. monocytogenes* a été étudié. Au bout de 72 h, une réduction microbienne de plus de 2 log a été observée entre un film contenant de la nisine, par rapport à un film témoin sans nisine, qui lui n'a induit aucun effet anti-microbien. L'effet bactériolytique de la nisine sur du lait écrémé est supérieur à celui observé sur du lait entier (Orr *et al.*, 1999).

L'association de la nisine avec du lysozyme au sein de films protéiques a entraîné une lyse importante de *Lactobacillus plantarum*. L'addition du chélatant EDTA a permis une inhibition d'*E. coli* pathogène. La comparaison des méthodes de fabrication des films par casting ou par presse chauffante montre une meilleure libération des biocides dans le cas de films produits par casting (Padgett *et al.*, 1998).

Dawson *et al.* (2002) ont élaboré des films à base de protéines de soja incorporant 8 % en masse d'acide laurique et 2,5 % de nisine. Ces films ont réduit de plus de 6 log le nombre de microorganismes dans une culture de *L. monocytogenes* au bout de 8 h d'exposition.

De même, Hoffman *et al.* (2001) ont rapporté que l'incorporation d'acide laurique, d'EDTA et de nisine au sein de films à base de protéines de blé permet de lutter efficacement contre la

croissance de *L. monocytogenes* et de *Salmonella enterica*. Lorsque l'incorporation d'acide laurique réduit de 4 log le nombre de *L. monocytogenes* au bout de 48 h d'exposition, la combinaison des trois molécules anti-microbiennes induit une chute supérieure à 8 log du nombre de bactéries. Les films anti-bactériens n'ont montré qu'une chute de 1 log dans le cas de *Salmonella enterica*, mais une croissance supérieure à 5 log a été observée dans la culture témoin exempte de molécules anti-bactériennes.

Des films à base de protéines de lactosérum incorporant diverses épices (thym, sauge, romarin) ont montré un effet anti-bactérien protecteur de morceaux de viande contre la prolifération de bactéries comme *Pseudomonas* ou *Brichothrix*. L'association irradiation-films a entraîné des réductions immédiates de 2, 3 et 4 log respectivement pour 1, 2 et 3 kGy (Ouattara *et al.* 2002).

L'association de la nisine avec la lacticine au sein d'un film cellulosique a été testée. Les bioemballages anti-microbiens ont réduit de plus de 2 log la culture de *L. innocua* et de presque 1,5 log celle de *S. aureus* (Scannell *et al.*, 2000).

L'enrobage de morceaux de viandes par des films à 2 % de PLA incorporant de la nisine a permis de diminuer la population de *L. monocytogenes* de 0,5 à 1 log (Ariyapitipun *et al.*, 2000).

Enfin, l'introduction de particules anti-microbiennes peut modifier la résistance mécanique, les propriétés barrière ou encore le comportement optique, qu'il faudra obligatoirement appréhender (Appendini et Hotchkiss, 2002).

## IV Transfert de matière et modélisation

La désorption de la nisine du film osidique, puis sa diffusion dans l'aliment constituent les deux principaux paramètres qui influencent l'efficacité anti-bactérienne de la nisine sur les souches indésirables.

La désorption de la nisine du film dépend des interactions entre le peptide bioactif et les différents constituants du film : celles-ci influencent la rétention plus ou moins grande de la nisine dans la matrice filmogène.

La diffusion de la nisine dans le produit alimentaire dépend des interactions entre le peptide bioactif et les différents constituants de l'aliment. La teneur en matière sèche et en matière lipidique, la nature hydrophile ou hydrophobe des constituants de l'aliment, le pH, la teneur en eau libre, la température de conservation du produit, *etc.* influencent la diffusion.

En conséquence, l'activité anti-bactérienne du film doit être appréhendée par l'étude de la désorption de la nisine du film puis par l'analyse de sa diffusion dans un produit alimentaire.

Toutefois, Mousavi *et al.* (1999), en voulant étudier la diffusion de solvants résiduels de l'emballage dans les produits alimentaires solides ont appréhendé ce phénomène en traitant uniquement la diffusion.

Les phénomènes de diffusion moléculaire de sels ou d'eau ont fait l'objet de multiples études, étant donné l'importance en industrie agroalimentaire des procédés de séchage (Tütüncü et Labuza, 1996 ; Simal *et al.*, 2001) ou de salage (Geurts *et al.*, 1974 et 1980; Gros *et al.*, 1987; Luna *et al.*, 1987; Turhan, 1996). Quelques études traitent aussi de la diffusion de sucres (saccharose, aspartame) (Bayarri *et al.*, 2001 ; Gros et Ruëg, 1987; Giannakopoulos et Guilbert, 1986a et 1986b) ou d'acide sorbique en tant que conservateur (Giannakopoulos *et al.*, 1986a et 1986b). Mais très peu d'études ont abordé la diffusion de molécules de taille relativement importante comme les protéines ou les peptides. Seules quelques études ont analysé l'influence de l'état du système de diffusion solide ou liquide sur la diffusion du lysozyme ou de la myoglobine. La nature chargée (K-Carraghénane) ou neutre (agarose) de la matrice de diffusion a montré que la diffusion des protéines est très dépendante du pH (Mattisson *et al.*, 2000 ; Hirota *et al.*, 2000).

#### IV.1 Généralité sur le phénomène de diffusion

La diffusion est un processus lent par lequel une matière est transférée d'un système à un autre sous l'effet d'un gradient de concentration. Le transport d'une matière dans un corps solide par diffusion est décrit par la loi de Fick, analogue à celle régissant le transfert de chaleur (Crank, 1975). Mais la complexité des paramètres qui régissent ce phénomène de diffusion (activité de l'eau ( $a_w$ ), interactions intermoléculaires, viscosité de la phase aqueuse, force ionique, tortuosité) (Loncin, 1980) amène les auteurs à parler plutôt de coefficient de diffusion apparent ou effectif noté  $D_a$  ou  $D_e$ , mesuré expérimentalement pour décrire les effets combinés de l'ensemble des mécanismes de transport mis en jeu. Ce coefficient, noté dorénavant  $D$  pour une simplification d'écriture, est un paramètre physique important qui mesure donc un phénomène de diffusion propre ou réel tel qu'il a lieu dans une matrice complexe. Dans le cas d'une diffusion monodimensionnelle (où l'on considère que le diffusant est le seul constituant diffusant de la matrice), la deuxième loi de Fick peut être utilisée pour décrire cette diffusion dans les solides et l'équation différentielle s'écrit alors (Crank, 1975 ; Bird *et al.*, 1960) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D \frac{\partial C}{\partial x} \right)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion apparent ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ) et  $\frac{\partial C}{\partial x}$  représente le gradient de concentration en molécule diffusante.

Lorsque le coefficient de diffusion est supposé constant et indépendant de tout autre paramètre du système, la relation devient :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \nabla^2(C)$$

Ce modèle de diffusion simple à coefficient constant a été appliqué par de nombreux auteurs en considérant comme milieu de diffusion soit :

- La matrice de diffusion dans son ensemble, le système considéré étant alors le système binaire {molécule diffusante + matrice de diffusion} ; la concentration en diffusant est

alors exprimée par rapport à la matrice, et le coefficient de diffusion correspond à la diffusivité apparente de la molécule dans la matrice globale ;

- L'eau dans la matrice de diffusion, le système considéré étant alors le système binaire {molécule diffusante + eau de la matrice} : la concentration en molécule diffusante est alors exprimée par rapport à la phase aqueuse de la matrice de diffusion, et le coefficient de diffusion correspond à la diffusivité effective de la molécule dans l'eau de la matrice.

L'intérêt des modèles de diffusion à coefficient constant réside dans le fait qu'ils possèdent des solutions analytiques dans de nombreux cas de conditions initiales et aux limites (Crank, 1975).

Les conditions initiales couramment mises en œuvre correspondent à des conditions où la concentration est considérée uniforme au sein de la matrice de diffusion.

Les conditions aux limites sont dans le cas simple d'une interface plane et d'un transport unidirectionnel :

$t=0 \quad \forall x \geq 0$  , la concentration du diffusant dans la matrice de diffusion est constante et, parfois égale à zéro.

$\forall t > 0 \quad x=0$  , la concentration en diffusant à l'interface -solution de diffusion/matrice diffusante- ( $x=0$ ) est égale à la concentration d'équilibre en molécule diffusante dans la solution de diffusion.

L'influence de la température sur le coefficient de diffusion est théoriquement décrite par une relation de type Arrhenius, à savoir :

$$D_T = D_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

où

- $D_T$  est la diffusivité ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) à la température  $T$  (K);
- $E_a$  est l'énergie d'activation de la molécule diffusante dans la phase aqueuse de la matrice de diffusion ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) ;
- $T$  est la température considérée, exprimée en Kelvin ;
- $D_0$  est une constante ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ).

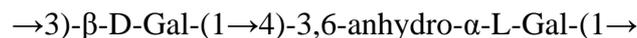
L'énergie d'activation correspond à l'énergie requise pour initier le transfert de matière.

#### IV.2 Matrice simple pour l'étude de la diffusion

La diffusion de molécules dans un aliment est généralement un phénomène lent, qui est d'autant plus complexe que la structure de l'aliment est hétérogène, que les phénomènes de sorption eau-soluté sont importants et que dans un aliment, une double diffusion simultanée eau-soluté a lieu. Cette complexité du produit alimentaire ajoutée au besoin de disposer de matrices rigoureusement identiques et reproductibles a amené les chercheurs à opter pour des matrices plus simples pour étudier les phénomènes de diffusion. Des polymères de type agar (Diaz *et al.*, 1993 ; Gros *et al.*, 1987 ; Giannakopoulos et Guilbert, 1986 ; Guilbert *et al.*, 1985), « gellan gum » (Bayarri *et al.*, 2001), gomme arabique (Naesens *et al.*, 1981), K-Carraghénane (Bayarri *et al.*, 2001) ou enfin agarose (Hirota *et al.*, 2000 ; Mattisson *et al.*, 2000 ; Mohammed *et al.*, 1998) ont été utilisés dans un grand nombre d'étude de diffusion.

Alors que les gels d'agar et de K-Carraghénane ont plutôt une charge globale négative, le gel d'agarose est un polysaccharide non chargé qui facilite l'étude de la diffusion, en ne faisant pas intervenir le paramètre électrostatique, qui risque d'influencer les coefficients de diffusion des ions et des protéines.

L'agarose est un polymère de structure primaire constituée de la séquence alternée répétée suivante :



La gélification de l'agarose, tout comme celles des autres polysaccharides, implique sous l'action de la température et en solution, une structuration et une organisation rigide du gel via une mise en place d'interactions de faible énergie de nature hydrophobe et/ou hydrogène. Le modèle accepté de la structure organisée des gels est celui des doubles hélices co-axiales ou simples (Arnott *et al.*, 1974).

La diffusion dans les gels d'agarose, comme la diffusion dans tout polymère, correspond à une diffusion dans le solvant d'une matrice poreuse, où les pores sont remplis par le solvant et sont reliés les uns aux autres.

### IV.3 Méthodes expérimentales pour la détermination du coefficient de diffusion

Dans la pratique, le coefficient de diffusion apparent  $D$  est déterminé par des mesures de transfert de matière en fonction d'une distance de diffusion et d'un temps.  $D$  est ensuite estimé par réduction des écarts entre les données expérimentales et théoriques (Mittal, 1999). Dans tous ces cas, l'expérience est menée à température constante.

Les protocoles expérimentaux les plus souvent utilisés sont :

- ✓ Une immersion dans des solutions aqueuses de morceaux de gels contenant la molécule à étudier, puis une quantification de la molécule diffusante dans la solution d'immersion à l'état d'équilibre (Hirota *et al.*, 2000 ; Bayarri *et al.*, 2001).
- ✓ Une immersion de morceaux de gels dans des solutions aqueuses contenant la molécule à étudier, puis une quantification de la molécule diffusante dans la totalité du gel (Giannakopoulos et Guilbert, 1986).
- ✓ Contact entre deux gels cylindriques dont l'un contient la molécule diffusante et l'autre en est exempt, puis mesure de la molécule ayant diffusée dans le gel initialement sans la molécule testée (Giannakopoulos et Guilbert, 1986).
- ✓ Suspendre un produit solide au dessus d'une solution, maintenue sous agitation douce, contenant la molécule diffusante et mesure de la quantité de matière transférée dans le gel (Geurts *et al.*, 1974).

### IV.4 Diffusion de molécules dans des systèmes hydrocolloïdes à forte teneur en eau

Biquet *et al.* (1986) ont étudié la diffusion de molécules d'eau dans des gels modèles à 0,3 ou 1,7 % en agar, additionnés d'agents épaississants ou texturants pour fixer l' $a_w$  à 0,2 ou 0,5. Les coefficients de diffusion varient entre 2,7 et  $4,8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  lorsque la teneur en agar diminue et la valeur en  $a_w$  augmente. Le coefficient de diffusion a été corrélé à l'augmentation de la matière sèche qui rigidifie le réseau du gel et qui diminue la diffusivité. La matière lipidique a significativement réduit le coefficient de diffusion de l'eau (Biquet *et al.*, 1986).

Gros *et al.* (1987) ont appréhendé la diffusion du sel NaCl dans des gels d'agar à 3 % et à 25 °C. Le coefficient de diffusion est alors égal à  $1,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Le coefficient de diffusion

dépend de la température et varie de  $0,9$  à  $1,6 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la température passe de  $5$  à  $30$  °C. Une énergie d'activation de  $16-20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  a été obtenue.

Diaz *et al.* (1993) ont aussi travaillé sur la diffusion du sel dans des gels d'agar. Le coefficient passe de  $1$  à  $1,4 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la température varie entre  $5$  et  $25$  °C. Ces chercheurs ont également calculé une énergie d'activation égale à  $20,37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  proche de celle rapportée par Gros *et al.* (1993).

Belton et Wilson (1982) ont modélisé la diffusion des ions  $\text{CrO}_4^{2-}$  dans des gels d'agar. Le coefficient de diffusion passe de  $1,12$  à  $0,99 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la concentration en agar varie de  $1$  à  $5$  %. La comparaison de la diffusion de l'ion  $\text{CrO}_4^{2-}$  en gel d'agar ou en gel d'agarose ne montre pas de différence significative. Par contre, l'étude dans les mêmes conditions d'une molécule diffusante de plus haut poids moléculaire ( $604 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) par rapport à celle de l'ion  $\text{CrO}_4^{2-}$  ( $194 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) réduit de  $50$  à  $75$  % le coefficient de diffusion. La diffusion est fonction de la taille des molécules diffusante, qui est elle-même corrélée à la taille des pores de la matrice de diffusion.

Guilbert *et al.* (1985) ont étudié la diffusion de molécules organiques comme l'acide sorbique. En gel d'agar ( $1,5$  %) et à  $25$  °C, le coefficient de diffusion est égal à  $7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Cette diffusion diminue à  $1,36 - 2,08 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la température passe à  $10$  °C. Le coefficient de diffusion est également diminué quand l' $a_w$  baisse après addition de sel ou de glycérol. La rigidification du gel est mise en cause dans la réduction du coefficient de diffusion. Dans les mêmes conditions, Giannakopoulos et Guilbert (1986) ont calculé un coefficient de diffusion de l'acide sorbique égal à  $9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  avec une énergie d'activation de  $18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Schwartzberg et Chao (1982) ont calculé dans des conditions opératoires similaires des coefficients de diffusion de  $8,2$  ;  $7,8$  et  $8,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement pour les acides valérique, caproïque et tartrique.

D'autres molécules comme les sucres ont fait l'objet d'études de diffusion. Bayarri *et al.* (2001) ont calculé des coefficients de diffusion du saccharose et d'aspartame à  $37$  °C dans des gels d'agar ou de K-Carraghénane à  $4,5$  ou  $9$  % en matière sèche. Les coefficients de diffusion varient entre  $3,8$  et  $7,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  en fonction de la teneur en matière sèche et sont plus élevés dans le cas de la diffusion en gel de K-Carraghénane. La structure de ce dernier moins rigide et plus désorganisée explique ces résultats. Le coefficient de diffusion n'est plus que de  $2,47 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  quand la température n'est plus que de  $5$  °C (Schwartzberg et Chao, 1982).

Henry *et al.* (1982) ont observé pour le saccharose et l'urée des coefficients de diffusion respectivement de  $2,47$  et  $6,29 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  en gel d'agar ( $0,79$  %) et à  $5$  °C.

Par ailleurs, la structure complexe des protéines complique beaucoup l'étude de leur diffusion. En effet, les protéines peuvent, en fonction du pH, être chargées ou non et prendre des conformations dimensionnelles différentes. De plus, la force ionique et surtout la variabilité chimique des monomères constituant le polypeptide est à l'origine de ces difficultés. Une protéine peut ainsi être chargée positivement en dessous de son pH isoélectrique (pI), neutre au pI, et être chargée négativement au-dessus du pI. A 25 °C, en gel d'agar (4 %), le coefficient de diffusion du lysozyme varie entre 33 et  $9.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  respectivement à pH 4 et 11. Son pI étant égal à 11, le lysozyme à ce pH n'est pas chargé et forme des oligomères de plus haut poids moléculaire qui ralentissent le phénomène de diffusion (Mattisson *et al.* (2000).

La diffusion de la myoglobine en gel d'agarose ou de K-Carraghénane (0,5 à 4 % en matière sèche) et à pH 2 (protéine cationique), 6,8 (pI, protéine neutre) et 9 (protéine anionique) est plus élevée dans le cas du gel de K-Carraghénane et à pH 2. La structure moins rigide et les attractions électrostatiques (gel chargé négativement) accélèrent la diffusion.

Les différents coefficients de diffusion de molécules dans des gels polysaccharidiques sont récapitulés dans le Tableau 15.

Produit	Matière sèche (%)	Molécules diffusantes	T °C	Diffusivité ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ )	Référence
Agarose	1	$\text{CrO}_4^{2-}$	25	$1,14.10^{-9}$	Belton <i>et al.</i> (1982)
	5			$0,97.10^{-10}$	
Agar	0,79	Urée	5	$6,29.10^{-10}$	Henry <i>et al.</i> (1982)
Agar	0,79	Saccharose	5	$2,47.10^{-10}$	Schwartzberg <i>et al.</i> (1982)
Agar	1,5	Acide sorbique	25	$8.10^{-10}$	Guilbert <i>et al.</i> (1985)
Agar	0,3-1,7	$\text{H}_2\text{O}$	50	$2,7.10^{-10}$	Biquet <i>et al.</i> (1986)
				$4,8.10^{-10}$	
Agar	1,5	Acide sorbique	25	$9.10^{-10}$	Giannakopoulos <i>et al.</i> (1986)
Agar	4	NaCl	25	$14.10^{-10}$	Diaz <i>et al.</i> (1993)
Agarose	4	lysozyme	25	$9.10^{-11}$	Mattisson <i>et al.</i> (2000)
				$33.10^{-11}$	
K-Carraghénane	4,5-9	Saccharose	37	$3,8.10^{-10}$	Bayarri <i>et al.</i> (2001)
		Aspartame		$7,7.10^{-10}$	

**Tableau 15 : Quelques exemples de coefficients de diffusion de molécules dans les gels polysaccharidiques.**

Le coefficient de diffusion diminue quand la taille des molécules augmente. NaCl (58,5 g.mol<sup>-1</sup>), saccharose (342 g.mol<sup>-1</sup>), myoglobine (16900 g.mol<sup>-1</sup>), chymotrypsine (23240 g.mol<sup>-1</sup>), lactoglobuline (37100 g.mol<sup>-1</sup>) et la tropomyosine (93000 g.mol<sup>-1</sup>) présentent des coefficients de diffusion dans l'eau à 25 °C et aux dilutions infinies respectivement égaux à 1,61 ; 0,54 ; 0,11 ; 0,09 ; 0,07 et 0,02.10<sup>-9</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> qui diminuent quand le poids moléculaire augmente (Henry *et al.*, 1982). L'équation de Stokes-Einstein (Loncin, 1980) montre que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon des molécules diffusantes.

Il en ressort de l'ensemble de ces études que :

- ✓ Les molécules diffusantes migrent au sein de la phase aqueuse des matrices solides de diffusion ;
- ✓ les différents phénomènes contribuant à limiter la diffusion dans la phase aqueuse sont :
  - Les interactions chimiques de la molécule diffusante avec la matrice solide (protéines et globules gras) et avec l'eau liée à la matrice solide ;
  - La viscosité de la phase aqueuse ;
  - La tortuosité du réseau poreux ;
- ✓ la composition du produit influence beaucoup la diffusion :
  - Le coefficient de diffusion dans la phase aqueuse augmente avec l' $a_w$  et diminue avec la viscosité (Figure 17)

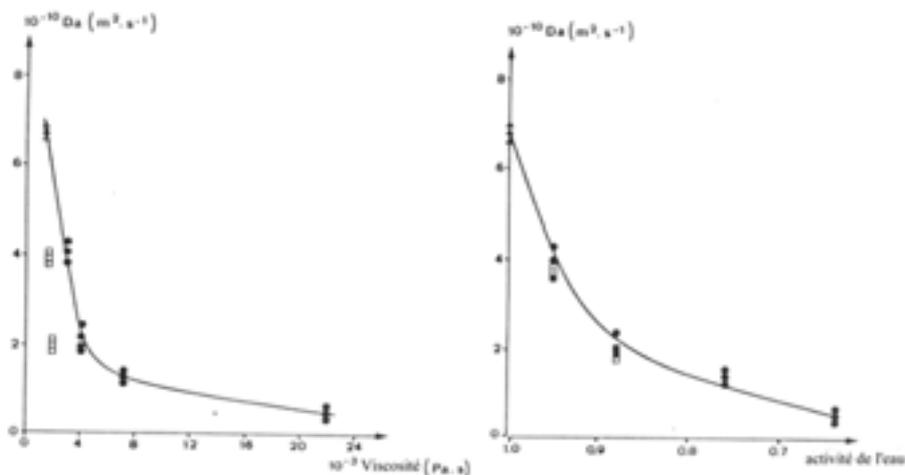


Figure 17: Coefficient de diffusion apparent à 25 °C de l'acide sorbique en fonction de la viscosité de la phase aqueuse du gel d'agar (A) ou en fonction de l' $a_w$  (B) (Guilbert *et al.*, 1985).

- Le coefficient de diffusion dans la phase aqueuse augmente avec la température (Biquet et Guilbert, 1986) (Figure 18)

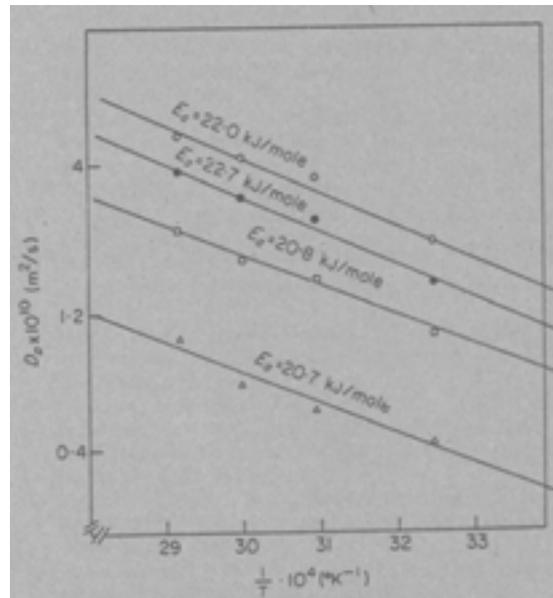


Figure 18 : Evolution de la diffusivité apparente de l'eau en fonction de la température pour différentes teneurs en eau (Biquet et Guilbert, 1986).

- le coefficient de diffusion augmente en fonction de son agitation (cas du saumurage du fromage, Chamba, 1982)
- la concentration en molécule diffusante dans la phase aqueuse augmente avec la durée de contact (cas du saumurage du fromage, Chamba, 1982) (Figure 19)

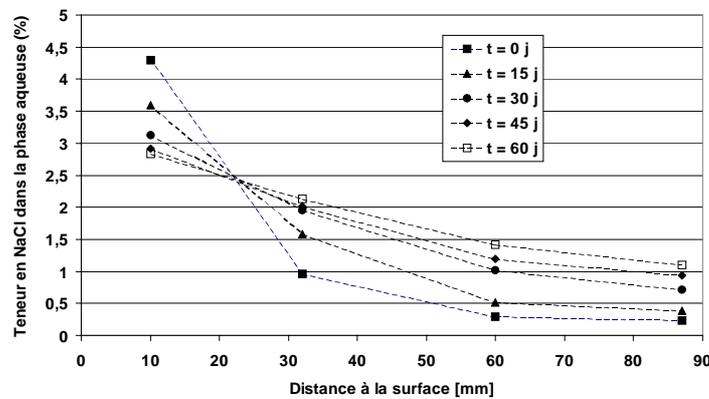


Figure 19 : Evolution du profil de diffusion du NaCl dans l'eau dans l'Emmental en fonction du temps de saumurage (Chamba, 1982).

### IV.5 Extraction des peptides des gels

Les modèles de diffusion sont établis après extraction du gel et dosage des protéines. La difficulté d'extraction et de fractionnement des protéines dans l'échantillon ont été dans beaucoup d'études un paramètre limitant.

L'amélioration des techniques d'extraction de peptides a été réalisée par les nombreux travaux sur l'étude des fractions protéiques et leur évolution pendant l'affinage des fromages. Kuchroo et Fox (1982) identifient comme paramètres affectant l'extraction : le moyen de broyage (mixeur, Ultraturax ou broyage manuel) mis en œuvre, la température, le temps d'homogénéisation et le ratio échantillon/diluant. Le dosage des protéines extraites se fait par dosage colorimétrique, HPLC C18 ou RP18, détermination de l'azote total par méthode Kjeldahl, *etc.*

Les principaux protocoles d'extraction de peptides à partir du fromage sont énumérés dans le Tableau 16.

Produit	Poids échantillon (g)	Volume diluant eau (ml)	Moyen de broyage	Température et temps d'homogénéisation	Centrifugation	Filtration	Référence bibliographique
Emmental	2	25	3min, 4 °C	-	9750g, 4 °C, 30 min	Oui	Bican <i>et al.</i> (1994)
Différents fromages	1	2	Stomacher	10min, 20 °C	10000g, 30 min, 4 °C	Whatman N°42, puis Ultrafiltration Millipore	Singh <i>et al.</i> (1994)
Fromage espagnol Afuega'l Pitu	10	50	Ultraturax (5min, 40 °C)	1h, 40 °C	-	Verre fritté	De llano <i>et al.</i> (1995)
Cheddar	100	200	Mixer (2min, 20 °C)	-	18000g, 4 °C, 30 min	-	Lee <i>et al.</i> (1996)
Fromage de chèvre	6	360	-	1h, 40 °C	4000 puis 20000g, 4 °C, 30min	-	Sommerer <i>et al.</i> (1998)

**Tableau 16 : Quelques protocoles d'extraction de peptides hydrosolubles à partir de fromage**

L'extraction met en œuvre une dilution de l'échantillon dans un volume d'eau dont le ratio influence la solubilité des peptides. La qualité du broyage est essentielle, ainsi que la température et le temps d'homogénéisation. La centrifugation élimine les matières lipidiques en suspension et est améliorée par une filtration supplémentaire sur support.

# MATERIELS ET METHODES

« Mieux vaut emballer que soigner »

# I Caractéristique des souches bactériennes et sensibilités aux bactériocines étudiées

## I.1 Matériels

### I.1.1 Micro-organismes

- ✓ *Listeria innocua* : souche 430 (collection USMA)
- ✓ *Staphylococcus aureus* : CIP 58.156 (Collection Institut Pasteur)
- ✓ *Listeria monocytogenes* : CIP 82.110 (Collection Institut Pasteur)
- ✓ *Bacillus coagulans* : BC I(4) (collection USMA), productrice de coaguline (pédiocine-like)
- ✓ *Lactobacillus curvatus* : souche SB 13 (collection LFBI, Nancy)
- ✓ *Micrococcus luteus* : A270 (Collection Institut Pasteur)

### I.1.2 Milieux de culture

Les milieux de culture suivants sont utilisés sous forme liquide ou solide après addition d'agar à 12 g.l<sup>-1</sup> (DIFCO).

- ✓ De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) : ce milieu contient 20 g.l<sup>-1</sup> de glucose, 10 g.l<sup>-1</sup> de protéose peptone, 10 g.l<sup>-1</sup> d'extrait de viande, 5 g.l<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 5 g.l<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium, 2 g.l<sup>-1</sup> de citrate d'ammonium, 2 g.l<sup>-1</sup> de phosphate dipotassique, 1 g.l<sup>-1</sup> de Tween 80, 0,1 g.l<sup>-1</sup> de sulfate de magnésium et 0,05 g.l<sup>-1</sup> de sulfate de manganèse (DIFCO).
- ✓ Bouillon nutritif (BN) : ce milieu contient 10 g.l<sup>-1</sup> de peptone pancréatique, 5 g.l<sup>-1</sup> d'extrait de viande et 5 g.l<sup>-1</sup> de chlorure de sodium (DIFCO).
- ✓ Tryptose Broth (TB) : ce milieu contient 20 g.l<sup>-1</sup> de tryptose, 5 g.l<sup>-1</sup> de chlorure de sodium et 1 g.l<sup>-1</sup> de dextrose (DIFCO).

### I.1.3 Micro-organismes, milieux et conditions de culture

Micro-organismes	Milieux	Conditions
<i>Micrococcus luteus</i>	BN et BN gélosé	
<i>Listeria innocua</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	TB et TB gélosé	140 rpm, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	MRS et MRS gélosé	
<i>Bacillus coagulans</i>		

Tableau 17 : Micro-organismes, milieux et conditions de culture

### I.1.4 Solutions tampons et diluants

- ✓ Tampon phosphate 50 mM pH 6,1 : il contient du dihydrogénophosphate de potassium ( $136,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et du hydrogénophosphate disodique ( $177,99 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (SIGMA). Le tampon phosphate 50 mM pH 6,1 est obtenu en mélangeant 4 parts de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5,44 g) avec 1 part de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,78 g) dans un litre d'eau.
- ✓ Tampon Tris 0,1 M :  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$  ( $121,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) –DIFCO-. Le tampon est obtenu en dissolvant 12,11 g dans 1 litre d'eau ultra-pure.
- ✓ Diluant HCl 0,01 N : il est obtenu en diluant au 1/1200 des solutions d'HCl ultrapure.

### I.1.5 Les bactériocines

- ✓ Nisine (Aplin and Barrett Ltd, UK) : de pureté supérieure à 95 %, sa concentration est exprimée en Unité Internationale par millilitre ( $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) avec  $1 \mu\text{g} = 40 \text{ UI}$ . Elle est solubilisée dans HCl 0,01M ou dans du tampon phosphate pH 6,1 et stockée à 4 °C.
- ✓ La pédiocine et la curvaticine sont produites respectivement par *B. coagulans* et *Lb. Curvatus*. Elles sont solubilisées dans du tampon phosphate pH 6,1 et stockées à 4 °C.

## I.2 Méthodes

### I.2.1 Pré-culture de 18h

Les pré-cultures sont obtenues en ensemençant des tubes de milieu de culture stériles de 9 ml avec 1 ml de culture de plus de 24h. Les tubes sont agités à 140 rpm et à 37 °C pendant 18 h.

### I.2.2 Etude de l'effet anti-bactérien des bactériocines

#### I.2.2.1 Technique en milieu liquide

Du milieu tryptose en Erlenmeyer ou en tube est ensemenché à 5 % (v/v) à partir de pré-cultures de 18 h. Les cultures sont agitées à 140 rpm à 37 °C. Pour l'étude de l'effet inhibiteur sur des bactéries en phase de latence, la bactériocine est ajoutée aux concentrations désirées à  $t = 0$ , c'est à dire en même temps que l'ensemencement en bactéries du milieu de culture. Pour ce qui concerne l'activité anti-microbienne sur des bactéries en phase exponentielle, la bactériocine est additionnée dès que les cultures atteignent une absorbance (600 nm) égale à 0,6. Pour analyser l'effet inhibiteur en phase stationnaire, les bactéries sont cultivées respectivement jusqu'à une absorbance (600 nm) égale à 1,5 ou 4 à 5 selon que les souches testées soient respectivement des *Listeria* ou des Staphylocoques. La bactériocine est soit additionnée lorsque l'absorbance (600 nm) de la phase stationnaire est atteinte, soit une dilution préalable pour fixer l'absorbance (600 nm) de la culture à 0,6 est réalisée avant d'ajouter la bactériocine aux concentrations désirées. La dilution pour fixer l'absorbance (600 nm) à 0,6 est réalisée pour avoir un rapport charge microbienne sur concentration en nisine « équivalente » entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance. L'inhibition, représentée par une absence de croissance (palier) ou par une chute d'absorbance (600 nm), est suivie au cours du temps.

#### I.2.2.2 Technique en puits sur milieu solide (Blom *et al.*, 1997)

Des milieux de culture gélosés en surfusion sont ensemenchés en bactéries à 0,1 % (v/v) à partir de pré-cultures de 18 h, puis coulés en boîtes de Petri. Après solidification du milieu, des puits de 6 mm de diamètre y sont creusés à l'aide de l'extrémité supérieure d'une pipette Pasteur et 70 µl de solution de bactériocines y sont déposés. Les boîtes de Petri sont alors mises en chambre froide (2-4 °C) pendant 4 heures permettant ainsi la diffusion du peptide

actif. Les boîtes sont alors étuvées 24 à 48 h à 30 °C. L'activité de la bactériocine est mesurée en diamètre de zones d'inhibition (mm) avec une précision de 0,5 à 1 mm.

#### I.2.2.3 Mise en évidence et étude des résistants

Après une phase d'inhibition à une concentration donnée en bactériocine, représentée par une chute d'absorbance (600nm), la croissance bactérienne reprend en général. Dès qu'une absorbance (600nm) supérieure à 0,6 est atteinte, la culture est centrifugée 15 min à 4000 g et lavée à deux reprises dans du tampon phosphate pH 6,1. L'activité inhibitrice du surnageant est testée d'une part en technique en puits. D'autre part, le culot est suspendu à nouveau dans du milieu tryptose. Son absorbance (600nm) est ajustée à 0,6 avant qu'une concentration en bactériocines égale à celle utilisée initialement ne soit utilisée pour tester la sensibilité des bactéries à une solution de bactériocine « fraîche ».

#### I.2.2.4 Obtention de *L. monocytogenes* résistantes à la nisine

Du milieu tryptose en Erlenmeyers ou en tubes estensemencé à 5 % (v/v) à partir de pré-cultures de 18 h de *L. monocytogenes*. Les cultures sont agitées à 140 rpm et à 37 °C. Dès que la culture atteint une  $DO_{600nm} = 0,6$ , 100 UI.ml<sup>-1</sup> en nisine sont additionnés. Après inhibition et reprise de la croissance jusqu'à une absorbance (600nm) supérieure à 0,6, les bactéries sont récupérées par centrifugation 15 min à 4000 g. Deux lavages successifs dans du tampon phosphate pH 6,1 sont effectués avant que le culot ne soit suspendu à nouveau dans du milieu tryptose et que son absorbance (600nm) ne soit fixée à 0,6. Une concentration de 100 UI.ml<sup>-1</sup> est à nouveau appliquée. Cette procédure est répétée autant de fois qu'il sera nécessaire pour voir disparaître la phase d'inhibition, autrement dit la sensibilité des souches à 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine.

### **I.2.3 Production de bactériocines et concentration**

#### I.2.3.1 Production de bactériocines

1 litre de milieu de culture MRS estensemencé à 0,1 % (v/v) en bactéries à partir d'une pré-culture de 18 h de *Lb. curvatus* ou de *B. coagulans* pour produire respectivement la curvaticine ou la pédiocine. La culture est incubée 18 à 24 h à 37 °C et agitée à 140 rpm.

I.2.3.2 Concentration des bactériocines (méthode adaptée de Burianek et Yousef, 2000)

Après 18 à 24 h d'incubation, la culture est centrifugée 15 min à 7100 g (Centrifugeuse Jouan CR312). A un litre de surnageant est additionné 500 ml de chloroforme. Après 20 min d'agitation magnétique à 500 rpm, le mélange est centrifugé 20 min à 10400 g. Le précipité ainsi formé est solubilisé dans du tampon tris 0,1 M. Après une nouvelle centrifugation de 15 min à 12100 g, le culot est récupéré, séché 18 h sous hotte à flux laminaire et solubilisé une nuit dans du tampon tris, constituant ainsi la solution mère en bactériocine.

I.2.3.3 Détermination des concentrations en bactériocines en Unité Arbitraire par millilitre (UA.ml<sup>-1</sup>)

Du milieu tryptose gélosé en surfusion estensemencé en bactéries à 0,1 % (v/v) à partir d'une pré-culture de *L. monocytogenes* de 18 h, puis coulé en boîtes de Petri. Après solidification du milieu, des puits de 6 mm de diamètre y sont creusés. A partir d'une série de dilution de demi en demi effectuée à partir du surnageant ou de la solution mère en bactériocine, 70 µl de chaque dilution sont déposés dans les puits. Les boîtes de Petri sont alors mises en chambre froide (2-4 °C) pendant 4 heures, puis incubées à 30 °C pendant 24 à 48 h. La concentration en bactériocine en unité arbitraire ramenée au ml, correspond à l'inverse de la dilution ultime, pour laquelle une zone d'inhibition est encore visible.

## **II Etude des bioemballages**

### **II.1 Matériels**

#### **II.1.1 Produits**

- ✓ HydroxyPropylMéthylCellulose : HPMC culminal 50 (Aqualon France, le Pecq)
- ✓ PolyEthylène Glycol PEG400, éthanol, acide citrique et dihydrogénophosphate de sodium (SIGMA)
- ✓ Composés hydrophobes : acide oléique et palmitate de méthyle (Stéarinerie Dubois, Boulogne) ; acide stéarique AS 4751 et stéarate de méthyle 5376 (SIGMA)

## II.1.2 Appareillages

- ✓ Texturomètre : ADAMEL LHOMARGY (DY 22)
- ✓ Micromètre : MITUTOYO (IDF-1030)
- ✓ Module de rugosité : Bendtsen (Lorentzen et Wettre)
- ✓ Chromamètre : Minolta CR-310
- ✓ Balance infra-rouge : Mettler (LJ 16)
- ✓ Goniomètre : Krüss
- ✓ Spectroscopie Infra-Rouge : Nicolet 210, avec module d'analyse en transmittance ou en Attenuated Total Reflectance (ATR)
- ✓ Analyse thermique différentielle : ATD Mettler avec « Toledo Star system » comme programme d'analyse

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Fabrication des films par casting

#### II.2.1.1 Films homogènes à base d'HPMC

Les films sont fabriqués selon une procédure décrite par Kamper et Fennema (1984, 1985) optimisée au sein du laboratoire. 9/200/100/1 parties d'HPMC/eau/éthanol/PEG400 (p/p/p/p) sont mélangés 1 h sous agitation magnétique 500 rpm. Les solutions filmogènes ainsi obtenues sont ensuite dégazées sous vide, coulées en boîtes de Petri ou sur plaques de verre munies de cales et séchées 2 h à 60 °C à Humidité Relative (HR) ambiante (Figure 20). Les films sont démoulés puis stockés à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en HR.

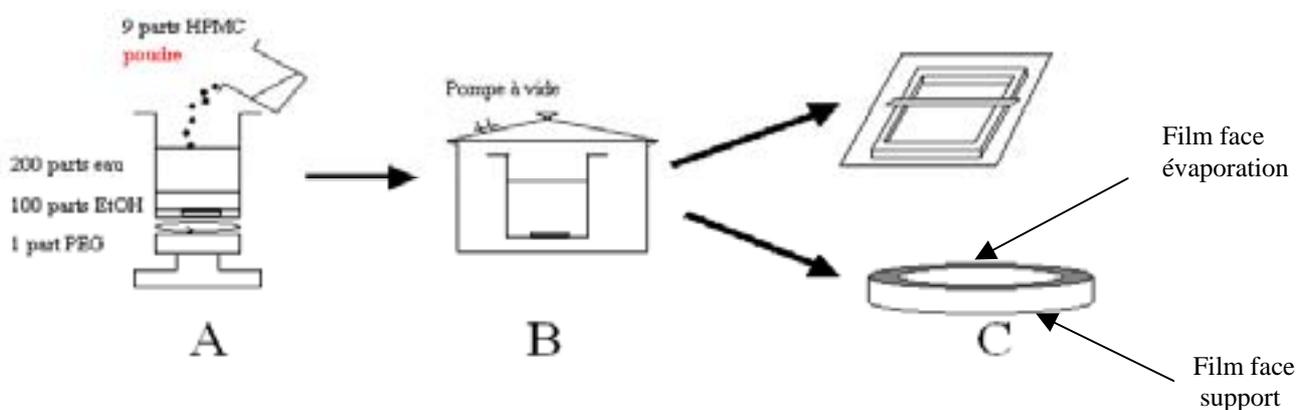


Figure 20 : Procédé de fabrication de films à base d'HPMC

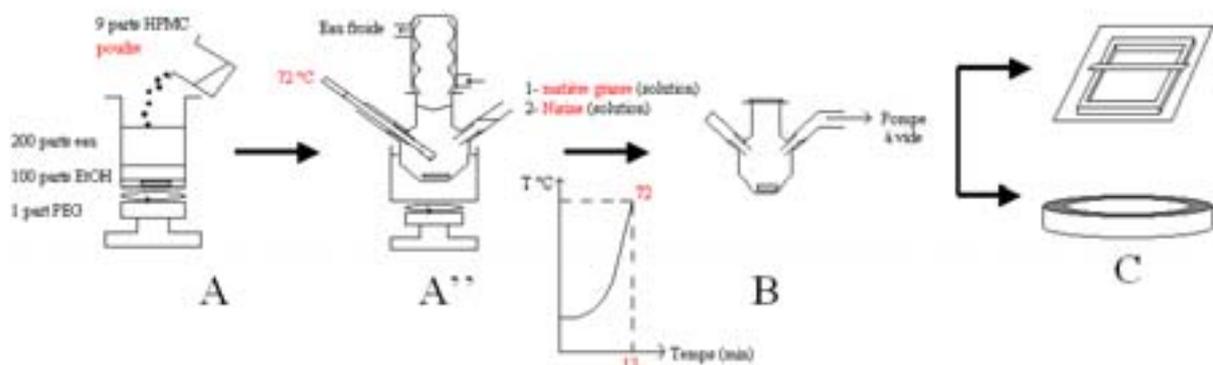
Une épaisseur initiale de 1 mm en solution filmogène permet d'obtenir des films secs ayant une épaisseur de  $26 \pm 12 \mu\text{m}$  (micromètre Mitutoyo).

Pour les films incorporant la bactériocine nisine, la solution filmogène est fabriquée comme précédemment avant d'y incorporer directement la nisine en solution et à la concentration désirée (incorporation avant l'étape B). L'incorporation de nisine n'induit aucun changement de l'épaisseur du film sec.

### II.2.1.2 Films composites

L'introduction de lipides se fait directement dans la solution filmogène avant formation du film. La solution, sous agitation magnétique (500 rpm), est chauffée à reflux au Bain-Marie à  $70-80^\circ\text{C}$  pendant 10-15 min pour fondre les composés hydrophobes. Le chauffage par reflux, en installant une colonne réfrigérante, a permis de limiter significativement les pertes en solvants surtout alcooliques. La solution filmogène est ensuite dégazée, coulée et séchée comme précédemment (Figure 21). Les films composites sont démoulés puis stockés 7 jours à  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  et  $50 \pm 5\%$  en HR.

Pour les films incorporant la nisine, la solution filmogène est fabriquée comme précédemment, chauffée, avant d'y incorporer directement la nisine en solution et à la concentration désirée au même moment que l'ajout des lipides.



**Figure 21 : Procédé de fabrication de films composites à base d'HPMC**

Les films secs ont une épaisseur de  $44 \pm 9 \mu\text{m}$  (micromètre Mitutoyo).

### II.2.1.3 Films réticulés et film réticulé composite

A la solution filmogène initialement préparée, différents pourcentages en acide citrique  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (% p/p HPMC) et en catalyseur dihydrogénophosphate de sodium  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (% p/p

acide citrique) sont ajoutés en poudre. La solution filmogène est agitée quelques minutes à 500 rpm pour solubiliser les composés, avant d'être dégazée, coulée et séchée comme précédemment. Les films secs sont démoulés pour être à nouveau traités thermiquement 15 min à 190 °C pour induire la réticulation (Zhou *et al.*, 1995), puis stockés 7 jours à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en HR.

Les films secs ont une épaisseur de  $29 \pm 8$  µm.

De la même façon, la solution filmogène peut être chauffée avant incorporation des composés hydrophobes. Les films sont traités thermiquement comme indiqué précédemment pour provoquer la réticulation. Les films réticulés composites sont ainsi obtenus avec une épaisseur finale de  $39 \pm 9$  µm (micromètre Mitutoyo).

L'activité anti-microbienne des films réticulés est obtenue par imprégnation des films dans des solutions de nisine selon une méthode adaptée de Scannell *et al.* (2000). Des films de dimension  $5 \times 5$  cm<sup>2</sup> sont placés dans 30 ml de solution de nisine à  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup> et agités 40 h à 4 °C. Les films imprégnés sont ensuite rincés à l'eau avant d'être séchés 20 min à 50 °C. Dans un deuxième temps, pour contrôler le procédé d'imprégnation, la quantité de nisine adsorbée sur le film réticulé est mesurée par désorption. Pour cela, des films de 2,5 cm<sup>2</sup> sont introduits dans 2 ml de solution de NaCl à 2 %, agités 24 h à 30 °C et rincés à l'eau distillée avant d'être séchés 20 min à 50 °C comme précédemment.

L'activité anti-microbienne des films imprégnés, « desorbés » et des solutions d'imprégnation et de désorption est déterminée respectivement par la technique des disques ou celle des puits.

## II.2.2 Etude du taux de réticulation

### II.2.2.1 Dosage en retour des fonctions acides

0,1 g de film sont découpés en très petites fractions et introduits dans 40 ml d'eau distillée. Après 3 h sous faible agitation, puis filtration sur membrane (Whatman N°42), les fonctions acide libres résiduelles de l'acide citrique sont titrées avec la soude (0,01 M) par un dosage en retour en présence d'un excès d'acide sulfurique (0,01 M). Le nombre de moles théoriques de COOH libres de l'acide citrique dans le film avant réticulation et le nombre de mole de COOH ayant réagi par réticulation en formant des fonctions ester (nombre de moles de COOH initiales /g de film sec – nombre de moles de COOH résiduelles /g de film sec) permettent de calculer le taux de réticulation suivant :

$$\text{Taux de réticulation (\%)} = \frac{\text{COOH ayant réagi par réticulation (mole/g)}}{\text{COOH initial (mole/g)}} \times 100$$

### II.2.2.2 Etude des fonctions ester par InfraRouge à Transformée de Fourier IRTF en transmittance

La réticulation est étudiée par mesure de l'absorbance  $A_1$  de la bande ester à  $1735 \text{ cm}^{-1}$  ramenée à l'absorbance  $A_2$  de la bande des fonctions CH des groupements méthyles à  $948 \text{ cm}^{-1}$  (Nicolet 210). La bande  $A_2$  est indépendante du taux de réticulation, et le rapport  $A_1/A_2$  a permis de s'affranchir des variations liées à l'épaisseur et à la texture du film.

Au préalable, des films contenant différents teneurs en acide citrique estérifié (Triethylcitrate) ont permis d'établir une courbe étalon des bandes  $A_1/A_2$  en fonction du nombre de moles de fonctions ester.

Le taux de réticulation est calculé comme précédemment en déterminant le nombre de mole de COOH ayant réagi par réticulation en formant des liaisons ester, ramené au nombre de moles théoriques de COOH libres de l'acide citrique dans le film avant réticulation.

## **II.2.3 Etude de la sensibilité du film à l'eau liquide et vapeur**

### II.2.3.1 Détermination du Coefficient de Transfert à la Vapeur d'Eau : CTVE

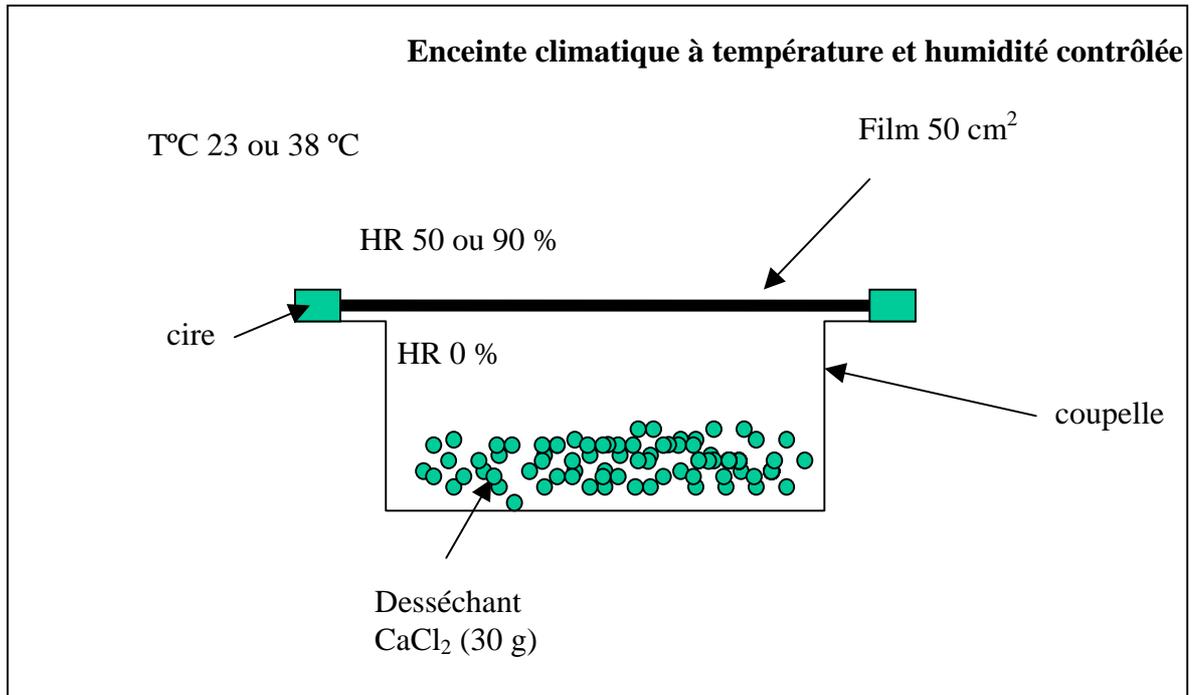
Le transfert de vapeur d'eau est décrit par les lois, d'adsorption du perméant sur le matériau, de diffusion à travers le film sous l'action d'un gradient de concentration et enfin de désorption, décrites par la loi de diffusion de Fick (Crank, 1975).

Le CTVE des bioemballages est déterminé suivant la norme AFNOR NF ISO 2528 (2001), basé sur une méthode gravimétrique, qui consiste à suivre la prise de masse d'une cellule de perméation au cours du temps. Des coupelles en aluminium contenant 30 g environ de desséchant anhydre  $\text{CaCl}_2$  sont recouvertes par des films de  $50 \text{ cm}^2$  de superficie et par la cire au niveau des bordures (Figure 22). Les coupelles sont placées dans une enceinte climatique à température et humidité contrôlée respectivement à  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 50 \pm 5 \text{ \%}$  en HR ou  $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C} / 90 \pm 5 \text{ \%}$  en HR. A partir de la courbe d'évolution de la masse des coupelles au cours du temps, les CTVE ( $\text{g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{atm}^{-1}$ ) pour un film d'épaisseur donnée sont déterminés en régime stationnaire, selon la formule suivante :

$$CTVE = \frac{\Delta m \times 24}{\Delta t \times S}$$

avec  $\Delta m$ : quantité d'eau (g) qui a diffusée à travers un film de surface  $S$  ( $m^2$ ) pendant un temps  $\Delta t$  (j).

Les mesures sont effectuées à la pression atmosphérique d'1 atm, selon des différences de pressions partielles en vapeur d'eau entre les deux faces du film de 0-90 % et 0-50 %.



**Figure 22 : Schématisation d'une coupelle pour la mesure des CTVE**

Des coupelles témoins, sans desséchant, sont conduites en parallèle pour estimer la quantité d'eau absorbée par le film.

### II.2.3.2 Isotherme de sorptions

20 mg de films secs sont pesés avec une précision de 0,1 mg dans des coupelles en plastique. Les coupelles sont ensuite placées en bocaux de verre contenant des solutions salines saturées pour obtenir différentes  $a_w$  : LiCl- H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>COOK-1,5 H<sub>2</sub>O, Mg(Cl)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, NaNO<sub>3</sub>, NaCl et KCl respectivement pour 0,12, 0,22, 0,33, 0,43, 0,53, 0,65, 0,75 et 0,85 en activité de l'eau ( $a_w$ ) à  $23 \pm 1$  °C. L'absorption d'eau à l'équilibre (g d'eau / g d'échantillon) est déterminée après séchage des films 2h à 103 °C (balance IR mettler). Les résultats expérimentaux sont traités mathématiquement à l'aide de l'équation de

Guggenheim-Anderson-DeBoer (GAB) pour représenter graphiquement les cinétiques de sorption (Velázquez de la Cruz *et al.*, 2001). Le modèle de GAB est :

$$x = \frac{x_m c k a_w}{(1 - k a_w) (1 - k a_w + c k a_w)}$$

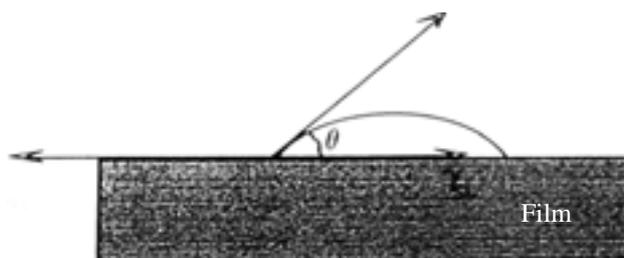
avec x: quantité d'eau absorbée à l'équilibre calculée (g d'eau / g d'échantillon),  $a_w$  : activité de l'eau,  $x_m$  : quantité d'eau absorbée mesurée (g d'eau / d'échantillon), c : constante relative à l'effet de la température, k : coefficient de GAB.

### II.2.3.3 Goniomètre ou angle de contact

La goniométrie est une analyse de l'énergie de surface des emballages. Elle consiste à déposer des gouttelettes de différents solvants (hydrophiles et hydrophobes) à la surface du film et à mesurer des énergies de surface du solide  $\gamma_s$ , du liquide  $\gamma_l$  et de l'énergie interfaciale solide liquide  $\gamma_{sl}$ . Ces énergies tiennent compte de la texture de la surface du film (porosité et aspérité) et des interactions chimiques entre le film et le solvant. L'énergie de surface du liquide correspond à sa tension superficielle. L'énergie de surface du solide  $\gamma_s$  est plus difficile à déterminer. Elle passe par l'énergie de surface critique  $\gamma_c$  (approche de Zisman) qui est définie comme étant la limite au delà de laquelle tout liquide de tension superficielle  $\gamma_l$  inférieure à  $\gamma_c$  peut s'étaler parfaitement sur le film. La relation  $\cos(\theta)=f(\gamma_l)$  pour différents liquides, induisant différents angles de contact  $\theta$  à l'interface liquide-film permet de calculer cette valeur d'énergie de surface critique. Au final,  $\gamma_{sl}$  peut être alors déterminée comme suit :

$$\gamma_s = \gamma_l \cos(\theta) + \gamma_{sl}$$

$\gamma_{sl}$  mesure un coefficient de mouillabilité. Le mouillage qui se produit lorsqu'une goutte d'un liquide s'étale à la surface d'un solide dépend des tensions interfaciales liquide/air, liquide/solide et air/solide, qui sont elles-mêmes liées aux variations de l'angle de contact  $\theta$  (Figure 23) (Krüss).



**Figure 23 : Illustration de l'angle de contact mesuré par goniométrie**

Une gouttelette d'eau est ainsi déposée à la surface de films totalement lisses. L'angle de contact  $\theta$  à l'interface eau / film est mesuré avec une précision de  $1^\circ$  dès le dépôt de la gouttelette au moyen du goniomètre Krüss muni d'une micro-seringue. L'angle  $\theta$ , variant de  $0^\circ$  pour des films hydrophiles à  $90^\circ$  pour des films hydrophobes, est mesuré après dépôt de la goutte d'eau en 9 points différents sur chaque film (Krüss).

#### II.2.3.4 Résistance du film à l'immersion dans l'eau

La solubilité des films dans l'eau est mesurée par immersion des films dans 50 ml d'eau distillée pendant 24 h et à  $25^\circ\text{C}$ . La solubilité est exprimée en pourcentage par rapport au poids sec initial du film et calculée comme suit:

$$S(\%) = \frac{\text{masse initiale} - \text{masse résiduelle}}{\text{masse initiale}} \times 100$$

La masse résiduelle est obtenue après récupération du film non soluble et séchage sur balance infra-rouge (Mettler) à  $103^\circ\text{C}$ .

## **II.2.4 Caractérisation physique des films**

### II.2.4.1 Epaisseur

L'épaisseur des films a été mesurée au moyen du micromètre Mitutoyo en 10 points différents sur chaque film avec une précision de  $0,1\ \mu\text{m}$ .

### II.2.4.2 Propriétés mécaniques

La résistance mécanique, incluant la force à la rupture ( $F_R$ , MPa), le module de Young ( $Y$ , MPa) et l'allongement ( $A$ , % au point de rupture), est mesurée au moyen du tensiomètre Adamel Lhomargy selon la norme AFNOR NF ISO 527-3 (1995). Dix répétitions sont réalisées sur des films préalablement conditionnés 7 jours à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en humidité relative. Les films fixés entre deux mâchoires (l'une fixe, l'autre mobile), d'une dimension de 25mm x 60 mm, sont étirés de façon uniaxiale à une vitesse constante de  $3 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  avec un module de 5 daN de capacité (Figure 24).

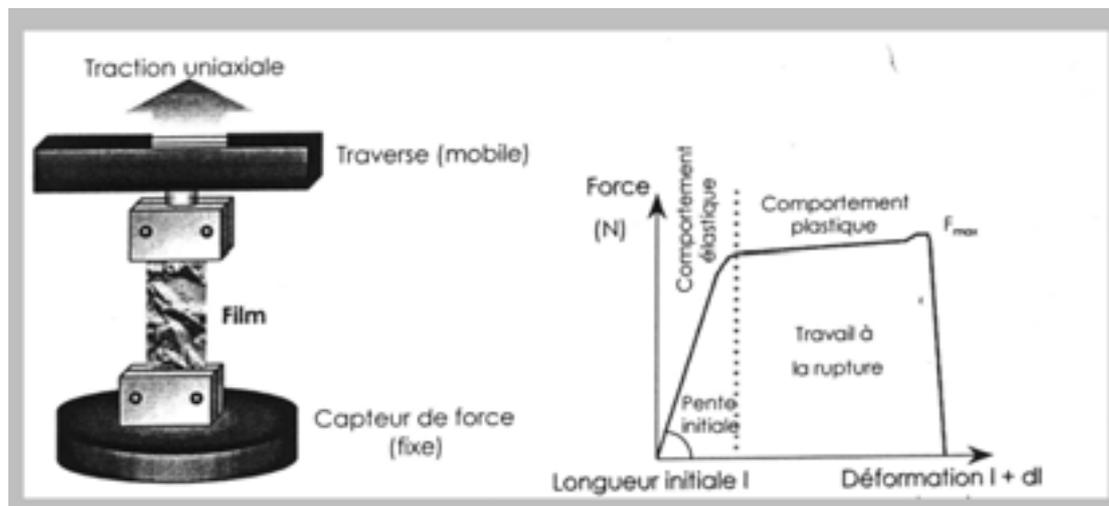


Figure 24 : Dispositif de traction (Quezada Gallo, 1999)

Les courbes obtenues donnent l'évolution de la force résultante en fonction de la déformation et permettent de calculer le module d'élasticité ou module de Young  $Y$ , exprimé en MPa, et égal à :

$Y = \frac{\text{pente de la courbe}}{\text{section}}$  avec la section qui est égale au produit de l'épaisseur du film par sa largeur (25 mm)

ainsi que la force à la rupture  $F_R$ , exprimée en MPa, égale à :

$$F_R = \frac{\text{force maximale}}{\text{section}}$$

et le pourcentage de déformation ou allongement  $A$ , exprimé en %, et égal à :

$$A = \frac{dl}{I} \times 100$$

### II.2.4.3 Couleur

Les mesures sont données selon le référentiel  $L^*a^*b^*$ . Contrairement au repère  $Yxy$ , le système tristimulus  $Lab$  a été choisi car il représente étroitement la sensibilité de l'œil humain. Dix mesures sont faites sur chaque film.  $L$  (luminescence) et les coordonnées chromatiques  $a$  (du vert au bleu) et  $b$  (du jaune au rouge) sont déterminées en plaçant le film sur une surface noire (Figure 25) (Minolta CR-310). La surface noire a été utilisée pour une meilleure mise en évidence de l'opacité des films composites par rapport au film témoin après introduction des matières lipidiques.

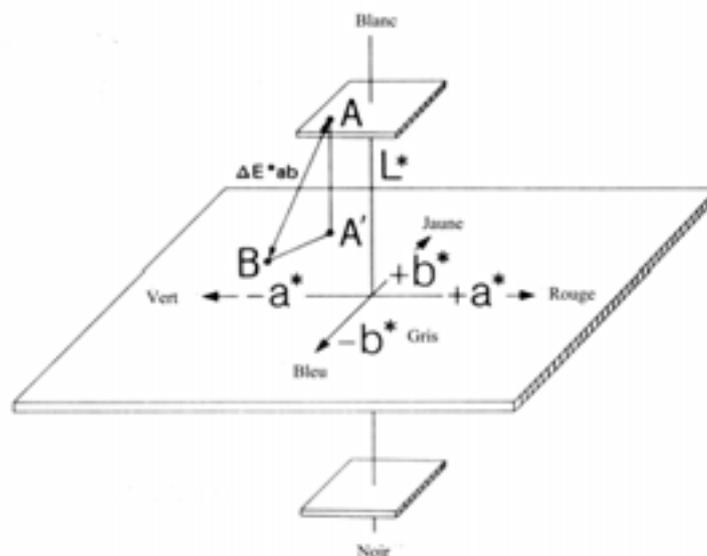


Figure 25 : Schéma de l'espace des couleurs selon le référentiel Lab

### II.2.4.4 Rugosité

Les mesures de la rugosité sont réalisées selon la norme NF Q03-049 (1972). La rugosité mesure l'importance des déformations en intégrant la profondeur, l'amplitude et le nombre de ces déformations. La méthode mesure le débit d'air passant entre une couronne métallique totalement lisse et plane et la surface du film ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Dix mesures sont réalisées pour chaque film (Bendtsen), préalablement conditionné 7 jours à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en HR.

### II.2.4.5 Caractérisation des films par IRTF

Les interactions entre les différents composés du film peuvent être caractérisées par IRTF selon l'intensité et la fréquence de vibration des liaisons qui unissent les différents atomes de chaque molécule (Nicolet 210).

Les principaux types de vibration de liaisons qui existent sont :

- ✓ Vibration de valence ou d'élongation (stretching) dans laquelle la distance entre deux atomes varie en alternance, tout en restant dans l'axe de la liaison d'origine.
- ✓ Vibration de déformation angulaire (bending) où les atomes se déplacent perpendiculairement à la liaison de valence et, donc, en faisant varier l'angle des liaisons.

L'énergie absorbée par une liaison interatomique, lors de l'excitation provoquée par un faisceau de même fréquence que la vibration de la liaison, est donnée par la relation :

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

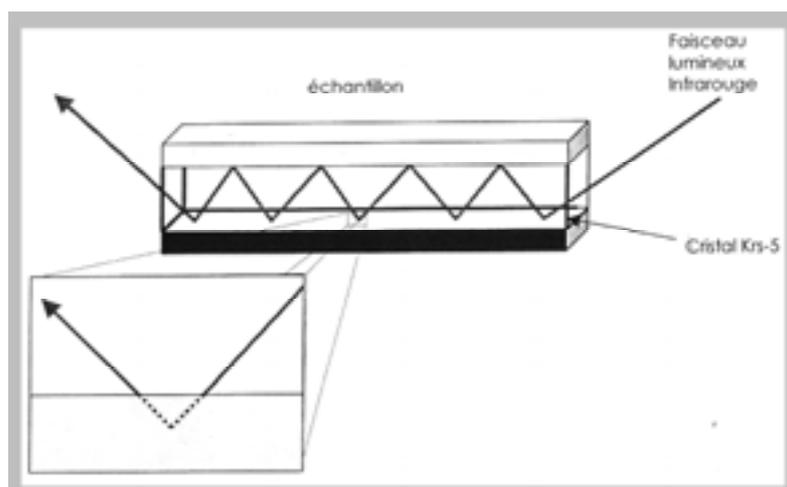
- où
- E, énergie absorbée (J),
  - h, la constante de Planck ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  J.s),
  - c, vitesse de la lumière ( $2,998 \cdot 10^8$  m.s<sup>-1</sup>)
  - $\lambda$ , longueur d'onde (cm)

Le nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) est définie comme l'inverse de la longueur d'onde.

L'analyse IRTF en ATR s'effectue directement sur des films préalablement conditionnés 7 jours à  $23 \pm 1$  °C et  $50 \pm 5$  % en HR, dans la plage 500-4000 cm<sup>-1</sup> en choisissant 200 scans et une résolution de 4.

Le principe de l'ATR est représenté dans la Figure 26. D'après la théorie électromagnétique de la lumière, lorsqu'un faisceau lumineux arrive à l'interface entre deux milieux avec un angle d'incidence supérieur à une certaine limite, il peut être réfléchi totalement. Lors de cette réflexion, une certaine quantité d'énergie lumineuse pénètre légèrement dans le milieu et subit ensuite la réflexion. Le faisceau réfléchi transporte moins d'énergie que le faisceau incident et il est donc possible de réaliser un spectre d'absorption. L'intérêt de cette méthode est de pouvoir analyser plus finement la surface des films, même opaques, puisque le faisceau ne traverse pas le film comme en transmittance.

L'accessoire ATR est équipé d'un cristal de Krs-5 avec un angle d'incidence de 45 °.



**Figure 26: Principe de l'ATR en IRTF**

Le spectre IR ainsi obtenu permet plus particulièrement de caractériser les bandes de vibrations CH des groupements alkyles des chaînes hydrogénéocarbonées  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  à 1460 et  $1296\text{ cm}^{-1}$  de l'HPMC, des fonctions carbonyles vers  $1740\text{ cm}^{-1}$  (bande de vibration de la fonction carbonyle de l'acide) et des fonctions amides des liaisons peptidiques vers  $1640\text{ cm}^{-1}$ .

#### II.2.4.6 Analyse thermique différentielle

L'ATD a été utilisée pour étudier les propriétés thermiques des matériaux et déterminer les températures de transition vitreuse  $T_g$  et de fusion des différentes catégories de films (Mettler).

L'ATD détermine la variation d'enthalpie d'une réaction ou la variation de chaleur spécifique liée à un changement d'état physique. On mesure des flux de chaleur différentiels nécessaires pour maintenir à la même température un échantillon et une référence thermique neutre (capsule vide scellée dans notre cas).

10 mg d'échantillon de films (Mettler), préalablement conditionnés 7 jours à  $50 \pm 5\%$  en HR et  $23 \pm 1\text{ °C}$ , sont placés dans des cellules en aluminium hermétiques et soumis à une température croissante dans la plage de température ambiante à  $250\text{ °C}$  avec une montée en température de  $10\text{ °C.min}^{-1}$ . Le thermogramme obtenu représente l'enthalpie (endo ou exothermique) en fonction de la température.

### III Etude des films ou enrobages anti-microbiens

#### III.1 Matériels

Ils sont équivalents à ceux détaillés dans le chapitre des bioemballages.

#### III.2 Méthodes

Les films homogènes à base d'HPMC, composites, réticulés et composites réticulés sont fabriqués exactement comme présentés dans le chapitre des bioemballages.

La nisine, diluée dans le tampon phosphate pH 6,1 50 mM, est ajoutée à la solution filmogène et homogénéisée quelques minutes avant la formation des films

##### III.2.1 Activité anti-microbienne des enrobages

Environ 20-30 et 100-200 UFC ont été inoculées en surface de boîte de Petri de 50 mm de Tryptose gélosé à partir de pré-culture de 18 h de *L. innocua* ou *S. aureus*. Après quelques minutes de séchage sous hotte à flux laminaire, 2,1 ml de solution de nisine ou enrobages (solution filmogène) à  $5 \times 10^3$  ou  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup> sont versés en surface, puis séchés 5 h sous hotte à flux laminaire (Figure 27).

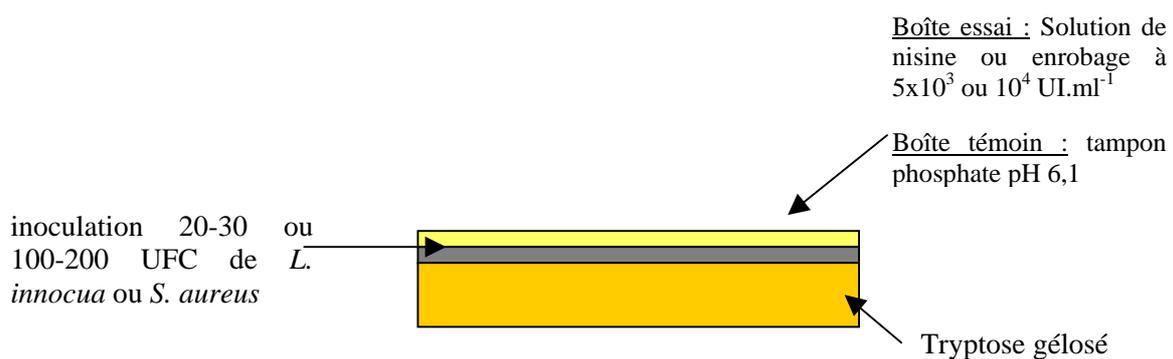


Figure 27 : Principe de mesure de l'activité anti-microbienne des enrobages

Les milieux sont incubés à 37 °C pendant 24 à 48 h avant dénombrement. Des boîtes témoins, où nisine et enrobage sont remplacés par une solution de tampon phosphate pH 6,1 50mM, sont menées parallèlement. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{nombre UFC en boîte témoin} - \text{nombre UFC en boîte essai}}{\text{nombre UFC en boîte témoin}} \times 100$$

### III.2.2 Activité anti-microbienne des films : technique des disques

Des disques de films avec ou sans lipide, réticulés ou non, de 5 mm de diamètre sont déposés sur milieu tryptose Agarensemencé préalablement à 0,1 % (v/v) à partir d'une pré-culture de 18 h de *M. luteus* ou de *L. monocytogenes*. Après stockage 4 h à 4 °C, les milieux sont incubés 24 à 48 h à 30 °C. L'activité des films est mesurée en diamètre de zones d'inhibition (mm) avec une précision de 0,5 à 1 mm.

D'autre part, l'activité inhibitrice des films composites est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport à celle de films sans lipides (film témoin), calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{diamètre d'inhibition du film témoin} - \text{diamètre d'inhibition du film composite}}{\text{diamètre d'inhibition du film témoin}} \times 100$$

## IV Etude des interactions nisine-acide stéarique ou stéarate de méthyle-ion calcium Ca<sup>2+</sup>

### IV.1 Matériels

#### IV.1.1 Produits

- ✓ Carbonate de calcium CaCO<sub>3</sub> (70,09 g.mol<sup>-1</sup>), chlorure de potassium KCl (74,45 g.mol<sup>-1</sup>) et chlorure de sodium NaCl (58,44 g.mol<sup>-1</sup>) sont des produits Prolabo.
- ✓ Kit de dosage des protéines : BCA (Pierce)

### IV.1.2 Appareillages

- ✓ Spectromètre d'absorption atomique à flamme : le Perkin Elmer Analyst 100 permet de doser le calcium en absorption atomique et le sodium et le potassium en émission. Un atome est constitué d'un noyau de positrons, entouré d'électrons répartis en différentes orbitales. Un électron peut passer d'une orbitale inférieure (état fondamental) à une orbitale supérieure (état excité) par absorption d'énergie. Le principe de l'émission atomique est un passage d'un atome d'un état fondamental stable à un état excité instable par absorption d'une énergie (thermique). Le retour spontané à l'état fondamental émet une énergie électromagnétique sous forme de photons mesurables à des longueurs d'onde spécifiques à chaque atome. Le dosage s'effectue par mesure de la quantité d'énergie (lumière) émise. Le principe de l'absorption atomique est inverse. Une énergie sous forme de photons à une longueur d'onde spécifique excite l'atome qui passe en état excité instable. Le dosage se fait cette fois ci via la mesure de la quantité d'énergie (lumière) absorbée. La lumière est émise par des lampes à cathode creuses renfermant l'élément à doser et remplies d'un gaz rare (Argon ou Néon).
- ✓ Module d'analyse thermique différentielle : l'ATD Perkin Elmer est basé sur le principe de la compensation de puissance. Au cours de la fusion, un échantillon donné absorbe une certaine quantité d'énergie, correspondant à une variation d'enthalpie, proportionnelle à son état d'organisation.

## IV.2 Méthodes

### IV.2.1 Préparation des solutions d'ions calcium à 500 mg.l<sup>-1</sup>, et des ions sodium Na<sup>+</sup> et potassium K<sup>+</sup>

0,87 g de carbonate de calcium sont mélangés à 700 ml d'eau. L'acidification par 60 ml de HCl permet d'éliminer le carbonate sous forme de CO<sub>2</sub> gazeux et d'eau. Le volume de la solution finale est ajusté à 1 l pour obtenir une solution d'ions calcium Ca<sup>2+</sup> à 500 mg.l<sup>-1</sup>. Les solutions d'ions Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>, aux concentrations désirées, sont obtenues en solubilisant du

NaCl ou du KCl dans l'eau ultra-pure. Toutes les dilutions aux concentrations désirées sont faites dans du tampon phosphate pH 6,1 50 mM.

#### IV.2.2 Dosage des ions par absorption atomique

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont dosés en absorption atomique à 422,7 nm. Les ions sodium  $\text{Na}^+$  et potassium  $\text{K}^+$  du tampon phosphate sont quant à eux dosés en émission atomique par le même spectromètre respectivement à 589 et 766,5 nm (Perkin Elmer Analyst 100).

#### IV.2.3 Dosage de la nisine

Le dosage colorimétrique de la nisine est réalisé par l'Acide BiCinchoninique (BCA). La réduction des ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  par les liaisons peptidiques des protéines permet de libérer des ions cuivreux  $\text{Cu}^+$  qui interagissent avec l'acide bicinchoninique en milieu basique pour former un complexe de couleur violette dosable à 562 nm (Figure 28).

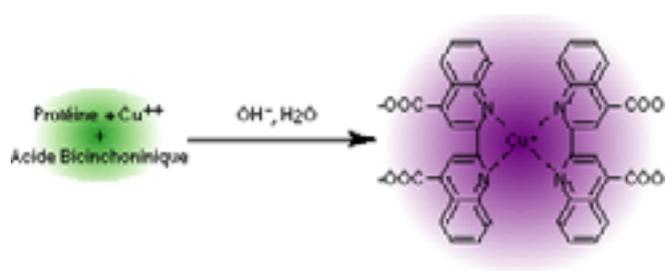


Figure 28 : Principe du dosage des protéines au BCA

50 parties de la solution A (acide bicinchoninique) sont mélangées à 2 parties de la solution B (ions cuivriques) pour obtenir la solution dite de travail. 0,5 ml de la solution de travail sont ajoutés à 0,5 ml d'échantillon, avant de traiter le mélange 1 h à 60 °C et de mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 562 nm.

#### IV.2.4 Interactions nisine-acide stéarique ou stéarate de méthyle-ion calcium en solution et dosage de la nisine ou du calcium résiduels

Des solutions tampon pH 6,1 (40 ml) contenant différentes concentrations en nisine et/ou en calcium et différents pourcentages en acide stéarique ou en stéarate de méthyle sont agitées à 500 rpm pendant 10 min à 80 °C. Après traitement, les échantillons sont refroidis en bain de glace et filtrés sur membrane 0,2 µm (Millex GV, Millipore). La nisine résiduelle ou le calcium résiduels (non fixés) sont dosés respectivement avec le kit colorimétrique BCA à  $DO_{562nm}$  ou par mesure de l'absorption atomique à  $DO_{422,5nm}$ .

La teneur en lipide est exprimée en pourcentage (p/p HPMC) par rapport à une teneur théorique en HPMC, qui aurait été utilisée pour réaliser une solution filmogène. La quantité de lipide (%) à rajouter à une solution de 40 ml est ainsi calculée par rapport à 1,2 g d'HPMC théorique.

#### IV.2.5 Analyse thermique différentielle des cristaux d'acide stéarique

Après interaction des ions calcium avec l'acide stéarique en fusion (500 rpm, 10 min, 80 °C), les échantillons de cristaux d'acide stéarique (4 à 6 mg), obtenus après recristallisation à froid, sont étudiés par analyse thermique différentielle (Perkin Elmer). Les thermogrammes de l'enthalpie ( $J.g^{-1}$ ) en fonction de la température (°C) des échantillons sont analysés selon la séquence suivante :

- ✓ Isotherme à 25 °C pendant 10 min
- ✓ Montée en température de 25 à 90 °C en chauffe constante avec une pente de  $5\text{ °C.min}^{-1}$
- ✓ Isotherme à 90 °C pendant 10 min
- ✓ Descente en température de 90 à 25 °C selon une pente inverse de  $-5\text{ °C.min}^{-1}$
- ✓ Isotherme à nouveau à 25 °C

Des échantillons témoins d'acide stéarique, ayant subi le même traitement en solution tampon phosphate pH 6,1 mais en absence de nisine ou de calcium, sont conduits en parallèle.

## V Diffusion de la nisine dans un gel d'agarose

### V.1 Matériels

- ✓ Agarose : pur à 99 % (Eurobio, 18052).
- ✓ Végétaline : produit de cuisine vendu dans le commerce correspondant à l'huile de coprah totalement hydrogénée.
- ✓ Centrale d'acquisition informatique : AOIP SA 70

### V.2 Méthodes

#### V.2.1 Formation du gel d'agarose :

Le gel d'agarose est fabriqué à 3, 6 ou 8 % en dispersant dans un bêcher l'agarose dans l'eau ultra-pure. La suspension est chauffée 10 min au bain-marie 70-80 °C (condition de gélification) sous agitation manuelle continue. Le gel est refroidi 3h à température ambiante avant d'être stocké à 4 °C.

Les gels composites incorporant 3 % en agarose et 50 % (p/p agarose) d'acide stéarique, de stéarate de méthyle ou encore de végétaline sont préparés comme précédemment en chauffant la suspension pendant 10 min au bain-marie 70-80 °C.

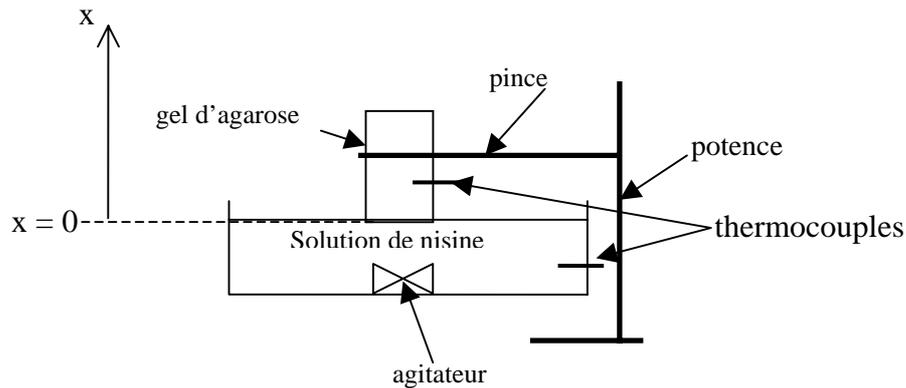
Les gels de forme cylindrique ont une longueur de 70 mm et un diamètre de 70 mm.

#### V.2.2 Montage expérimental

Avant d'entreprendre les manipulations de diffusion, les gels d'agarose sont enveloppés de plusieurs couches de paraffine et de parafilm. Ceci permet de rendre le gel plus ferme, latéralement imperméable à l'eau et d'éviter tout phénomène de séchage pendant la durée de la diffusion.

Les expériences de diffusion sont réalisées dans des enceintes contrôlées en température entre 5 et 23 °C pendant 6 ou 12 jours. La face inférieure du gel (qui sera en contact avec la solution de nisine) est découpée de façon à obtenir une face totalement lisse et horizontale.

Les gels sont ensuite placés au-dessus des différentes solutions de nisine aux concentrations désirées. La face inférieure est amenée lentement à la surface de la solution de nisine de façon à assurer un contact étroit à l'interface sans plonger le gel dans la solution (Figure 29). Ceci permet d'assurer une diffusion mono-directionnelle le long de l'axe x. Les solutions de nisine sont agitées lentement et continuellement pendant toute la durée de l'expérience.



**Figure 29 : Schéma du montage expérimental de la diffusion de la nisine dans le gel d'agarose**

La concentration en nisine dans la solution ( $C_{sol}$ ) est mesurée quotidiennement par BCA et pendant toute la durée de la diffusion pour vérifier l'absence de toute variation de concentration. Les températures des gels, de la solution de nisine et de l'enceinte sont contrôlées à raison d'une mesure toutes les 15 min au moyen de thermocouples reliés à la centrale informatique d'acquisition. Après 6 ou 12 jours de diffusion, les gels cylindriques d'agarose sont récupérés et débarrassés de leur paraffine et parafilm. Commenant par la face du gel qui était en contact avec la solution de nisine ( $x = 0$ ), le gel est découpé en fines lamelles de 1 mm au moyen d'une trancheuse semi-professionnelle. La nisine est extraite de chaque tranche (voir paragraphe « extraction de la nisine du gel et dosage ») et les concentrations expérimentales en nisine ( $C_{exp}$  exprimée en  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de la solution du gel) sont réduites selon la formule ci-dessous avant d'être représentées graphiquement en fonction de la distance x de diffusion. Les concentrations réduites ( $C_{red}$ ) en nisine dans le gel sont calculées comme suit :

$$C_{red}(x) = \frac{C(x)}{C_{sol}}$$

avec  $C(x)$  profil de concentration en nisine (en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de gel)  
 $C_{\text{sol}}$  concentration en nisine de la solution rapportée au volume total de gel (en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de gel)

Comme les concentrations en nisine initiale et dans la solution de diffusion ne sont pas exactement identiques entre les différents essais,  $C_{\text{red}}$  permet de s'affranchir de cette différence et de représenter graphiquement des profils de diffusion visuellement comparable.

### V.2.3 Extraction de la nisine du gel et dosage :

A la fin de chaque expérience de diffusion, les gels d'agarose sont découpés en tranches d'un mm d'épaisseur et dont le poids moyen varie de 3 à 4 g. Ces tranches sont découpées en petits cubes, broyées au mortier et diluées au demi avec HCl 0,01M. Les broyats sont maintenus pendant 16 h à 4 °C avant d'être filtrés sur membrane 2,5  $\mu\text{m}$  (Whatman N° 42). Enfin, la nisine dans le perméat est dosée avec le kit BCA. Le profil expérimental  $C_{\text{exp}}=f(x)$  de concentration en nisine ( $C_{\text{exp}}$ ) en fonction de la profondeur de pénétration ( $x$ ) dans le gel est transformé en  $C_{\text{red}}=f(x)$  avant d'être tracé.

La concentration en nisine extraite du gel est déterminée à partir d'une courbe étalon préalablement réalisée à partir de gels contenant des concentrations connues en nisine. La pente de cette droite est notée  $A_1$ .

Une deuxième courbe étalon est obtenue à partir de solutions de nisine libre et une seconde pente de la droite, notée  $A_2$ , est déterminée.

Le rapport des pentes des deux droites étalons permet de calculer le rendement d'extraction comme suit :

$$R = \frac{A_1}{A_2} \times 100$$

avec  $A_1$  : pente de la droite de la concentration en nisine dans le gel

$A_2$  : pente de la droite de la concentration en nisine en solution

## V.2.4 Modèle de diffusion :

### V.2.4.1 Modèle du mur semi-infini

La deuxième loi de Fick peut être utilisée pour décrire la diffusion dans les solides, et dans le cas d'une diffusion monodimensionnelle, l'équation différentielle s'écrit (Crank, 1975 ; Bird *et al.*, 1960) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D \frac{\partial C}{\partial x} \right)$$

où D est le coefficient de diffusion apparent et  $\frac{\partial C}{\partial x}$  représente le gradient de concentration en nisine.

Pour pouvoir résoudre cette équation en géométrie plane semi-infinie, il est nécessaire de lui associer une condition initiale ainsi que deux conditions aux limites. Dans le cas du mur semi-infini, les conditions sont les suivantes :

$$t=0 \quad \forall x \geq 0 \quad C=C_{\text{init}}=0$$

$$\forall t \geq 0 \quad x \rightarrow \infty \quad C = C_{\text{init}} = 0$$

$$\forall t > 0 \quad x=0 \quad C=C_{\text{sol}}^*$$

avec  $C_{\text{init}}$  = concentration en nisine dans le gel au temps initial (=0) et  $C_{\text{sol}}^*$  = concentration d'équilibre en nisine dans le gel à  $x=0$  ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ).

Ainsi, pour satisfaire ces conditions, il faut imposer une concentration en nisine constante à la limite ( $C_{\text{sol}}$ ).

### V.2.4.2 Résolution du modèle

D'après Crank (1975), lorsque le coefficient de diffusion D ne dépend pas de la concentration, la solution du mur semi-infini devient :

$$\frac{C_{\text{sol}}^* - C}{C_{\text{sol}}^* - C_{\text{init}}} = \text{erf} \left( \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \quad (\text{a})$$

où erf est la fonction erreur définie par:  $\text{erf}(u) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^u \exp(-u^2) du$

avec  $D$  : coefficient de diffusion de la nisine dans le gel, supposé constant ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ),  
 $C$  : concentration en nisine dans le gel ( $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) à la profondeur  $x$  (m),  
 $t$  : durée de mise en contact du gel avec la solution de nisine.

Pour que cette équation soit valable, il faut satisfaire la condition suivante, qui traduit le caractère semi-infini du modèle :

$$Fo = \frac{Dt}{L^2} < 0,05 \quad \text{avec } Fo : \text{nombre de Fourier,}$$

$$L : \text{demi-hauteur du gel (m).}$$

#### V.2.4.3 Identification du paramètre D

D'après l'équation (a), la connaissance du profil de concentration en nisine dans le gel permet de déterminer le coefficient de diffusion  $D$  (seule inconnue de l'équation). Ainsi, ce coefficient a été identifié en utilisant une méthode d'optimisation qui permet de minimiser l'écart entre le profil expérimental et le profil théorique calculé. Cette méthode repose sur l'utilisation de l'algorithme de Levenberg-Marquardt, déjà programmé dans la routine BCLSF de la bibliothèque IMSL (logiciel Microsoft Developer Studio 97 - Visual Fortran Professionnel - Edition 5.0A). La qualité de la correspondance entre les deux profils de concentration expérimental et calculé a été mesurée par l'écart moyen défini par :

$$\bar{e} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (C_{\text{exp}} - C_{\text{cal}})^2}}{n} \quad \text{avec } n : \text{nombre de tranches de gel.}$$

Et  $\bar{e} (\%) = \frac{\bar{e}}{C_{\text{sol}}} \times 100$  correspond à l'écart moyen en %.

Par ailleurs, tous les essais ont été répétés trois fois et ont donné trois profils expérimentaux, chacun ayant 10 à 15 points ( $C_{\text{exp}}$ ,  $x$ ). Nous avons ensuite identifié numériquement le coefficient de diffusion  $D$  en choisissant de prendre tous les points expérimentaux de l'ensemble des essais. En procédant ainsi, on ne peut pas donner un écart-type sur la mesure, mais on pense que la multiplication des points permet d'améliorer le calcul mathématique pour identifier  $D$ , surtout que ce calcul repose sur la minimisation des écarts entre les profils

expérimentaux et théoriques : plus les points seront nombreux, plus la minimisation des écarts sera fine.

## VI Analyse statistique des données

Les expériences ont été répétées 3, 6 ou 9 fois. Le calcul de l'intervalle de confiance ( $p = 95\%$ ) à l'aide de la loi statistique de Student est réalisé pour mettre en évidence les différences significatives. Les calculs de la moyenne, de la variance et de l'intervalle de confiance de Student sont effectués comme suit :

La moyenne  $\bar{m} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$

La variance  $S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (m_i - \bar{m})^2}{n-1}$

L'intervalle de confiance  $\sigma = \frac{t x \sqrt{S^2}}{\sqrt{n}}$

Le coefficient de Student  $t(v, p)$  est déterminé à partir de la table de Student en fonction du degré de liberté ( $v$ ) égal au nombre d'échantillon ( $n - 1$ ) et de la probabilité fixée à 0,05 (95 %).

# RESULTATS ET DISCUSSION

« Emballer, c'est chasser ... »

# RESULTATS ET DISCUSSION

## partie 1

## I Cinétique de croissance et caractérisation des souches

Avant d'envisager toute inhibition bactérienne, il était nécessaire de caractériser les souches testées en calculant d'une part le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) et en identifiant d'autre part leurs différentes phases de croissance (phases de latence, exponentielle et stationnaire) dans les conditions expérimentales choisies. Les allures de ces cinétiques de croissance, ainsi déterminées en condition non inhibantes, permettront d'évaluer l'effet anti-bactérien des différentes bactériocines.

*L. monocytogenes*, *L. innocua* et *S. aureus* ont été cultivées en bouillon tryptose. Les cinétiques de croissance sont données dans la Figure 30.

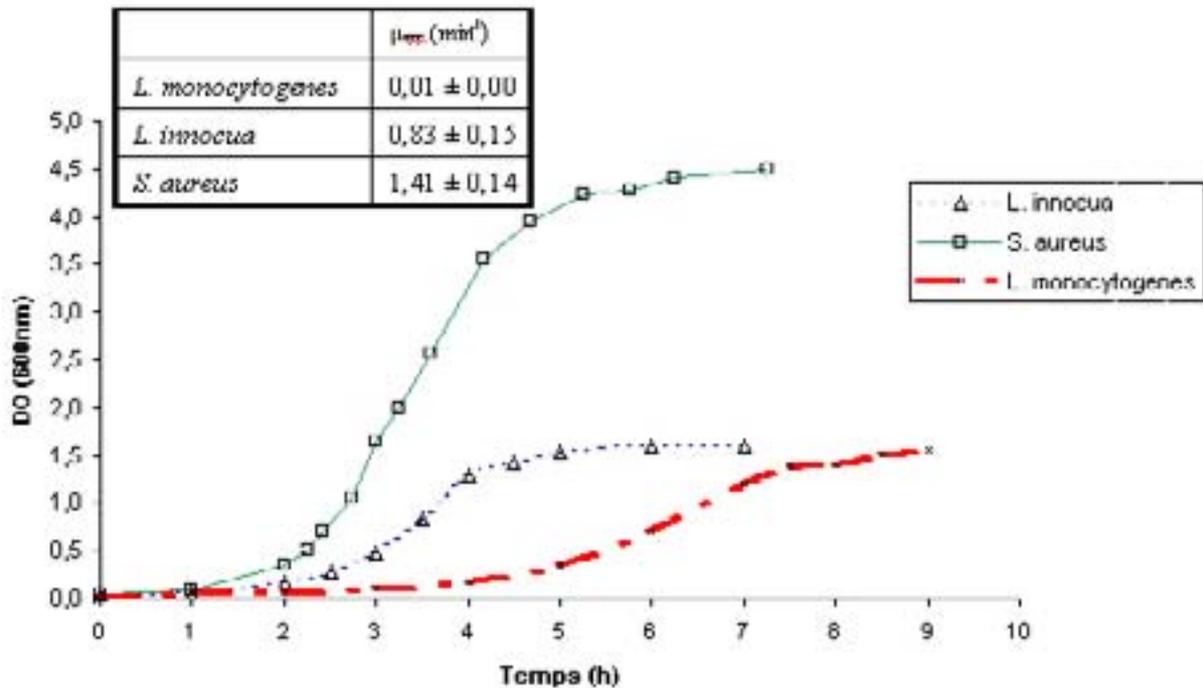


Figure 30 : Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes*, *L. innocua* et *S. aureus* en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

Dans des conditions expérimentales identiques quelque soit la bactérie, *S. aureus* montre le plus haut taux de croissance, avec une densité optique maximale 4 à 5 fois plus élevée par rapport à celle des *Listeria*. *L. innocua* croît beaucoup plus rapidement que *L. monocytogenes*. Toutefois, les densités optiques maximales sont équivalentes et voisines de 1,5.

Les phases de latence durent 2 à 3 heures pour *L. innocua* et *S. aureus* et 4 à 5 heures pour *L. monocytogenes*.

Entre 0,1 et 1,3 d'absorbance (600nm) pour les *Listeria*, et entre 0,1 et 4 pour *S. aureus*, les bactéries se trouvent en phase exponentielle de croissance. Dans la suite des travaux, l'effet inhibiteur des bactériocines sur les bactéries en phase exponentielle de croissance sera testé par addition des bactériocines aux concentrations désirées à une absorbance (600nm) égale à 0,6.

Au delà des absorbances (600nm) de 1,5 et 5 respectivement pour les *Listeria* et *S. aureus*, les bactéries se trouvent en phase stationnaire de croissance. La bactériocine est soit additionnée à ces Absorbances (600nm) et l'effet anti-bactérien est mesuré par chute d'absorbance (600nm) en fonction du temps, soit l'absorbance (600 nm) initiale est fixée à 0,6 par dilution avant d'ajouter les bactériocines : ceci permet de tester l'effet des bactériocines à des rapports charges microbiennes sur concentration en nisine équivalents entre les phases stationnaire et exponentielle de croissance.

## **II Activité anti-bactérienne de la nisine : détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

Pour déterminer la concentration en nisine à introduire dans le film actif, la sensibilité à la nisine des bactéries *Listeria* ou *Staphylococcus* a été tout d'abord déterminée à l'état libre. Pour cela, la bactériocine a été testée en solution et la CMI pour chaque bactérie cible a été déterminée. L'activité anti-bactérienne de la nisine a été étudiée à la fois en milieu liquide et en milieu solide gélosé. Ce dernier permet en particulier de simuler l'effet anti-bactérien de la nisine dans un aliment solide, où son activité inhibitrice est fonction du phénomène de diffusion moléculaire.

### **II.1 Activité anti-bactérienne en milieu liquide**

L'activité anti-bactérienne de la nisine a été testée en milieu liquide, en Erlenmeyer, sur des bactéries en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Des concentrations de 100 à 1000 UI.ml<sup>-1</sup> pour *L. innocua* et *S. aureus* et de 10 à 1000 UI.ml<sup>-1</sup> pour *L. monocytogenes* ont été testées et les résultats sont présentés dans les Figure 31 et Figure 32.

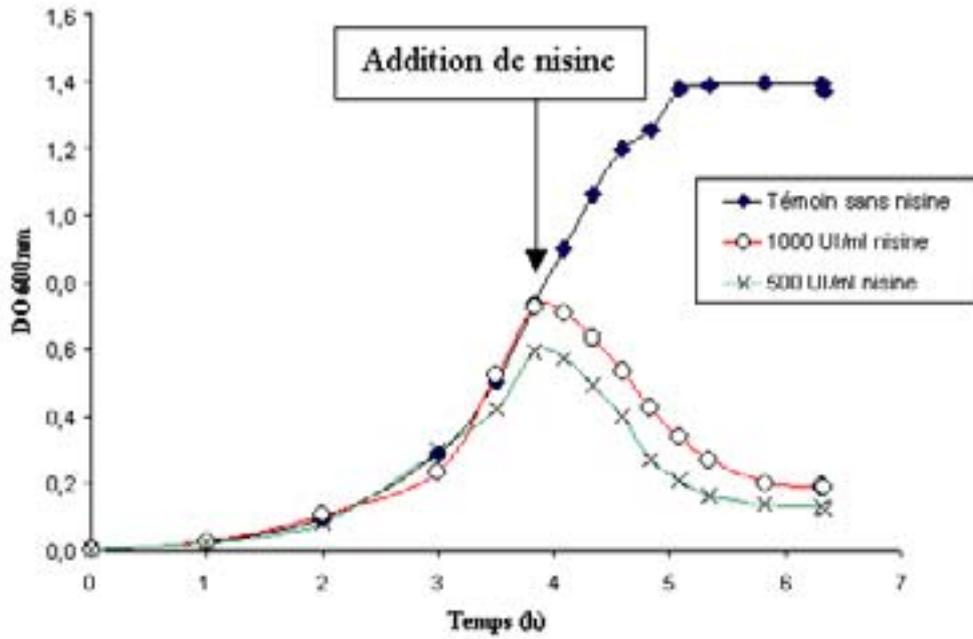


Figure 31 : Exemple d'inhibition de *L. innocua* en phase exponentielle de croissance par addition de nisine à 500 et 1000 UI.ml<sup>-1</sup>, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

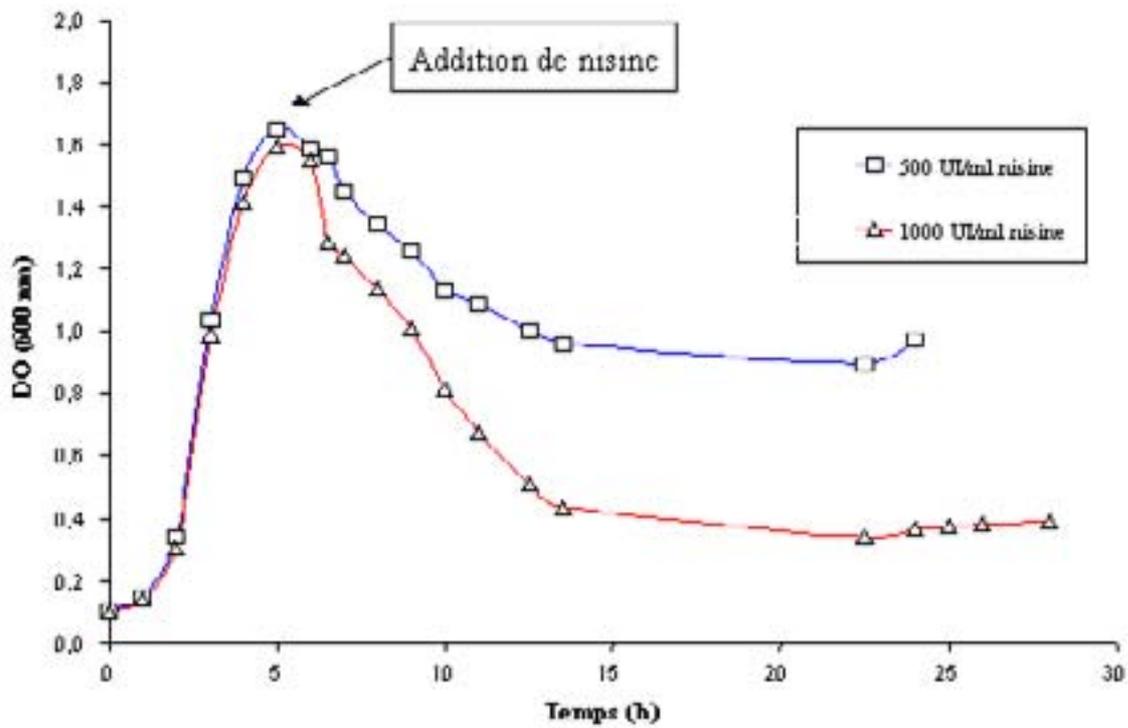


Figure 32 : Exemple d'inhibition de *L. innocua* en phase stationnaire de croissance par addition de nisine à 500 et 1000 UI.ml<sup>-1</sup>, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

L'activité inhibitrice induite après addition de nisine est représentée par une chute d'absorbance (600nm) en fonction du temps, correspondant à une lyse bactérienne. On sait que le mécanisme d'action de la nisine s'effectue en deux étapes. Il implique la création d'interactions électrostatiques entre la nisine et la surface bactérienne grâce à la charge nette positive du peptide et aux phospholipides membranaires chargés négativement de la cellule cible (Abee, 1995 ; Martin *et al.*, 1996). Les bactériocines s'insèrent ensuite dans la membrane cellulaire lipidique grâce à leur partie hydrophobe et y forment des agrégats débouchant sur la perméabilisation de la membrane par formation de pores transmembranaires et lyse de la bactérie. Le Tableau 18 reprend l'ensemble des résultats obtenus sur les trois bactéries : *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*. La sensibilité des différentes bactéries à la nisine est comparée par le calcul de deux paramètres :

- ✓ Temps d'inhibition (h) : temps total pendant lequel la nisine lyse et/ou empêche toute reprise de la croissance.
- ✓ Vitesse de lyse (DO.h<sup>-1</sup>) : variation de l'absorbance (600 nm) en fonction du temps

Concentration en nisine (UI.ml <sup>-1</sup> )			1000	500	250	100	25	10
<i>L. innocua</i>	Phase exponentielle	Temps d'inhibition (h)	>3	3,0 ± 0,4	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,2	-	-
		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0	-	-
	Phase stationnaire	Temps d'inhibition (h)	16,5 ± 0,9	7,5 ± 0,4	-	-	-	-
		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,02	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	Phase exponentielle	Temps d'inhibition (h)	>6	4,2 ± 0,3	2,7 ± 0,2	0	-	-
		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	0,42 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,49 ± 0,11	0	-	-
	Phase stationnaire	Temps d'inhibition (h)	2,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	-	-	-	-
		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	0,59 ± 0,35	0	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	Phase exponentielle	Temps d'inhibition (h)	>72	>48	>24	>24	>3,5	0
		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0

**Tableau 18 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Les résultats, obtenus sur TB en Erlenmeyer, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation, sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).**

Les résultats du Tableau 18 montrent qu'en terme d'activité anti-bactérienne globale, *L. monocytogenes* semble être plus sensible à la nisine. La nisine, à large spectre d'activité, présente en effet des différences d'inhibition, liées à la nature de la bactérie, à son état physiologique, ou encore aux conditions de culture (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

La comparaison de l'activité anti-bactérienne de la nisine en fonction de la phase de croissance testée a tendance à montrer des souches plus sensibles à la nisine en phase exponentielle de croissance. Ce résultat est en accord avec les travaux de Jager *et al.* (1992) montrant que la bactériocine pédiocine PC est plus active sur les cellules de *L. monocytogenes* V37CE en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance. Ces auteurs mentionnent que cette différence dépend de l'état physiologique des bactéries. En effet, en phase stationnaire de croissance, dans un milieu de plus en plus carencé en nutriments, les bactéries s'adaptent aux conditions de croissance défavorables par des modifications de la composition de la membrane bactérienne, la rendant plus rigide, ce qui peut expliquer une plus grande résistance des souches à la nisine (Jager et Harlander, 1992). De même, Tagg (1992) a observé des comportements similaires et une plus grande sensibilité aux bactériocines en phase exponentielle de croissance. A l'inverse, Schved *et al.* (1993) montrent que l'ajout de la pédiocine SJ-1 entraîne une réduction de 3,7 log pour des cellules de *Lb plantarum* en phase stationnaire de croissance par rapport à une chute de seulement 2 log en phase exponentielle.

D'autre part, en technique liquide en Erlenmeyer, le rapport concentration en nisine sur charge bactérienne est plus faible en phase stationnaire de croissance, avec une charge microbienne plus élevée. Pour s'assurer que la différence entre les effets anti-bactériens, au niveau des phases exponentielle et stationnaire de croissance, n'est en fait due qu'à la sensibilité des bactéries à la nisine, et non à une différence de charge bactérienne, l'inhibition en milieu liquide en tube a alors été mise en œuvre en fixant quelle que soit la phase de croissance l'absorbance (600 nm) initiale à 0,6 au moment de l'ajout de la nisine. Les résultats sont donnés dans le Tableau 19 pour une concentration maximale de 1000 UI.ml<sup>-1</sup> en nisine.

		Vitesse de lyse (DO.h <sup>-1</sup> )	Temps d'inhibition (h)
<i>L. innocua</i>	Phase exponentielle	0,26±0,05	2,3
	Phase stationnaire	0,14±0,05	>4
<i>S. aureus</i>	Phase exponentielle	0,17±0,01	3,3
	Phase stationnaire	0,06±0,00	>3
<i>L. monocytogenes</i>	Phase exponentielle	0,21 ± 0,05	>24
	Phase stationnaire	0,09 ± 0,01	>24

**Tableau 19 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* en phases exponentielle et stationnaire de croissance. Les résultats, obtenus en milieu TB en tube, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation, sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).**

Les données du Tableau 19 des inhibitions en tube confirment bien les résultats obtenus en Erlenmeyer. L'activité anti-bactérienne de la nisine est plus forte en phase exponentielle de croissance. La plus grande sensibilité en phase exponentielle est intéressante en alimentaire, surtout lorsqu'on sait que la contamination initiale en *L. monocytogenes* est faible, et que c'est essentiellement le problème de développement bactérien au sein de cet aliment (bactérie essentiellement en phase exponentielle de croissance) qui constitue donc un danger pour le consommateur.

La sensibilité à la nisine suit l'ordre croissant suivant : *L. monocytogenes* > *L. innocua* > *S. aureus*.

De plus, quelle que soit la bactérie cible, les temps d'inhibition ainsi que les vitesses de lyse augmentent avec la concentration en nisine. A 25 UI.ml<sup>-1</sup> par exemple pour *L. monocytogenes*, la nisine induit en phase exponentielle un temps d'inhibition de 3,5 h, comparé à 3 j d'inhibition observés à 1000 UI.ml<sup>-1</sup>. De même, à 250 UI.ml<sup>-1</sup>, 0,20 DO.h<sup>-1</sup> de vitesse de lyse est notée pour *L. innocua* en phase exponentielle par rapport à 0,31 DO.h<sup>-1</sup> à 1000 UI.ml<sup>-1</sup> en nisine.

Enfin, en milieu liquide, l'ensemble des résultats montre que la nisine est active à des concentrations minimales inhibitrices supérieures à 100 UI.ml<sup>-1</sup> pour *L. innocua* et *L. monocytogenes* et à 250 UI.ml<sup>-1</sup> pour *S. aureus*.

## II.2 Activité anti-bactérienne en milieu solide

L'activité anti-bactérienne de la nisine a été évaluée sur milieux solides par la technique en puits. Cette méthode complète la précédente en prenant en compte l'effet de diffusion de la nisine en milieu gélosé, phénomène important pour l'inhibition bactérienne au sein du produit alimentaire. Les résultats sont donnés dans le Tableau 20.

Concentration en nisine (UI.ml <sup>-1</sup> )	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>
50	6±1	0	0	0
100	10±1	0	0	0
500	12±1	3±1	4±1	0
1000	14±1	6±1	6±1	4±1
5000	16±1	-	10±1	8±1

**Tableau 20 : Activité anti-bactérienne de la nisine sur *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* et de *M. luteus*. Les résultats, obtenus en milieu TB solide, correspondent à des diamètres de zone d'inhibition (mm) et sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).**

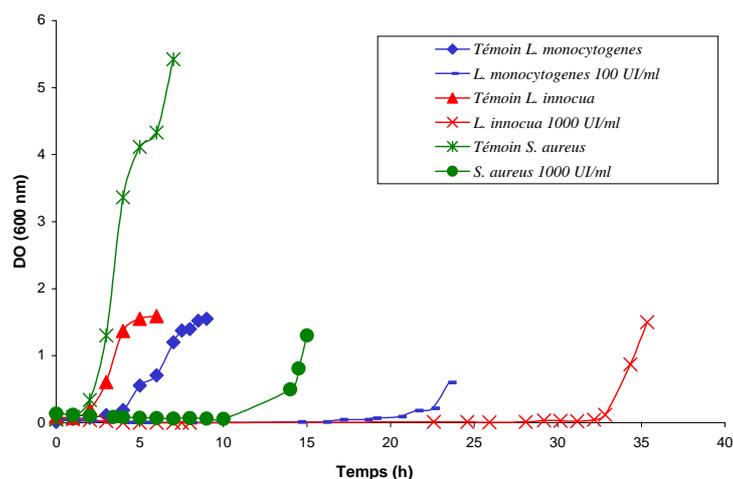
Dans nos conditions, *S. aureus* est insensible à la nisine à des concentrations inférieures à 1000 UI.ml<sup>-1</sup>. Les *Listeria* sont sensibles à la nisine à partir de 500 UI.ml<sup>-1</sup>. Les CMI ainsi obtenues en milieu solide sont supérieures à celles obtenues en milieu liquide. Cette augmentation de la CMI serait due peut-être à la diffusivité plus faible de la nisine en milieu gélosé. Les travaux de Blom *et al.* (1997) montrent que l'augmentation des teneurs en matière sèche et en matière grasse réduit la diffusion des bactériocines en milieu gélosé, ce qui diminue l'activité anti-bactérienne.

Afin de disposer dans la suite des travaux d'une bactérie hautement sensible à la nisine, l'activité anti-microbienne de la nisine sur *M. luteus* a été vérifiée (Tableau 20). Les résultats du Tableau 20 confirment que *M. luteus* est beaucoup plus sensible à la nisine que les trois autres souches avec une CMI inférieure à 50 UI.ml<sup>-1</sup>. (Delves-Broughton *et al.*, 1996)

En conclusion, à partir des différentes CMI déterminées sur les trois bactéries, en milieux liquides et solides, et en phases exponentielle et stationnaire de croissance, il apparaît que les bactéries sont sensibles à la nisine dès 100 UI.ml<sup>-1</sup> en milieu liquide et à partir de 500 UI.ml<sup>-1</sup> en milieu solide. 1000UI.ml<sup>-1</sup> a été choisie arbitrairement pour avoir des activités anti-bactériennes significatives. Ce choix est d'autant plus judicieux que l'on attend des phénomènes de rétention de la nisine dans les films qui pourraient diminuer sa désorption et par la même diminuer son pouvoir anti-bactérien.

### II.3 Effet de la nisine à 100 ou 1000 UI.ml<sup>-1</sup> sur les bactéries en phase de latence

En industrie agroalimentaire, l'utilisation de la nisine constitue un moyen de prévention des contaminations des produits alimentaires après fabrication, et n'est en aucun cas un moyen de décontamination. Les techniques de décontamination classiques comme la température doivent donc assurer l'élimination des bactéries altérantes ou pathogènes, et l'ajout de nisine vient seulement garantir une qualité sanitaire du produit jusqu'à sa date limite de consommation. C'est surtout ce paramètre que l'on mesure par l'effet de la nisine en phase de latence, où la bactériocine est ajoutée à t = 0. Le temps d'inhibition pendant lequel le pouvoir anti-bactérien de la nisine empêche les bactéries cibles de se développer est alors déterminé. Les CMI de 1000 UI.ml<sup>-1</sup> pour *L. innocua* et *S. aureus* et de 100 et 1000 UI.ml<sup>-1</sup> pour *L. monocytogenes* sont données dans la Figure 33.



**Figure 33 : Inhibition de *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* en phase de latence, par addition à t = 0 de nisine aux concentrations égales à 100 ou 1000 UI.ml<sup>-1</sup>. L'inhibition est mesurée en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.**

Aux concentrations testées, les temps de latence après addition de nisine sont augmentés d'un facteur 5 et 9 pour *S. aureus* et *L. innocua* respectivement (Figure 33). La nisine a une concentration de 100 UI.ml<sup>-1</sup> augmente d'un facteur 5 le temps de latence pour *L. monocytogenes*. A 1000 UI.ml<sup>-1</sup>, la phase de latence de *L. monocytogenes* est retardée de plus de 2 à 3 j, sans mettre en évidence une reprise franche de la croissance (résultats non montrés). En fait, la phase de latence est une période d'adaptation aux nouvelles conditions de culture (milieu, T °C, agitation), que la présence de la nisine rend très défavorables.

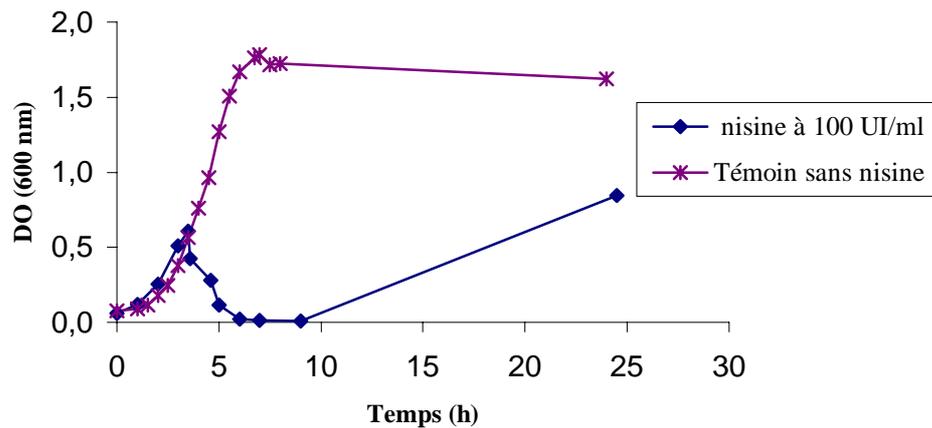
En conclusion, même en se plaçant aux conditions optimales de milieu et de température, le fait d'ajouter la nisine rend difficile la croissance bactérienne. Si l'on rajoute à cela les difficultés rencontrées par les bactéries pendant la conservation des aliments (T°C basse, a<sub>w</sub> faible, pH acide, pression partielle en oxygène basse, *etc.*), le potentiel d'action de la nisine est d'autant plus grand pour inhiber la prolifération des bactéries pathogènes au sein de l'aliment.

### III Développement de bactéries résistantes à la nisine

En milieu liquide, et quelle que soit la bactérie testée, l'ajout de nisine a induit une phase de lyse représentée par une chute de l'absorbance (600 nm). Cette phase bactériolytique s'amointrit progressivement pour tendre vers un plateau. Au bout d'un temps d'inhibition variable, qui augmente avec la concentration en nisine, une nouvelle phase de croissance apparaît pour tendre vers les absorbances (600nm) maximales spécifiques à chaque bactérie. Connaissant les phénomènes de résistance vis à vis des substances anti-bactériennes de type antibiotique ou plus spécifiquement bactériocines (Harris *et al.*, 1991 ; Bouttefroy et Millière, 2000), ce chapitre met tout d'abord en évidence le caractère de résistance des bactéries et tente par une association de bactériocines de lutter contre ce phénomène.

#### III.1 Mise en évidence et étude de la résistance bactérienne

La Figure 34 met en évidence le phénomène de reprise de la croissance après action de la nisine.

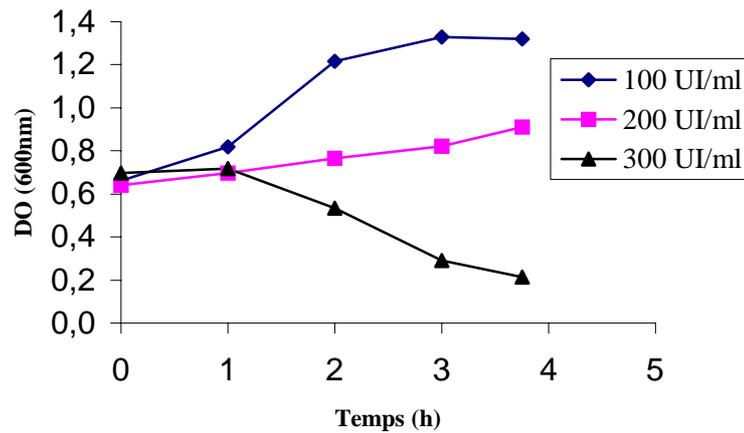


**Figure 34 : Inhibition de *L. monocytogenes* après addition de 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine à DO<sub>600nm</sub> = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.**

Cette reprise de la croissance a été observée par plusieurs auteurs. En effet, Harris *et al.* (1991) ont obtenu une reprise de la croissance après une diminution de 6 à 7 log de la population de *L. monocytogenes* ATCC 19115 après addition de 10 µg.ml<sup>-1</sup> de nisine. La sensibilité des résistants, faible vis à vis de la nisine, a pu être améliorée par addition de sel à 2 % ou par réduction de pH. De même, Davies *et al.* (1997) ont rapporté un effet de lyse transitoire de *L. monocytogenes* après ajout de nisine, suivie dans la plupart des cas d'une reprise de la croissance.

Cette reprise de la croissance peut être due à des concentrations trop faibles en nisine pour inhiber toutes les bactéries, ou être due à des caractéristiques physico-chimiques du milieu qui peuvent altérer ou diminuer l'action des bactériocines : une alcalinisation du milieu peut diminuer l'action des bactériocines par formation de dimères (Liu et Hansen, 1990) ou encore due à l'émergence de bactéries devenues résistantes à la nisine.

Ainsi, après reprise de la croissance, les souches de *L. monocytogenes* ont été récupérées par centrifugation, lavées à deux reprises en tampon phosphate pH 6,1 et soumises à nouveau à la nisine à 100, 200 et 300 UI.ml<sup>-1</sup>. Les résultats sont donnés dans la Figure 35.



**Figure 35 : Action de 100, 200 et 300 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine sur des cultures de *L. monocytogenes* récupérées après une première action de 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine et après reprise de la croissance. L'absorbance (600 nm) a été fixée à 0,6 avant addition de la nisine, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.**

Tout d'abord, les bactéries récupérées sont insensibles à 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine.

De plus, lors de la première centrifugation, la nisine dans le surnageant a été testée en puits sur *M. luteus*. Les diamètres d'inhibition du surnageant, égaux à ceux d'une solution de nisine fraîche à une concentration de 100 UI.ml<sup>-1</sup>, prouvent que la reprise de la croissance n'est pas due à une dénaturation peptidique ou à une diminution de l'activité anti-bactérienne de la nisine dans le milieu de culture, mais bien à un développement de bactéries devenues insensibles à la nisine.

En revanche, en augmentant la concentration en nisine, un effet bactériostatique sur *L. monocytogenes* a été obtenu à 200 UI.ml<sup>-1</sup> et un effet bactériolytique à 300 UI.ml<sup>-1</sup>.

Ainsi, *L. monocytogenes* a bien développé une résistance à 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine. Ce phénomène de résistance a fait l'objet de plusieurs études, mais reste aujourd'hui un phénomène très complexe et difficilement explicable. Harris *et al.* (1991) ont montré que des cellules de *L. monocytogenes*, récupérées après une première action de la nisine, y deviennent plus résistantes lors des inhibitions suivantes. Rekhif *et al.* (1994) ont pu sélectionner des résistants de *L. monocytogenes* à diverses bactériocines (plantaricine, curvaticine, mésentéricine, carnocine) : ni l'inactivation des bactériocines par action d'enzymes extracellulaires, ni l'adsorption des celles-ci sur la surface des cellules cibles n'étaient à l'origine de la résistance. Des cellules insensibles ou moins sensibles aux bactériocines ont bien été obtenues. Cette résistance serait due à une modification des récepteurs au niveau de la membrane (Rekhif *et al.*, 1994).

Mazzotta *et al.* (1997) ont sélectionné des résistants de *L. monocytogenes* à la nisine, et ont observé une modification spécifique de la composition en acides gras de la membrane des cellules cibles après action de la nisine. Une modification du ratio  $C_{15:0}/C_{17:0}$  et une augmentation du pourcentage en  $C_{16:0}$  et en  $C_{18:0}$  sous l'action de la nisine sont observées. La membrane devient plus rigide avec des acides gras saturés à longue chaîne, d'où une meilleure résistance aux bactériocines par une diminution de la fluidité membranaires (Mazzotta et Montville, 1997).

Dans tous ces travaux, l'émergence des résistants a toujours été transitoire. L'obtention de cellules de *L. monocytogenes* résistantes et stables dans le temps a alors été étudiée dans la suite de nos travaux de deux manières.

D'une part, après la phase de lyse bactérienne suivie de la reprise de la croissance, les bactéries sont récupérées par centrifugation, lavées et une pré-culture de 18 h est alors effectuée en milieu TB (37 °C, 140 rpm). Une culture à 5 % (v/v) est ensuite mise à incuber et dès que l'absorbance (600 nm) atteint 0,6, 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine sont ajoutés. Une phase de lyse plus faible et une reprise de la croissance sont à nouveau observées. Ce protocole de centrifugation et de préculture est alors mis en oeuvre à nouveau et a été répété plusieurs fois jusqu'à disparition de la phase de lyse. Les résultats sont donnés dans la Figure 36.

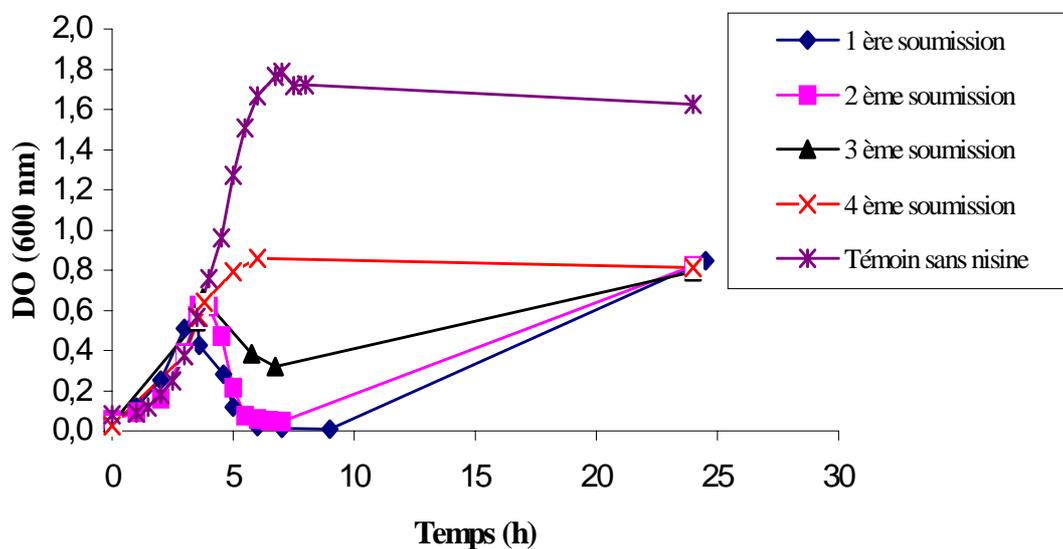


Figure 36 : Action de 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine sur des *L. monocytogenes* récupérées après une première soumission à la même concentration en nisine. Une pré-culture préalable est réalisée avant de tester à nouveau la nisine à 100 UI.ml<sup>-1</sup> additionnée à DO<sub>600nm</sub> = 0,6. Les tests sont réalisés en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

La Figure 36 montre que la première soumission des bactéries à la nisine entraîne une lyse bactérienne. Cette lyse est suivie d'une reprise de la croissance. Après une pré-culture de 18 h réalisée avec les *L. monocytogenes* résistantes, la deuxième soumission à la même concentration en nisine montre une phase de lyse moindre, suivie d'une émergence plus rapide de cellules résistantes. De soumission en soumission, la phase de lyse s'amointrit pour parvenir au terme de la quatrième soumission à la sélection de cellules qui ont perdu toute sensibilité à la nisine.

D'une autre manière, une méthode similaire de sélection des résistants a été mise en œuvre, en éliminant la phase de pré-culture intermédiaire entre deux soumissions successives (résultats non montrés). Après la première soumission et dès reprise de la croissance, les bactéries sont récupérées par centrifugation, lavées et suspendues aussitôt dans un tube de milieu TB stérile. L'absorbance (600 nm) est fixée à 0,6 avant addition de nisine. Les courbes d'inhibition similaires à celles de la Figure 36 montrent une perte de la sensibilité à la nisine dès la deuxième soumission de *L. monocytogenes* à 100 UI.ml<sup>-1</sup>.

Dans les deux cas, les soumissions successives à la nisine sélectionnent progressivement des résistants au détriment d'une lyse des bactéries sensibles. La sélection est plus rapide sans pré-culture, car en l'absence de cette phase d'incubation, les bactéries sensibles à la nisine n'ont pas le temps de se développer et seules les bactéries résistantes colonisent et envahissent le milieu de culture, pour atteindre au bout de quelques soumissions à la nisine une sélection des bactéries résistantes (Mazzotta et Montville, 1997 ; Harris *et al.*, 1991 ; Ming et Deaschel, 1993).

### III.2 Production de curvaticine et de pédiocine et détermination des CMI sur *L. monocytogenes*

Pour lutter contre ce phénomène de résistance, l'association de bactériocines a été mise en œuvre. Selon Bouttefroy et Millière (2000), l'association de nisine-curvaticine améliore l'effet anti-*Listeria* et diminue le phénomène de résistance. De plus, comparée à l'action de la nisine seule ou de la pédiocine seule, une combinaison nisine-pédiocine a montré une amélioration significative de l'activité anti-bactérienne sur plusieurs bactéries Gram (+) comme *Enterococcus faecalis* et *L. monocytogenes* et avec une diminution du phénomène de reprise de la croissance (Hanlin *et al.*, 1993).

Deux bactériocines appartenant à la classe IIa anti-*Listeria* : curvaticine et pédiocine ont été utilisées. Leurs effets anti-*Listeria* seules et en association avec la nisine ont été mentionnés dans différentes études (Rasch et Knochel, 1998 ; Garver et Muriana, 1994 ; Sudirman et *al.*, 1993, Bouttefroy et Millière, 2000).

La production des bactériocines par *B. coagulans* et *Lb. curvatus* respectivement pour la pédiocine et la curvaticine ainsi que la détermination de leurs concentrations sont données dans le Tableau 21.

	Concentration dans le surnageant (UA.ml <sup>-1</sup> )	Concentration en curvaticine après extraction au chloroforme (UA.ml <sup>-1</sup> )
Curvaticine	114-228	14628
Pédiocine	114-228	14628-29257

**Tableau 21 : Concentrations en pédiocine et en curvaticine (UA.ml<sup>-1</sup>) déterminées sur *L. monocytogenes* par la technique en puits, en milieu TB agar, à 30 °C et au bout de 24 à 48 h d'incubation.**

Pour les deux bactériocines, les concentrations dans le surnageant sont comprises entre 114 et 228 UA.ml<sup>-1</sup>. Ces concentrations étant trop faibles pour déterminer tester une gamme large en concentrationles CMI, une méthode d'extraction au chloroforme basée sur les travaux de Burianek et Yousef (2000) a alors été adaptée au laboratoire et la concentration en bactériocines a été augmentée d'un facteur 64 à 128 (Tableau 21).

Des gammes de 25 à 1000 ou 100 à 1000 UA.ml<sup>-1</sup> respectivement en curvaticine ou en pédiocine sont testées sur *L. monocytogenes* non résistante afin de déterminer les CMI. Les données sont présentées dans les Figure 37 et Figure 38.

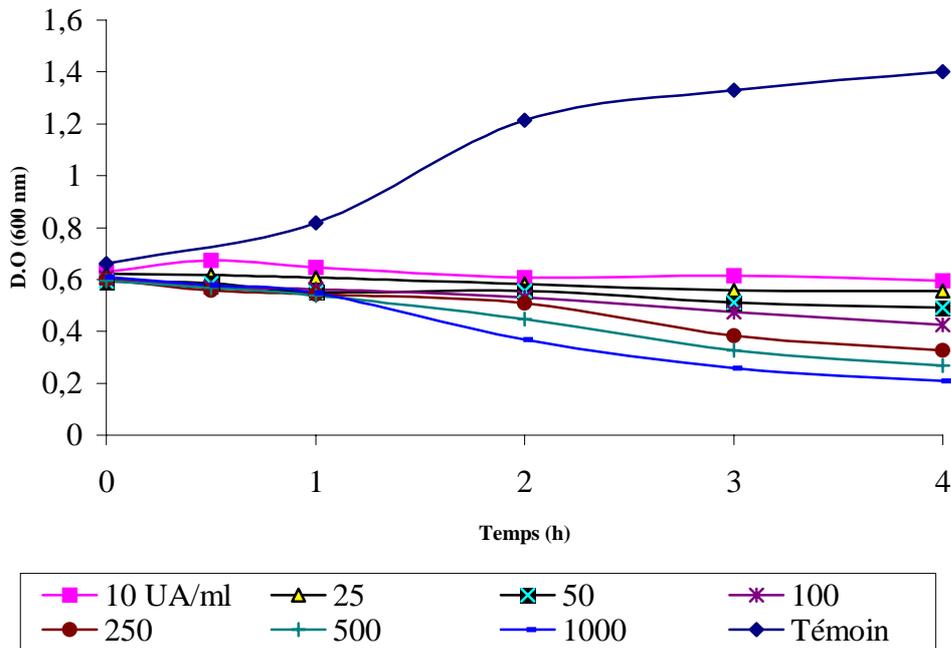


Figure 37 : Activité anti-bactérienne de la curvaticine pour des concentrations comprises entre 25 et 1000 UA.ml<sup>-1</sup> sur *L. monocytogenes*, à DO<sub>600nm</sub> initiale = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

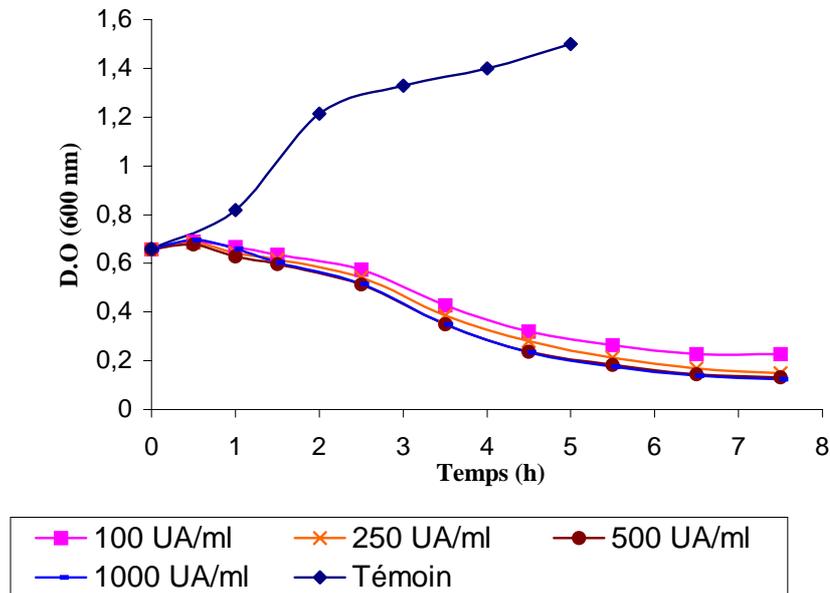


Figure 38 : Activité anti-bactérienne de la pédiocine pour des concentrations comprises entre 100 et 1000 UA.ml<sup>-1</sup> sur *L. monocytogenes*, à DO<sub>600nm</sub> initiale = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

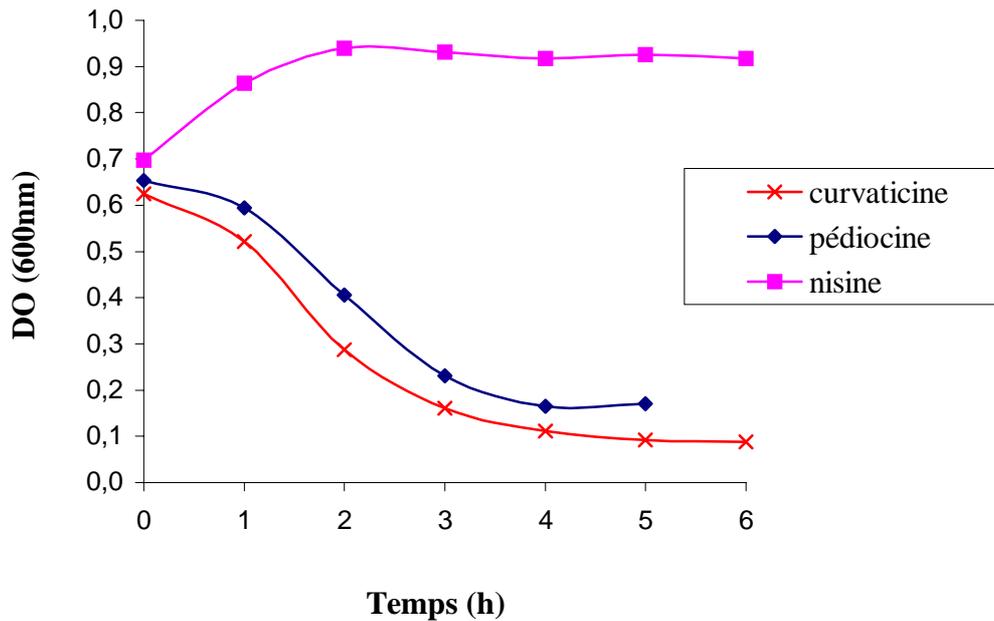
Quelle que soit la concentration, la pédiocine comme la curvaticine sont actives sur *L. monocytogenes*. L'activité anti-bactérienne est dépendante de la concentration en bactériocine : plus la concentration augmente, plus la phase de lyse est importante. Pour des

concentrations inférieures à  $100 \text{ UA.ml}^{-1}$ , la lyse est trop faible pour avoir un effet réellement significatif. Aux concentrations supérieures ou égales à  $250 \text{ UA.ml}^{-1}$ , les phases de lyse sont quasiment identiques.

Pour pouvoir estimer l'activité anti-bactérienne en terme de réduction du nombre de microorganismes dans la culture bactérienne, des dénombrements sur boîte de Petri des cultures avant et après ajout de bactériocines ont été mis en œuvre et sont exprimés en chute du nombre de log. A  $250 \text{ UA.ml}^{-1}$ , des chutes de 2,2 et 2,3 log sont respectivement obtenues avec la pédiocine et la curvaticine. Ces chutes de log sont équivalentes à la diminution de 3,2 log observée pour *L. monocytogenes* soumise à la nisine à la CMI de  $100 \text{ UI.ml}^{-1}$ . Ces résultats sont en accord avec la littérature. L'addition de  $160 \text{ UA.ml}^{-1}$  en curvaticine induit une chute de 1 log de *L. monocytogenes* (Bouttefroy et Millière, 2000). L'addition de  $128 \text{ UA.ml}^{-1}$  en pédiocine induit une chute de 2 log de *L. monocytogenes* (Schved *et al.*, 1993).

### III.3 Activité anti-bactérienne de la pédiocine et de la curvaticine sur des bactéries *L. monocytogenes* résistantes à la nisine

Après avoir sélectionné des bactéries *L. monocytogenes* résistantes à la nisine, leur sensibilité à la pédiocine et la curvaticine a été testée de manière à vérifier si l'on pouvait lutter contre le phénomène de résistance. Les courbes d'inhibition après action de la pédiocine ou de la curvaticine sur *L. monocytogenes* résistantes à la nisine sont données dans la Figure 39.



**Figure 39 :** Activité anti-bactérienne de la pédiocine ou de la curvaticine aux CMI de 250 UA.ml<sup>-1</sup> sur des bactéries de *L. monocytogenes* résistantes à 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine. Les résultats sont calculés après addition des bactériocines à DO<sub>600nm</sub> = 0,6, en milieu TB, à 37 °C et sous 140 rpm d'agitation.

L'inhibition observée dans la Figure 39 montre que les résistants à 100 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine sont sensibles à la pédiocine et à la curvaticine. Les phases de lyse sont équivalentes à celles observées sur des souches fraîches de *L. monocytogenes*. L'inhibition serait même plus forte avec une chute d'environ 3 log comparée à 2 log obtenue précédemment.

La curvaticine semble avoir une meilleure activité anti-bactérienne. Les résistants à la nisine ne semblent pas être résistants aux deux autres bactériocines. En accord avec Rekhif *et al.* (1994), les bactéries résistantes à la nisine sont sensibles à la mésentéroïcine, à la curvaticine ou à la plantaricine. De même, Rasch et Knochel (1998) ont étudié la sensibilité de résistants de *L. monocytogenes* à la nisine sans toutefois mettre en évidence une résistance à la bavaricine (bactériocine de *Lb. bavaricus*) ou à la pédiocine. Bouttefroy et Millière (2000) n'ont eux non plus pas mis en évidence une résistance à la curvaticine ou la pédiocine chez des résistants à la nisine.

Ces résultats indiqueraient donc que le mécanisme de résistance de *L. monocytogenes* à la nisine serait différent de celui développé contre la pédiocine ou la curvaticine.

Ce résultat est très intéressant en alimentaire, où l'association de la nisine avec une deuxième bactériocine anti-*Listeria* telle que la pédiocine ou la curvaticine permettrait de lutter contre l'apparition de cellules résistantes.

#### IV Association nisine-curvaticine ou nisine-pédiocine et effet synergique

Le chapitre précédent montre l'absence de résistance croisée entre nisine-curvaticine et nisine-pédiocine. Un effet synergique éventuel a alors été recherché. L'effet de 2 bactériocines sur les phases de latence de *L. monocytogenes* est présenté dans la Figure 40.

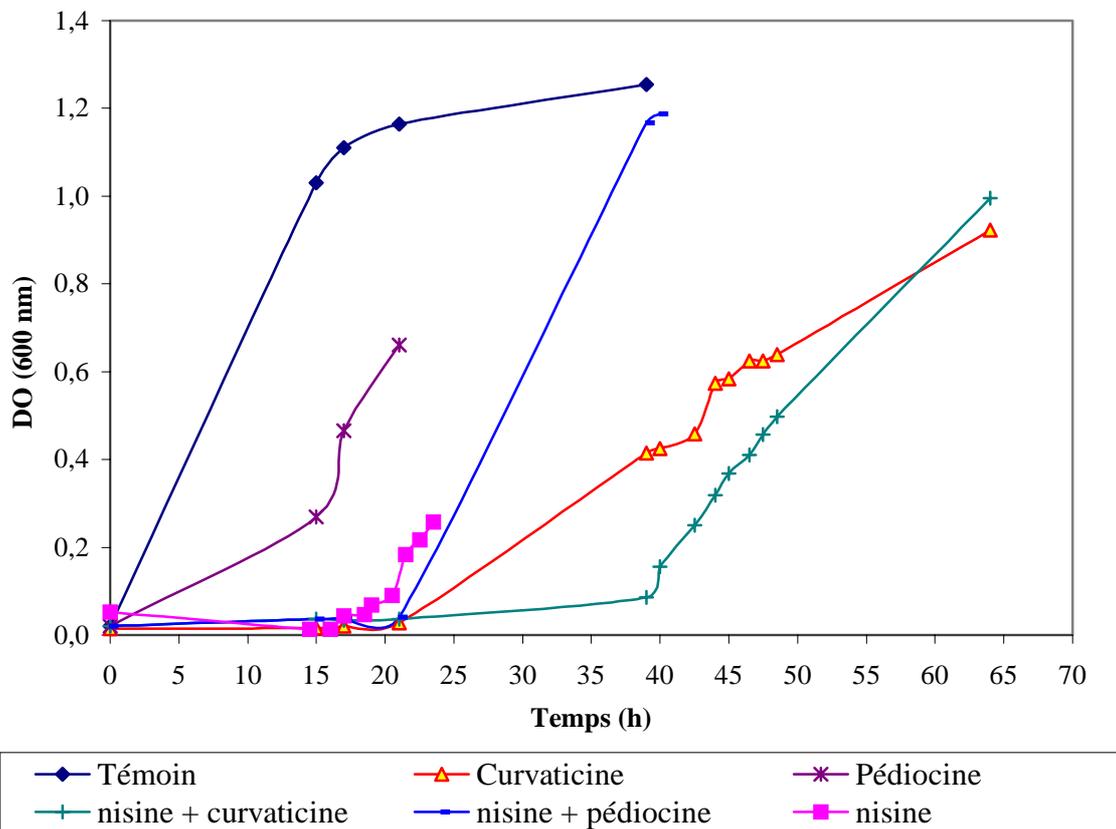


Figure 40 : Inhibition de *L. monocytogenes* en phase de latence, par addition à  $t = 0$  des bactériocines seules ou en association nisine-curvaticine ou nisine-pédiocine aux concentrations suivantes : nisine ( $100 \text{ UI.ml}^{-1}$ ), pédiocine et curvaticine ( $250 \text{ UA.ml}^{-1}$ ). Les inhibitions sont réalisées en milieu TB, à  $37^\circ\text{C}$  et sous  $140 \text{ rpm}$  d'agitation.

Aux concentrations testées, les temps de latence après addition de bactériocines sont augmentés d'un facteur 4, 5 et 10 respectivement pour la pédiocine, la nisine, et pour la curvaticine. L'association des bactériocines permet quant à elle d'améliorer les temps d'inhibition d'un facteur 6 et 13 pour respectivement la nisine-pédiocine et la nisine-curvaticine.

La curvaticine apparaît être la plus efficace en terme d'amélioration des temps d'inhibition, avec un retard de l'ordre de 2 jours de la croissance bactérienne, lorsque la curvaticine est associée à la nisine.

En accord avec plusieurs études bibliographiques, l'association de bactériocines a toujours montré un effet de synergie qui améliore l'activité anti-bactérienne des bactériocines sur *L. monocytogenes* (Hanlin *et al.*, 1993, Katla *et al.*, 2001 ; Rasch et Knochel, 1998 ; Garver et Muriana, 1994 ; Sudirman *et al.*, 1993 et Bouttefroy et Millière, 2000).

## V Conclusion

Cette première partie du travail a permis de montrer l'efficacité de la nisine, ainsi que de la pédiocine et de la curvaticine, pour lutter contre *L. monocytogenes*.

Une concentration égale à 1000 UI.ml<sup>-1</sup> a été choisie volontairement pour *L. innocua*, *S. aureus*, et *L. monocytogenes*, car à cette concentration, une activité anti-bactérienne satisfaisante était obtenue. L'utilisation de la nisine a certes montré de grande potentialité, mais au bout d'un temps d'incubation long, des bactéries résistantes se sont développées. L'association surtout de la nisine à la curvaticine a permis de limiter ce phénomène de résistance, qui est d'autant plus intéressant que l'absence de résistance croisée n'a pas été mise en évidence.

Dans la suite des travaux, les films anti-bactériens à base de nisine vont être élaborés. Leur potentialité à inhiber les bactéries pathogènes sera ensuite déterminée. Les films comestibles et anti-bactériens sont été uniquement réalisés avec la nisine, car jusqu'à présent, seule la nisine est autorisée comme additif alimentaire (E234).

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **partie 2**

Dans un souci d'élaborer des films comestibles, l'HPMC a été utilisé en tant que matrice polymérique, du fait de ses bonnes propriétés filmogènes et de son homologation en tant qu'additif alimentaire (E464). Cependant, il est connu que l'hygroscopie des bioemballages à base de dérivés cellulosiques est responsable de leur faible barrière à la vapeur d'eau et a donc peu d'influence sur les phénomènes de déshydratation ou de réhydratation des produits alimentaires, point crucial pour garantir leurs qualités organoleptiques et microbiologiques. Par ailleurs, les films comestibles sont fréquemment utilisés en tant que simple barrière aux transferts de vapeur d'eau entre un aliment et le milieu environnant, et aux transferts d'eau liquide entre deux compartiments d'un même aliment hétérogène. Pour diminuer cette sensibilité à l'eau, des composés hydrophobes (cire, acides gras, huiles essentielles) peuvent être appliqués soit par enduction sur un film de dérivés cellulosiques (Debeaufort *et al.*, 2000) soit par incorporation directe dans la solution filmogène avant formation du film (Cagri *et al.*, 2001 ; García *et al.*, 2000). L'utilisation de lipides augmente le caractère hydrophobe des films et améliore par conséquent leur propriété barrière à la vapeur d'eau.

En parallèle, afin de réduire le caractère hydrophile de la matrice, une autre voie basée sur la modification chimique des éthers de cellulose a été envisagée : la réticulation de l'HPMC a ainsi été conduite par utilisation d'un acide polycarboxylique, en tant qu'agent réticulant. De plus, malgré l'introduction de lipides dans les films composites, l'hydrosolubilité de ces matériaux pouvait poser un problème dans un certain nombre d'applications. La réticulation de la matrice, en mettant en place des liaisons covalentes inter-chaînes, pouvait permettre de réduire la solubilité des films dans l'eau.

Deux types de matériaux ont été ainsi élaborés : les films dits composites associant phase hydrophobe et phase hydrophile, et les films réticulés, à base d'acide citrique en tant qu'agent de réticulation.

# I Etude et amélioration des propriétés barrière à la vapeur d'eau des films composites émulsionnés ou réticulés

## I.1 Films composites émulsionnés

Du fait du caractère hydrophile de la macromolécule d'HPMC, riche en groupements hydroxyles libres, pouvant interagir avec les molécules d'eau, l'influence de l'incorporation de différents composés hydrophobes sur le coefficients de transfert à la vapeur d'eau (CTVE) a été évaluée. Les effets sur le transfert de vapeur d'eau de la nature (acides oléique, acide stéarique, stéarate de méthyle et palmitate de méthyle) et de la teneur (entre 0 et 40 % (p/p HPMC)) en composés hydrophobes ont été préalablement déterminées à 23 °C à une différence d'HR de 0-50 %. Ces conditions expérimentales, plus proches des applications courantes en agroalimentaire, permettent de simuler le comportement du film dans des conditions rencontrées couramment en conservation des aliments. Les CTVE sont données dans le Tableau 22.

Composés hydrophobes (% p/p HPMC)	Acide stéarique	Acide oléique	Palmitate de méthyle	Stéarate de méthyle
0	269 ± 30	269 ± 30	269 ± 30	269 ± 30
5	196 ± 4	-	-	-
10	161 ± 4	-	-	-
15	133 ± 4	323 ± 37	-	262 ± 26
30	108 ± 2	400 ± 41	346 ± 22	387 ± 6
40	-	393 ± 30	312 ± 30	338 ± 2

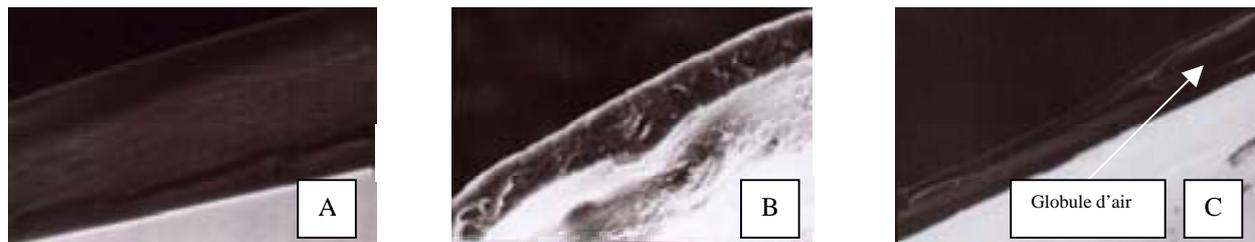
**Tableau 22 : CTVE (g eau .m<sup>-2</sup>. j<sup>-1</sup>.atm<sup>-1</sup>) mesurés pour des films de 50 cm<sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 0-50 % d'HR et 23 °C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).**

Le film cellulosique, sans lipide, présente un CTVE important, supérieur à  $270 \text{ g.m}^{-2}.\text{j}^{-1}.\text{atm}^{-1}$ . Ce fort coefficient est dû à des interactions multiples entre, la vapeur d'eau à caractère dipolaire et les fonctions hydroxyles hydrophiles libres de l'HPMC.

Parmi tous les composés hydrophobes testés, l'incorporation d'acide stéarique induit les meilleures réductions du CTVE. Une diminution de plus de 50 % est observée quand une teneur en lipide supérieure à 15 % est utilisée (Tableau 22).

Les résultats observés avec l'acide oléique, stéarique et les esters méthyliques des acides palmitiques et stéariques sont en accord avec les travaux de Kamper et Fennema (1984, 1985) qui ont obtenu une augmentation du CTVE avec la diminution de la longueur des chaînes alkyles des acides gras et l'augmentation du nombre d'insaturation.

Pour expliquer la différence obtenue entre le CTVE du stéarate de méthyle et celui de l'acide stéarique, sachant que ce dernier a un caractère hydrophile plus marqué due à l'estérification méthyle de la fonction acide carboxylique, une analyse de la microstructure des films par microscopie électronique à balayage (Jeol 840A) a été effectuée. Une différence d'homogénéité entre les deux films a été observée (Figure 41).



**Figure 41 : Microscopie électronique à balayage (grossissement 1500) : (A) film HPMC, (B) film à l'acide stéarique, (C) film au méthyle stéarate**

La présence d'ester méthylique entraîne l'apparition de bulles d'air et de pores qui sont sûrement à l'origine du plus grand CTVE. Ce phénomène est conforté par les travaux de Wong (1992) qui mentionnent que l'utilisation d'esters d'acide gras induit, par rapport à leur acide, une variation de la microstructure du film, incluant une diminution de la densité et une formation de pores, qui peuvent être corrélées à des différences au niveau des propriétés barrière du film. Le stéarate de méthyle est connu aussi pour avoir un effet plastifiant qui diminuerait les propriétés barrière en diminuant la cohésion du film. La température de fusion ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) plus basse pour le stéarate de méthyle par rapport à celle de l'acide stéarique ( $72 \text{ }^\circ\text{C}$ ) serait également un facteur intervenant dans l'augmentation du CTVE (Irissin-Mangata, 1998). La diminution du CTVE des films après addition d'acide stéarique est due à

l'augmentation du caractère hydrophobe global du film associée, à la longueur et à la faible mobilité de la chaîne hydrogéo-carbonée de l'acide gras saturé (Kestler et Fennema, 1989). Ces résultats sont confortés par ceux de Ayranci et Tunc (2001) qui ont mesuré les plus bas CTVE pour des films à base de méthylcellulose en incorporant de l'acide stéarique. Debeaufort *et al.* (2000) observent une diminution de 40% du CTVE dès que 5% en acide stéarique sont introduits dans la matrice du film. Yang et Paulson (2000) ont opté pour l'introduction de 15 % d'un mélange acide stéarique-palmitique pour réduire significativement les CTVE de bioemballages.

Ces résultats ont ainsi conduit à choisir l'acide stéarique à 15 % (p/p HPMC) en tant que composé hydrophobe à inclure dans le film, afin de diminuer efficacement les CTVE. Au-delà de 15 %, il devient difficile de produire de façon répétable des films composites.

Les films composites à base d'HPMC et d'acide stéarique ont ensuite été testés dans des conditions dites tropicales, plus drastiques (0-90 % en humidité relative et 38 °C) afin de confirmer la réduction du CTVE après incorporation d'acide gras (Tableau 23).

Acide stéarique (% p/p HPMC)	CTVE (g H <sub>2</sub> O .m <sup>-2</sup> .j <sup>-1</sup> . atm <sup>-1</sup> )
0	3567 ± 218
5	784 ± 23
10	727 ± 107
15	455 ± 4

**Tableau 23 : CTVE (g eau.m<sup>-2</sup>. j<sup>-1</sup>.atm<sup>-1</sup>) mesurés pour des films de 50 cm<sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 90 % d'HR et 38 °C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).**

Les valeurs des CTVE à 0-90 % en HR et 38 °C sont significativement supérieures à celles obtenues à 0-50 % en HR et 23 °C (Tableau 22 et Tableau 23). La première étape dans le transfert de vapeur d'eau à travers un film est conditionnée par l'étape d'adsorption d'eau à la surface du film, qui est supérieure dans le cas de 90 % en HR. De plus, le transfert de vapeur d'eau de matériaux hydrophiles est fonction de l'humidité relative ambiante. Plus celle-ci est importante, plus le film est plastifié par la présence des molécules d'eau entraînant ainsi une

augmentation du transfert de vapeur d'eau. La diffusion dans la matrice est ensuite favorisée thermo-dynamiquement par la plus grande température (38 °C) suivant la loi d'Arrhenius  $D = D_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$  laquelle montre que le coefficient de diffusion D augmente avec la température.

L'introduction d'acide stéarique entre 5 et 15 % réduit le CTVE de 78 à 87 %. Ceci est en accord avec les résultats obtenus précédemment et montre ainsi la potentialité des films composites à base d'acide stéarique à limiter les transferts d'eau, et par conséquent à réduire la déshydratation des aliments, et ce, même dans des conditions d'humidité et de température défavorables.

## I.2 Etude et amélioration des propriétés barrière à la vapeur d'eau des films réticulés

### I.2.1 Mise en œuvre de la réticulation et calcul du taux de réticulation

La réticulation consiste à établir des liaisons ester inter et/ou intra-chaînes entre des fonctions hydroxyles libres du polymère d'HPMC et d'une fonction acide carboxylique d'un agent de réticulation, avec perte d'une molécule d'eau. La réticulation, réduisant la mobilité des chaînes de polymères en établissant des liaisons covalentes entre chaînes de cellulose, pourrait avoir comme conséquence une augmentation de la rigidité du film et une amélioration des propriétés barrière du film à la vapeur d'eau et au gaz (Kestler et Fennema, 1986). Le glutaraldéhyde a souvent été utilisé pour réticuler les polymères polysaccharidiques (Kawase *et al.*, 1997), mais du fait de sa nature cytotoxique, il est impropre à entrer dans la composition d'un film comestible ou au contact de produits alimentaires (Dal Pozzo *et al.*, 2000). Le PolyEthyleneGlycol (PEG) a également été utilisé comme agent réticulant, particulièrement dans les bioemballages actifs à base de chitosane (Dal Pozzo *et al.*, 2000). Selon Zhou *et al.* (1995), l'efficacité des polyacides comme agents réticulants augmente selon l'ordre suivant : acide 1,2,3,4 butanetetracarboxylique > acide 1,2,3 propanetricarboxylique (acide carballylique) > acide succinique. Cette réactivité serait essentiellement due à leur capacité à former des intermédiaires anhydrides (Zhou *et al.*, 1995). Ainsi, les polyacides jusqu'à trois fonctions acides carboxyliques sont encore capables d'interagir chimiquement pour établir des liaisons ester avec les fonctions OH libres du polymère. L'acide citrique est

couramment utilisé comme agent de réticulation. Il a également l'avantage d'être reconnu comme additif alimentaire de la famille des conservateurs, pouvant entrer sans aucune contrainte législative dans la fabrication de films comestibles ou biodégradables. L'acide citrique, en présence de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en tant que catalyseur, permettrait la réticulation de la cellulose selon le mécanisme proposé par Zhou *et al.* (1995) (Figure 42).

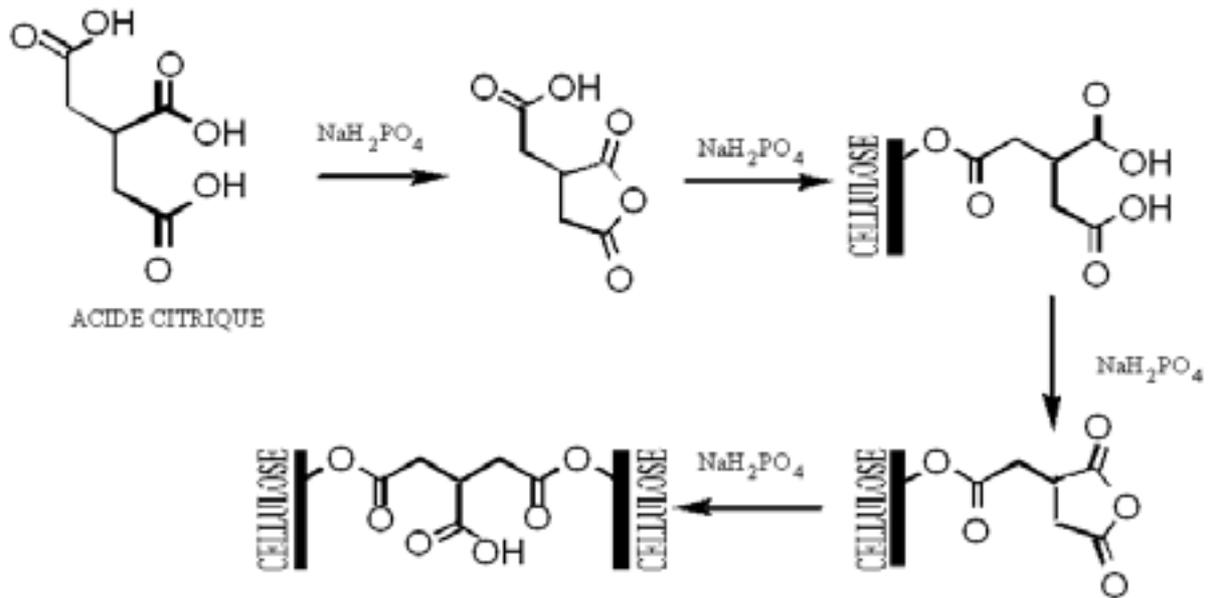


Figure 42 : Schéma de réaction de la cellulose en présence d'acide citrique et de dihydrogénophosphate de sodium (Zhou *et al.*, 1995)

C'est en passant par une forme anhydride qu'un acide polycarboxylique réagirait sur les fonctions OH libre de la cellulose. Le mécanisme proposé met en jeu chacune des deux fonctions acides carboxyliques en position 1 et 3 de l'acide citrique pour réticuler deux chaînes de polymères de cellulose avec perte de deux molécules d'eau (Zhou *et al.*, 1995).

Le taux de réticulation a tout d'abord été mesuré par la méthode de dosage en retour, en fixant la teneur en catalyseur à 50 % (p/p acide citrique) et en faisant varier la teneur en acide citrique entre 0 et 15 % (p/p HPMC). La teneur en catalyseur correspond à 7,5 % (p/p) de la teneur en HPMC. Les résultats sont présentés dans le Tableau 24. Le taux de réticulation est mesuré par la diminution de l'acidité après réticulation. Des films non traités thermiquement et contenant 15 % d'acide citrique permettent de calculer le nombre de moles de fonction COOH présentes initialement. Des films exempts d'acide citrique et traités thermiquement

sont utilisés comme films de référence pour s'affranchir d'éventuelles modifications chimiques pouvant introduire une acidification sous l'action de la température de réticulation (190°C, 15 min).

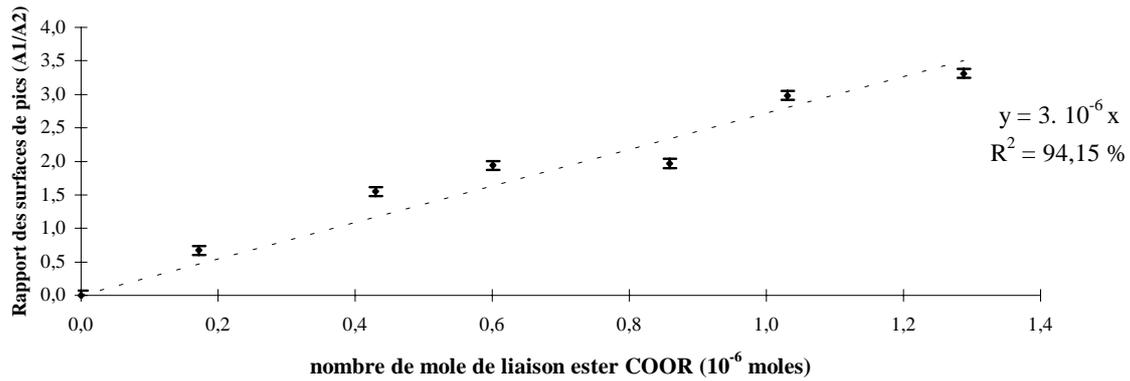
Acide citrique (% p/p HPMC)	Traitement thermique	Acidité titrée (mole.g <sup>-1</sup> )	Acidité théorique (mole.g <sup>-1</sup> )	Taux de réticulation (%)
0		0	0	
	X	0	0	0
5		2.2 10 <sup>-4</sup>	2.2 10 <sup>-4</sup>	
	X	1.4 10 <sup>-4</sup>	2.2 10 <sup>-4</sup>	35
10		4.4 10 <sup>-4</sup>	4.3 10 <sup>-4</sup>	
	X	2.1 10 <sup>-4</sup>	4.3 10 <sup>-4</sup>	50
15		7.0 10 <sup>-4</sup>	6.7 10 <sup>-4</sup>	
	X	2.4 10 <sup>-4</sup>	6.7 10 <sup>-4</sup>	65

**Tableau 24 : Taux de réticulation déterminé par le dosage en retour.**

La mise en œuvre de la réticulation avec un pourcentage croissant en acide citrique montre une réduction significative de l'acidité. Cette diminution est certainement corrélée à l'établissement de liaisons ester. 15 % en acide citrique entraîne un taux de 65 % de réticulation.

Pour confirmer que la diminution de l'acidité est bien due à la réticulation, c'est à dire à la mise en œuvre de liaisons ester, l'IRTF en ATR a été utilisée (Figure 43).

Une droite de calibration préalable a été établie avec le triéthylcitrate pour corréler proportionnellement le nombre de mole de liaisons ester à l'intensité de la bande ester vers 1735 cm<sup>-1</sup>.



**Figure 43 :** Variation du rapport de surface des pics A1 (1735 cm<sup>-1</sup>) sur A2 (948 cm<sup>-1</sup>) suivant le nombre de moles de fonctions ester. Les points sont des moyennes de trois répétitions et leurs intervalles de confiance sont représentés par des barres verticales (p = 95 %).

La surface du pic à 1735 cm<sup>-1</sup> (fonction ester), ramenée à la surface du pic A2 (948 cm<sup>-1</sup>) pour s'affranchir des variations de l'épaisseur du film, est proportionnelle aux nombre de moles de fonctions ester (Figure 43). Il apparaît ainsi que la diminution de l'acidité est bien corrélée à une mise en œuvre de la réticulation par formation de liaisons ester.

### I.2.2 Influence de la réticulation sur le CTVE

L'effet sur le CTVE des teneurs en catalyseur NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0 et 50 % (p/p acide citrique)) et en acide citrique (0 et 15 % (p/p HPMC)) a été appréhendé. Les expériences ont été conduites à 0-50 % en HR et à 23 °C ou à 0-90 % en HR et à 38 °C et les résultats sont présentés dans le Tableau 25.

	0-50 % HR et 23 °C			0-90 % HR et 38 °C	
Acide citrique (% p/p HPMC)	Traitement thermique : 190 °C pendant 15 min				
	Catalyseur (% p/p acide citrique)				
	0	20	50	0	20
0	269 ± 14	268 ± 8	238 ± 58	4421 ± 222	
5	221 ± 2	190 ± 18	229 ± 1	3400 ± 144	2989 ± 156
15	184 ± 15	177 ± 3	168 ± 21	3400 ± 156	2612 ± 83
	0-50 % HR et 23 °C			0-90 % HR et 38 °C	
0	Sans traitement thermique				
	316 ± 26			4415 ± 218	

**Tableau 25 :** CTVE (g eau .m<sup>-2</sup>. j<sup>-1</sup>.atm<sup>-1</sup>) mesurés pour des films de 50 cm<sup>2</sup> de surface et de 20-40 µm d'épaisseur, à 90 % d'HR et 38°C ou 50 % d'HR et 23°C. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p = 95 %).

La réticulation des films à base d'HPMC réduit le CTVE et ce quelle que soit la teneur en acide citrique ou en catalyseur (Tableau 25). Le choc thermique ne détruit pas la matrice du film réticulé dont le CTVE reste égal à celui du film non réticulé.

A 50 % en HR et à 23°C, l'augmentation de la teneur en acide citrique réduit significativement le CTVE alors que le catalyseur ne semble pas influencer les propriétés barrière du film à la vapeur d'eau.

A 90 % en HR et à 38°C, le CTVE est largement supérieur aux valeurs obtenues à plus basse température et humidité. Les teneurs en acide citrique (0 et 15 %) et en catalyseur (0 et 20 %) ont un effet significatif sur la réduction du CTVE (p<0,05).

En conséquence, la réticulation, surtout avec 15 % d'acide citrique (p/p HPMC) et 50 % de catalyseur (p/p acide citrique) permet d'améliorer les propriétés barrière du film à la vapeur d'eau en diminuant le CTVE de 34 % par rapport à un film d'HPMC non réticulé. Cette réduction est due à la diminution du caractère hydrophile du film. Cependant, cette diminution reste inférieure à celle obtenue avec les films composites à base d'acide stéarique. Cette différence peut être expliquée par l'intercalation de l'acide citrique entre les chaînes de cellulose, créant ainsi une augmentation de la taille des interstices et une diminution de la

cohésion des films (Dal Pozzo *et al.*, 2000). De plus, la présence de fonctions COOH des molécules d'acide citrique qui n'ont pas réagi chimiquement pourrait favoriser le transfert. Afin d'associer composé hydrophobe et modification chimique, l'élaboration de films composites avec 15 % d'acide stéarique a été mise en œuvre avant que ces films ne subissent une réticulation en présence de 15 % d'acide citrique (p/p HPMC) et de 50 % en catalyseur (p/p acide citrique). Un coefficient de transfert à la vapeur d'eau égal à  $119 \pm 16 \text{ g.m}^2.\text{j}^{-1}.\text{atm}^{-1}$  a été obtenu. Cette valeur est équivalente à celle obtenue avec les films composites non réticulés. De plus, les films réticulés ont l'avantage d'être totalement lisses, moins blancs et de structure plus homogène.

Dans la suite de ces travaux, la sensibilité à l'eau vapeur et liquide des films sans lipide, des films composites, des films réticulés et des films composites et réticulés a été étudiée.

## II Sensibilité des bioemballages à l'eau à l'état vapeur et liquide

### II.1 Sensibilité des bioemballages à l'eau vapeur

La sensibilité à l'eau a été étudiée en mettant en œuvre les isothermes de sorption pour des films témoins, composites et réticulés. Les résultats sont donnés dans la Figure 44.

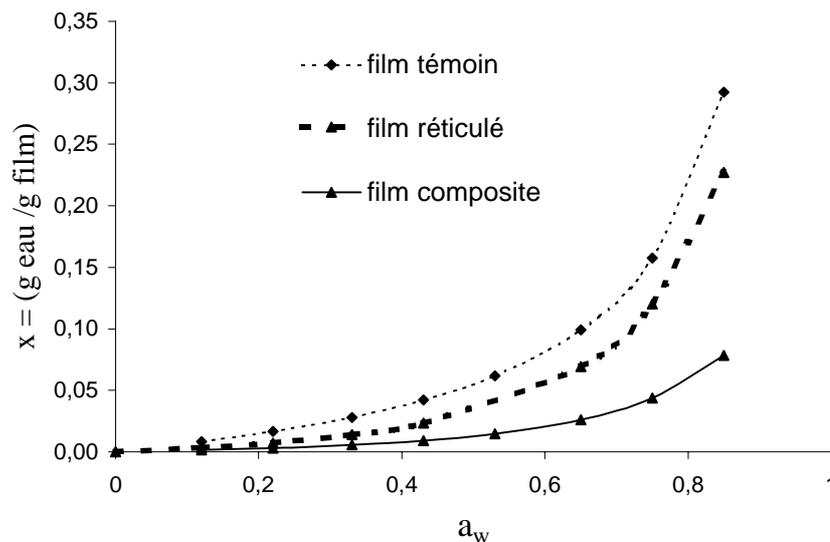


Figure 44 : Isothermes de sorption de film témoin non réticulé et sans acide stéarique, de film composite et de film réticulé. Les droites ont été préalablement lissées par le modèle de GAB.

Quelle que soit l'activité de l'eau étudiée, les films composites incorporant 15 % en acide stéarique présentent l'affinité à l'eau vapeur la plus faible. Cette différence s'accroît avec l'augmentation de l' $a_w$ , surtout pour celles supérieures à 0,4.

Le film réticulé, moins sensible à l'eau que les films témoins, garde cependant une hygroscopie non négligeable. Cette dernière serait peut-être due aux fonctions COOH amenées par l'acide citrique, qui n'auraient pas réagi chimiquement. C'est l'une des raisons pour laquelle les CTVE ont été inférieurs à ceux obtenus avec les films composites.

L'équation de GAB a permis de calculer la teneur en eau dans le film ( $X_m$ ) qui est de l'ordre de 5 %, 4 % et 2 % du poids sec respectivement pour les films témoins, réticulés et composites.

Cette différence de sorption est due à la diminution du caractère hydrophile du film. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études où la variation de la composition du film par introduction de PEG par exemple dans des films à base de méthyl cellulose influence la sorption d'eau, surtout pour les  $a_w$  supérieures à 0,7. L'introduction de PEG400 à 20-30 % augmente de plus de 70 % la quantité d'eau absorbée par rapport à un film sans PEG. Les auteurs attribuent ceci au caractère hydrophile du PEG qui augmenterait l'hydrophilie globale du film (Debeaufort et Voilley, 1995). De même, la plastification des films au sorbitol, à la place du glycérol, réduit la sorption d'eau : le sorbitol est moins hydrophile que le glycérol (Kim et Ustunol, 2001). De façon similaire, la matrice polymérique à base de méthylcellulose ou d'éthylcellulose montre des différences de sorption liées à la longueur de la chaîne alkyle (Velázquez de la Cruz *et al.*, 2001).

## II.2 Sensibilité des bioemballages à l'eau liquide

### II.2.1 Angle de contact

La sensibilité de la surface du film à l'eau a été évaluée par angle de contact. La goniométrie est une analyse de l'énergie de surface des emballages. Elle consiste à déposer des gouttelettes de différents solvants (hydrophiles et hydrophobes) à la surface du film et à mesurer des énergies de surface du solide  $\gamma_s$ , du liquide  $\gamma_l$  et de l'énergie interfaciale solide liquide  $\gamma_{sl}$ . Ces énergies tiennent compte de la texture de la surface du film (porosité et aspérité) et des interactions chimiques entre le film et le solvant. Dans la pratique, la nature hydrophile ou

hydrophobe d'un film est déterminée en déposant une gouttelette d'eau à la surface du film et en mesurant l'angle de contact  $\theta$ , qui varie entre  $0^\circ$  pour des films très hydrophiles et  $90^\circ$  pour des films plutôt hydrophobes. Seuls les angles de contact  $\theta$  ont ainsi été pris en considération. Les résultats des différents films sont donnés dans le Tableau 26.

	Film témoin	Film composite	Film réticulé	Film réticulé composite
Angle $\theta$	$49 \pm 7$	$82 \pm 3$	$55 \pm 5$	$80 \pm 5$

**Tableau 26 : Angle de contact  $\theta$  mesuré à l'interface eau-film. Les valeurs sont des moyennes de 9 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

En choisissant la face lisse des films (côté support de séchage), les angles de contact  $\theta$  donnés dans le Tableau 26 montrent que l'introduction de matière lipidique, dans le cas de films composites avec l'acide stéarique et composites réticulés, augmente significativement l'angle  $\theta$  pour tendre vers  $90^\circ$ , indiquant une augmentation du caractère hydrophobe des films après introduction d'acide stéarique. Une élévation d'environ 35 % est observée par rapport aux films témoins sans acide gras ni réticulation.

Par contre, la réticulation n'améliore guère l'angle  $\theta$ . La réticulation garde encore une certaine hygroscopie malgré une diminution du nombre de fonction OH, confortant ainsi les résultats préalablement obtenus en isotherme de sorption.

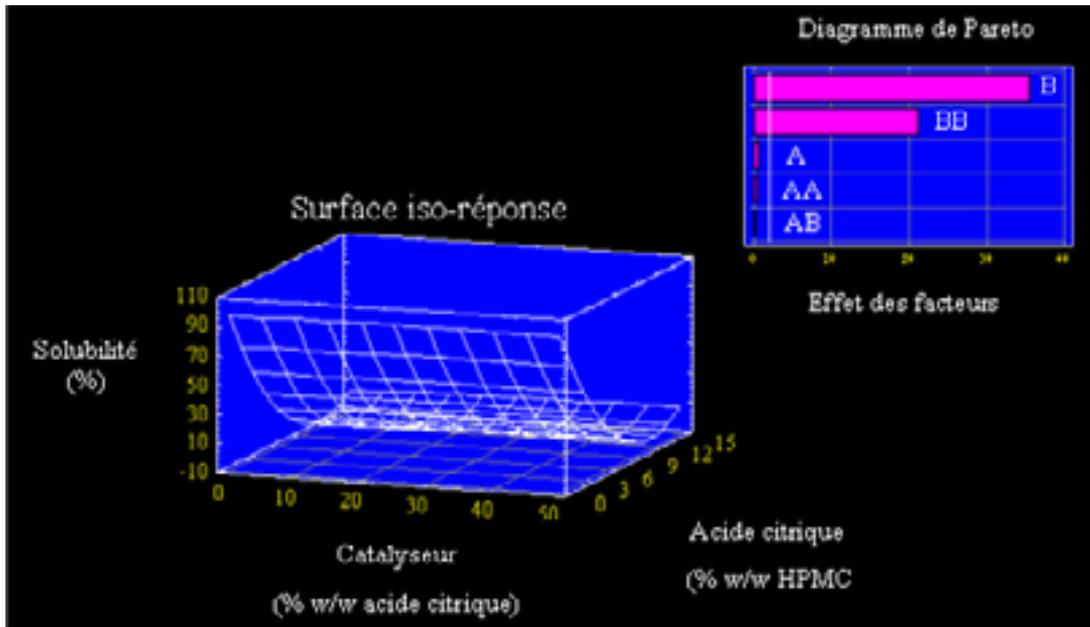
### II.2.2 Hydrosolubilité des films

L'hydrosolubilité est un paramètre important qui peut conditionner les applications des films HPMC en agroalimentaire.

Les films homogènes à base d'HPMC et les films composites, avec différentes teneurs en acides gras, sont totalement solubles dans l'eau.

L'effet de la réticulation sur la solubilité du film dans l'eau a été appréhendée en faisant varier les teneurs en catalyseur  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Facteur A) de 0 à 50 % (p/p acide citrique) et en acide citrique (Facteur B) de 0 à 15 % (p/p HPMC). Les effets des facteurs A, B, AA et BB et de leur interaction AB ont été analysés par régression linéaire multi-factorielle basée sur le test

ANOVA de l'analyse des variances à 95 % de probabilité (Statgraphic 4.1, Sigma-plus). Les résultats sont donnés dans la Figure 45.



**Figure 45 : Etude de la solubilité des films dans l'eau en fonction des teneurs en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (facteur A) et en acide citrique (facteur B). Une régression linéaire multi-factorielle analyse les effets des facteurs A, B, AA, BB et AB (diagramme de Pareto).**

L'analyse des effets des facteurs A et B et de leurs interactions montre que seul les facteur B et BB, c'est à dire la teneur en acide citrique, ont un effet significatif sur la diminution de la solubilité des films dans l'eau ( $p < 0,05$ ). Plus la teneur en acide citrique augmente, plus l'hydro-solubilité diminue. La régression linéaire multi-factorielle a permis de calculer un modèle polynomial corrélant la solubilité à la quantité d'acide citrique :

$$\text{Solubilité (\%)} = 96,51 - 18,19 B + 0,80 B^2$$

Le coefficient de corrélation, supérieur à 97 %, valide d'une part le modèle, et permet d'autre part de montrer qu'un optimum de 10 % en acide citrique (p/p HPMC) correspond à un minimum d'hydro-solubilité. Dès 5 % en acide citrique, plus de 80 % du film devient insoluble dans l'eau, pour atteindre presque 100 % d'insolubilité vers 10 à 15 % en acide citrique.

La résistance à l'immersion dépend en effet de la nature et de la densité des interactions qui stabilisent le réseau. Dans le cas des films solubles, les interactions entre molécules possèdent

une énergie inférieure à celle que peuvent donner les groupements polaires non impliqués dans le réseau avec les molécules d'eau. Par contre, dans le cas de films réticulés, la présence de liaisons intermoléculaires covalentes augmente fortement la résistance à l'immersion, par l'intermédiaire des liaisons ester.

De plus, cette étude montre que le catalyseur  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  n'a aucun effet sur la solubilité et donc peu ou pas d'effet sur la modification chimique. Ceci est en désaccord avec les travaux de Zhou *et al.* (1995) qui ont observé un effet important du catalyseur sur la formation de l'intermédiaire anhydride. Le mécanisme d'action du catalyseur est encore mal connu, mais certains auteurs avancent l'hypothèse d'un effet tampon du catalyseur qui stabiliserait le pH de réticulation. Par contre, les travaux de Herron *et al.* (1990) sont en accord avec nos résultats. Ils ont rapporté un effet faible du catalyseur sur la réaction de réticulation, surtout à pH compris entre 1,5 et 5. Le pH de notre solution filmogène est de  $2,6 \pm 0,1$ .

Ainsi, la réticulation permet, à la différence des films composites, d'élaborer des films réticulés ou composites réticulés hautement insolubles dans l'eau. L'absence d'hydro-solubilité permettrait aux films réticulés d'élargir leur champ d'application en agroalimentaire à des produits à forte  $a_w$ .

Suite à cette étude faisant référence à la sensibilité à l'eau des matériaux élaborés, les propriétés physiques et physico-chimiques des films ont alors été mesurées afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation en alimentaire.

### **III Caractérisation physique et physico-chimique des films**

Différentes propriétés physiques et physico-chimiques des films ont été étudiées et les résultats sont présentés dans le Tableau 27.

		Film témoin	Film composite	Film réticulé	Film composite réticulé
couleur	a	-0,17 ± 0,03	0,41 ± 0,01	-0,15 ± 0,06	0,04 ± 0,09
	b	-0,75 ± 0,01	1,99 ± 0,23	1,17 ± 0,77	4,57 ± 1,27
	L	42,78 ± 0,19	55,13 ± 2,43	40,50 ± 1,11	43,84 ± 0,98
Propriétés mécaniques	A (%)	6,63 ± 1,28	2,14 ± 0,33	2,80 ± 0,80	2,70 ± 1,00
	Y (MPa)	19 ± 6	11 ± 2	13 ± 3	12 ± 2
	FR (MPa)	34 ± 6	11 ± 4	31 ± 7	22 ± 2
Rugosité (ml.min <sup>-1</sup> )			Face contact support		
			de séchage : 4 ± 3		
	6 ± 2	Face évaporation :		6 ± 5	7 ± 4
		657 ± 101			

**Tableau 27 : Propriétés physiques et physico-chimiques des différents films témoin, composite, réticulés et composite réticulés. Les résultats sont des moyennes de 9 répétitions suivis de leurs intervalles de confiances (p=95 %).**

**Propriétés optiques.** Les matériaux d'emballage des produits alimentaires doivent avant tout être translucide pour permettre au consommateur de pouvoir voir le produit acheté. La translucidité des matériaux a été analysée par mesure de la couleur. Celle-ci, mesurée par le chromamètre Minolta, varie selon les formulations. Le film HPMC est totalement translucide. L'addition de 15 % en acide stéarique rend les films plus blancs : le paramètre L est augmenté de 30 % (Tableau 27 et Figure 46). En accord avec Yang et Paulson (2000), une opacité équivalente des films a été observée après introduction d'un mélange d'acide stéarique/palmitique. Cette augmentation de la couleur blanche vient de la diffraction de la lumière après contact avec les gouttelettes de lipides dispersées à la surface du film (Debeaufort *et al.*, 2000).

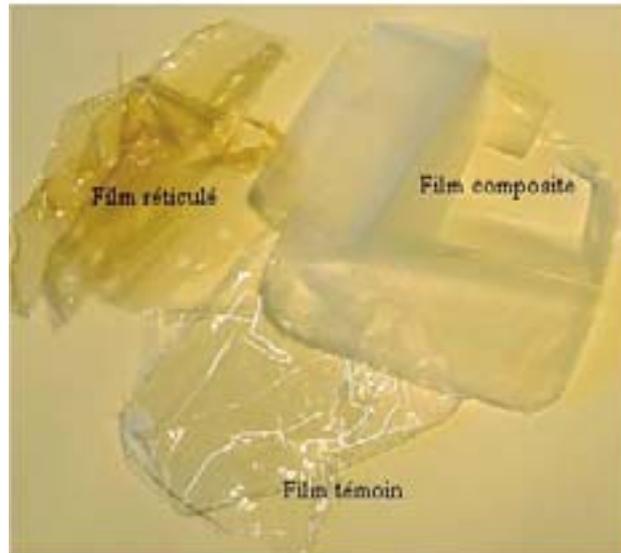


Figure 46 : Photographie des films témoins, réticulés et composites

Le film réticulé a plutôt tendance à jaunir, avec une augmentation du coefficient chromatique **b**. Cette coloration peut provenir de la dégradation sous l'effet de la chaleur de l'acide citrique en acide aconitique (1,2,3-propènetricarboxylique), avec une déshydratation du groupement hydroxyle en  $\alpha$  (Zhou *et al.*, 1995) (Figure 47).

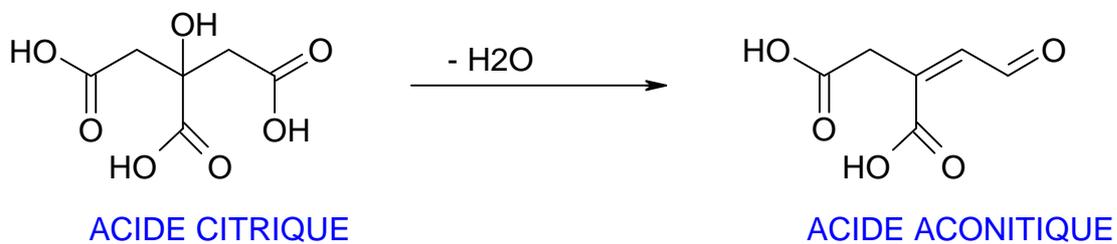
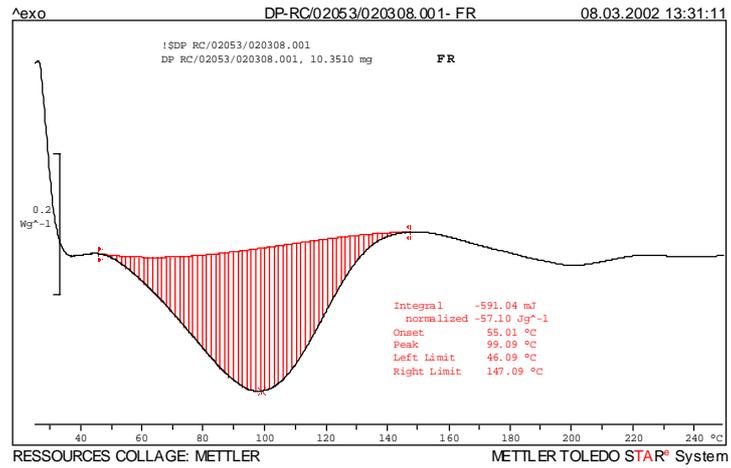
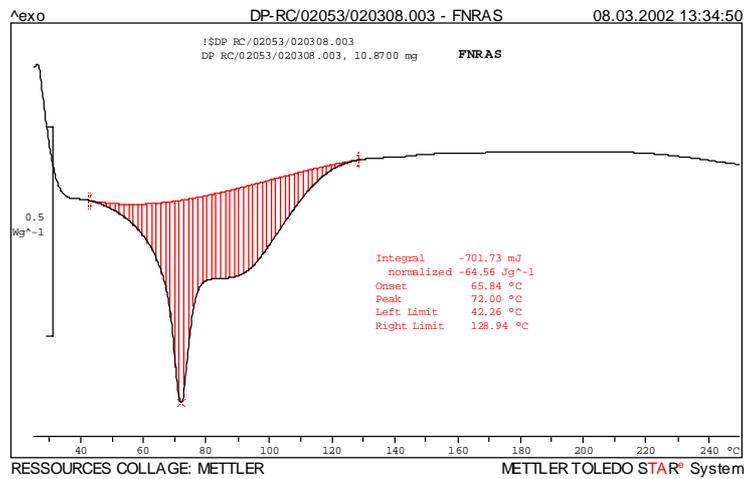


Figure 47 : Dégradation de l'acide citrique (Zhou *et al.*, 1995)

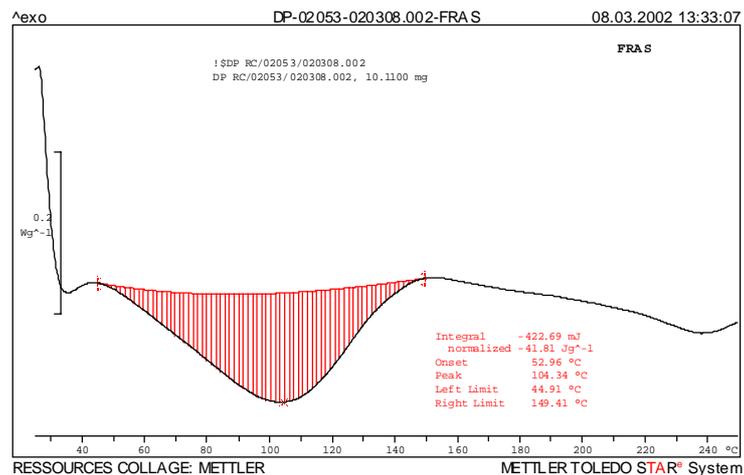
Enfin, les caractéristiques du film composite réticulé se rapprochent de celles du film témoin. La blancheur **L** du film en particulier est moins élevée dans le cas des films composites après réticulation. Ce phénomène est peut être due à une réaction chimique entre l'acide stéarique et certains constituants du film. Une analyse par ATD a été menée et les thermogrammes sont présentés sur la Figure 48 afin de vérifier si l'acide stéarique est libre (présence d'un pic de fusion vers 72 °C) ou lié chimiquement à la matrice du film (absence du pic de fusion).



FR : film réticulé



FNRAS : film composite non réticulé à base d'acide stéarique



FRAS : film composite et réticulé à base d'acide stéarique

Figure 48 : Thermogrammes des films réticulés, composites à base d'acide stéarique et de films composites et réticulés à base d'acide stéarique (Mettler)

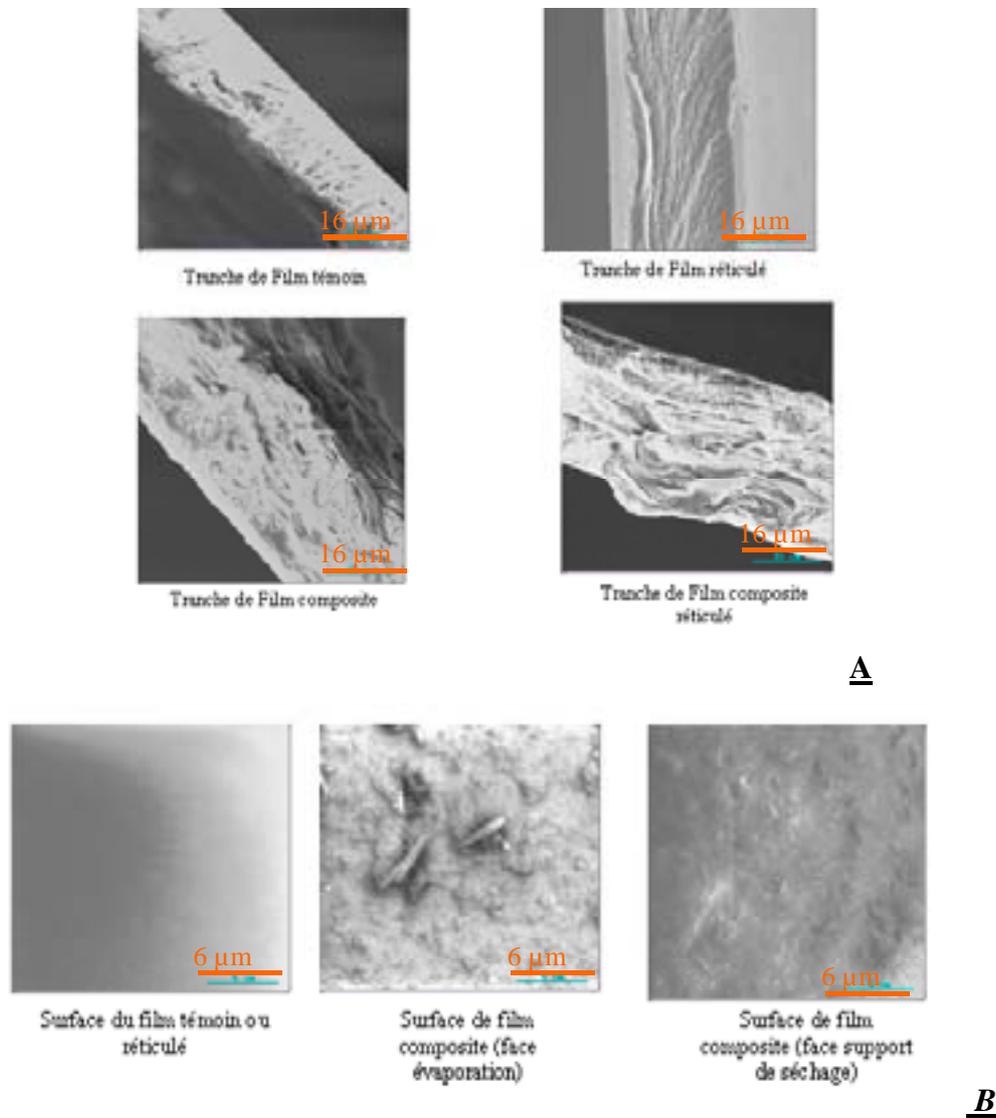
Le comportement thermique des films, déterminé entre 20 et 250°C, ne permet pas de distinguer une zone de température de transition vitreuse (Figure 48). Le film composite non réticulé montre un pic endothermique de fusion vers 70°C. L'acide stéarique, libre dans la matrice du film, fond sous l'action de la chaleur à sa température théorique de fusion égale à 72°C. Le film composite réticulé donne un thermogramme proche de celui du film réticulé sans lipides. Le pic de fusion du composé hydrophobe a disparu. L'acide stéarique, sous l'action de 190°C pendant 15 min, ne serait donc plus libre. La disparition du blanchiment pourraient être due aux molécules d'acide stéarique, liées potentiellement de façon covalente au polymère d'HPMC, entraînant une moindre diffraction et réfraction de la lumière. L'acide stéarique peut en effet réagir avec les fonctions OH de l'HPMC pour mettre en œuvre des liaisons ester.

**Propriétés mécaniques.** La plage de déformation élastique et plastique ainsi que la résistance à la rupture sont des caractéristiques importantes pour les bioemballages qui ont un rôle de protection de l'intégrité des aliments. La résistance mécanique a été étudiée en traction par la mesure de trois paramètres souvent utilisés dans la littérature : la force à la rupture (FR), l'élasticité par le module de Young (Y) et le pourcentage de déformation ou d'allongement (A). Quelle que soit la nature du film, les paramètres A et Y sont diminués respectivement d'environ 65 % et 40 % par rapport au film témoin non réticulé et sans matière lipidique (Tableau 27). Les propriétés sont largement associées à la distribution et à l'intensité des interactions inter et intramoléculaires. L'influence des interactions dépend de la probabilité et des énergies mises en jeu. L'ajout d'acide stéarique, à l'origine des discontinuités dans le matériau, diminuerait la cohésion structurelle initiale et réduirait ainsi les propriétés mécaniques. La FR est réduite de 68 % quand de l'acide stéarique est introduit dans le film, alors que cette réduction n'est que de 33 % quand le film composite est réticulé. Les films réticulés sont plus rigides du fait de la réticulation qui instaure des liaisons covalentes, réduisant ainsi fortement la mobilité des chaînes. Les liaisons covalentes stabilisent le réseau donnant des films particulièrement résistants. L'addition d'acide stéarique serait susceptible de créer des discontinuités au sein de la matrice cellulosique, qui auraient tendance à réduire ainsi les propriétés mécaniques du film composite (Yang et Paulson, 2000; Debeaufort *et al.*, 2000 ; Kestler et Fennema, 1989).

**Rugosité.** Le paramètre rugosité a ensuite été testé. Les films témoins, réticulés et composites réticulés sont totalement lisses (Tableau 27). Le film composite présente une différence selon

la face étudiée. En effet, la face en contact avec le support de séchage est totalement lisse alors que celle orientée vers l'évaporation présente une certaine rugosité, qui serait liée à la méthode de séchage par évaporation, où deux phases non miscibles (cellulose et acide stéarique) précipitent à des vitesses différentes. L'évaporation du solvant induit aussi des migrations de globules lipidiques, qui finissent par coalescer et former des structures de taille supérieure pour enfin précipiter, ce qui expliquerait l'apparition des hétérogénéités (Debeaufort et Voilley, 1995).

Yang et Paulson (2000) observent de la même façon des irrégularités à la surface du film après introduction de lipides. Les parties hydrophobes ont souvent tendance à s'orienter vers l'atmosphère. L'observation de la microstructure par microscopie électronique à balayage des différents films a été étudiée en surface et en coupe après cryofracture (Jeol 840A) (Figure 49).



**Figure 49 : Microscopie électronique à balayage des bioemballages (Jeol 840A) . A- observation des coupes (grossissement x 1500), B- observation des surfaces (grossissement x 4000)**

L'observation en microscopie électronique à balayage des coupes après cryofracture des différents films montre une structure très homogène. L'observation des surfaces confirme bien les résultats préalablement obtenus par la mesure des rugosités. En effet, les films témoins, réticulés et composites réticulés montrent une surface très lisse et ce, quelle que soit la face observée. Par contre, le film composite montre une surface très rugueuse, avec des aspérités qui pourraient correspondre aux cristaux d'acide stéarique dispersés à la surface du film, et qui expliqueraient la différence de rugosité entre la face évaporation et la face en contact du support de séchage.

## IV Conclusion

Le second chapitre de ce travail de thèse montre que quatre bioemballages à base d'HydroxyPropylMéthylCellulose peuvent être obtenus en fonction de leur composition ou du procédé de fabrication. Des films à base d'HPMC seul, à base d'HPMC et réticulés, des films composites contenant 15 % d'acide stéarique et composites réticulés peuvent être obtenus, avec des propriétés très différentes :

- ✓ Le film à base d'HPMC seul est faiblement barrière à la vapeur d'eau, mais ses propriétés mécaniques sont intéressantes, notamment au niveau de la déformation plastique.
- ✓ Le film à base d'HPMC réticulé a des propriétés barrière à la vapeur d'eau moyennes. Les caractéristiques mécaniques montrent un film plutôt rigide. L'hydro-solubilité est diminuée en fonction du taux de réticulation.
- ✓ Le film à base d'HPMC incorporant 15 % en acide stéarique a des propriétés barrière à la vapeur d'eau pouvant limiter les phénomènes de déshydratation des aliments. Ses propriétés mécaniques sont plutôt faibles, son hydro-solubilité et son hétérogénéité restent ses principaux handicaps.
- ✓ Le film composite à base d'HPMC et d'acide stéarique qui a subi la réticulation, gagne en homogénéité et en transparence et a de bonnes propriétés barrière à la vapeur d'eau et de bonnes propriétés mécaniques. De plus, ce film reste insoluble dans l'eau.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **partie 3**

## I Stabilité de la nisine dans les conditions de fabrication des films

Les deux premières parties de ce travail de thèse ont défini les conditions de fabrication des films avec l'élaboration de 4 films différents :

1. film à base d'HPMC
2. film composite contenant 15 % d'acide stéarique (p/p HPMC)
3. film réticulé contenant 15 % d'acide citrique (p/p HPMC), 50 % catalyseur (p/p acide citrique)
4. film composite et réticulé contenant 15 % acide stéarique (p/p HPMC), 15 % acide citrique (p/p HPMC) et 50 % catalyseur (p/p HPMC)

Une concentration de 1000 UI.ml<sup>-1</sup> en nisine a été choisie pour inhiber les souches cibles de *Listeria* et la souche de Staphylocoque.

Avant d'envisager l'élaboration et l'étude des films bioactifs, la stabilité de la nisine à l'état libre a été testée dans les conditions de formulation et de mise en œuvre des différents films.

### I.1 Stabilité de la nisine dans les conditions de fabrication des films homogènes

Le film est fabriqué en dispersant l'HPMC dans un solvant eau/éthanol. La solution filmogène est ensuite séchée 2h à 60°C.

L'effet de l'éthanol et de la température sur la stabilité de la nisine en solution a été testé en faisant varier la teneur en éthanol (3 parts de tampon phosphate, tampon phosphate/éthanol : 2/1 et tampon phosphate/éthanol : 1/2) et en testant deux couples temps/température (60°C/2h et 80°C/1h). Le couple 60°C/2h simule la phase de séchage du film. Le couple 80°C/1h teste plutôt la stabilité de la bactériocine dans le cas de la mise en œuvre des films composites à base d'acide stéarique.

La stabilité de la nisine est évaluée par la technique en puits sur *M. luteus*. Les diamètres des zones d'inhibition obtenues à partir des solutions de nisine traitées et témoins sont présentées dans le Tableau 28.

	Diamètre de zone d'inhibition (mm)	
	Traitement thermique	Sans traitement thermique
3 parts de tampon phosphate	14 ± 1	13 ± 1
Tampon phosphate/éthanol : 2/1	14 ± 1	14 ± 1
Tampon phosphate/éthanol : 1/2	13 ± 1	13 ± 1

**Tableau 28 : Activité anti-bactérienne de solutions de nisine à  $5.10^3$  UI.ml<sup>-1</sup> en tampon phosphate pH 6,1 50 mM, traitées thermiquement ou non et solubilisées dans différents teneurs en éthanol ou en tampon. Elle est mesurée par inhibition de *M. luteus* selon la technique en puits. Les données, correspondant à des diamètres d'inhibition (mm), sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

Ni le traitement thermique, ni la nature du solvant n'ont un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'activité anti-microbienne de la nisine. La nisine reste stable dans les conditions de fabrication des films. Cette bactériocine fait partie de la classe Ia, famille de bactériocines thermostables (Nes et al., 1996). Les 4 ponts thioethers de la lanthionine, de la 3-méthyl lanthionine, de la 2,3-didéhydroalanine et de la 2,3-didéhydrobutyrine seraient à l'origine de ce caractère thermostable. Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, sachant que le pH est à 6,1, la nisine est proche de son pH optimal d'activité (5,8) (Liu et Hansen, 1990 ; Hurst, 1981).

## I.2 Stabilité de la nisine dans les conditions de réticulation

Après avoir élaboré un film contenant  $10^3$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine, la réticulation a été entreprise en traitant à nouveau le film 15 min à 190°C. La stabilité de la nisine dans le film réticulé est comparée à celle de films n'ayant pas subi de choc thermique. Les techniques en puits ou en dépôt de disque de film sur *M. luteus* ont été utilisées.

Les premiers résultats à  $10^3$  UI.ml<sup>-1</sup> n'ont montré aucune activité résiduelle après choc thermique (non présentés). La concentration en nisine a alors été augmentée à  $10^5$  UI.ml<sup>-1</sup> et la stabilité de la nisine dans le film réticulé est donnée dans le Tableau 29.

Pour faciliter la lecture, l'activité anti-bactérienne résiduelle des films est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport aux films non modifiés chimiquement.

	Film réticulé		Nisine en poudre		Film traité thermiquement, sans acide citrique, ni catalyseur	
<b>Temps de traitement thermique (min)</b>	0	15	0	15	0	15
<b>Activité anti-bactérienne résiduelle (%)</b>	100	0	100	100	100	55

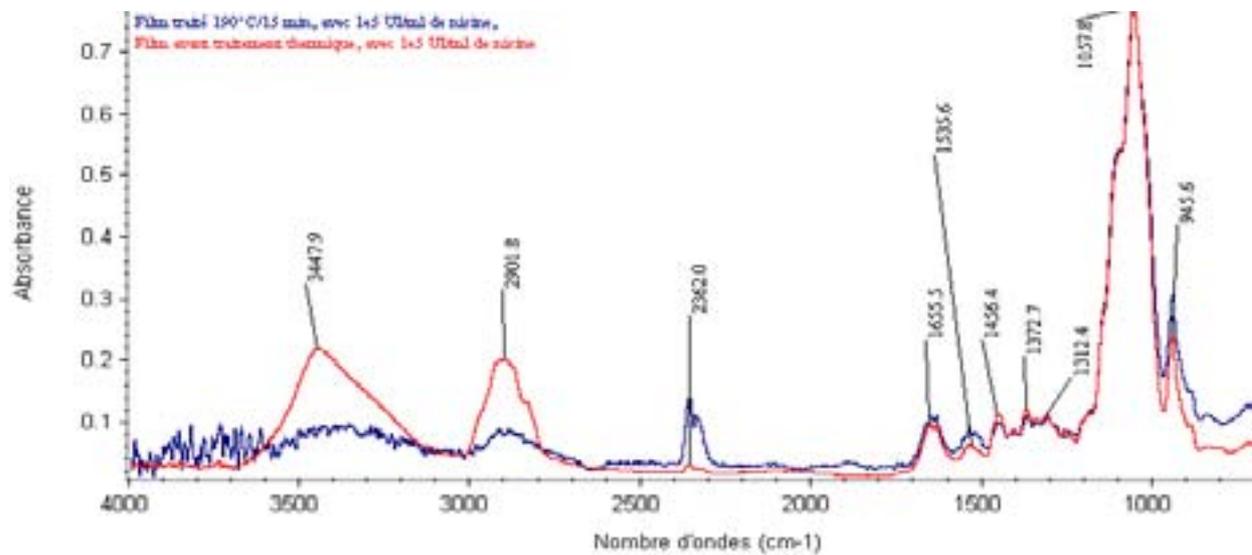
**Tableau 29 : Activité anti-bactérienne de films à  $10^5$  UI.ml<sup>-1</sup> ou de nisine en poudre, traités thermiquement 15 min à 190 °C, mesurée par inhibition en puits ou en disque de films sur *M. luteus*. Les données, correspondant à des diamètres d'inhibition, sont exprimées en pourcentage d'inhibition.**

Malgré l'incorporation d'une importante teneur en nisine, les films ayant subi la réticulation sont totalement inactifs. Deux hypothèses sont alors possibles pour expliquer cette perte d'activité :

- ✓ La haute température permettant la réticulation dénaturerait la nisine. Pour vérifier cette hypothèse, de la nisine en poudre est traitée 15 min à 190°C. Elle est ensuite suspendue dans du tampon phosphate pH 6,1 (0,05M) avant de tester son activité anti-bactérienne sur *M. luteus*. 100 % de l'activité anti-bactérienne résiduelle de la nisine sous forme de poudre sont observés après traitement thermique (Tableau 29). La nisine n'est donc pas dénaturée par la température.
- ✓ Des liaisons chimiques pourraient intervenir entre la nisine et d'autres constituants du film, sous l'action des conditions de réticulation. Tout d'abord, les fonctions amines primaires en position N terminale et sur les résidus lysine du peptide pourraient réagir avec les fonctions acides carboxyliques du triacide pour former de liaisons amides. Par ailleurs, les fonctions acides carboxyliques en position C terminale de la nisine pourraient potentiellement greffer la nisine sur l'HPMC par l'intermédiaire de liaisons ester. Dans les deux cas, la désorption de la nisine serait fortement limitée, ce qui serait à l'origine de l'activité faible ou nulle observée sur ces films modifiés chimiquement.

Pour vérifier la possibilité d'une interaction entre la nisine et l'HPMC après choc thermique, des films contenant de la nisine, sans acide citrique ni catalyseur, sont fabriqués et placés à 190°C pendant 15 min. La nisine montre une activité anti-bactérienne résiduelle égale à 55 % (Tableau 29).

Par conséquent, la perte d'activité anti-bactérienne du film réticulé pouvant être due à une rétention de la nisine dans le film par liaison chimique. Une analyse des films en IRTF par ATR a été mise en œuvre pour tenter de mettre en évidence l'apparition d'éventuelles bandes ester ( $1735\text{ cm}^{-1}$ ) après traitement thermique (Figure 50).



**Figure 50 : Spectre obtenu en analysant par IRTF par ATR des films traités 15 min à 190°C, incorporant  $10^5\text{ UI.ml}^{-1}$  de nisine en absence d'acide citrique et de catalyseur, comparés à des films de même composition mais non traités.**

Le spectre de la Figure 50 montre des bandes spécifiques de la nisine dans la plage  $1200\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  avec particulièrement la vibration des bandes des liaisons peptidiques CO-NH vers  $1655\text{ cm}^{-1}$  et l'apport des chaînes hydrogénéocarbonées par la nisine vers  $1460$  et  $1370\text{ cm}^{-1}$ , correspondant aux bandes de vibrations asymétriques des liaisons CH des groupements méthyles.

Par ailleurs, les spectres IR des films traités thermiquement ou non sont identiques. Aucune bande ester à  $1735\text{ cm}^{-1}$  n'est observée après traitement de 15 min à 190°C. La liaison ester entre la nisine et l'HPMC n'est donc pas mise en évidence, mais la sensibilité de l'IR ne permet peut-être pas de distinguer la bande ester, compte tenu des concentrations en nisine

égale à 0,1 % par rapport à la masse sèche du film. La perte d'activité des films après traitement thermique reste encore à déterminer.

En conclusion, la réticulation apparaît inadaptée pour la fabrication de films anti-bactériens. Dans la suite du travail, une méthode basée sur l'imprégnation des films réticulés dans des solutions de nisine sera présentée pour tenter de conférer une activité anti-bactérienne à ces matrices.

## II Activité anti-bactérienne des films composites

Les paragraphes précédents ont montré que la nisine est stable dans les conditions de fabrication des films avec ou sans lipide.

Par conséquent, des films composites ont été élaborés avec 15 % en acide stéarique et 1000 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine. L'activité inhibitrice de ces films composites a été testée sur les souches cibles (*Listeria* et Staphylocoques) par la technique de diffusion sur milieu gélosé et aucun diamètre d'inhibition n'a été obtenu.

Ce phénomène pouvait être dû à des interactions entre le peptide et un ou plusieurs des constituants du matériau, limitant ainsi l'action de la nisine sur les bactéries cibles. La concentration en nisine a alors été augmentée à 10<sup>5</sup> UI.ml<sup>-1</sup> et l'influence de la concentration en acide stéarique, entre 0 et 50 % (p/p HPMC), sur l'activité anti-bactérienne des films à base de nisine a été étudiée.

*L. innocua*, moins sensible à la nisine que *L. monocytogenes* et également non pathogène, a été préférentiellement utilisée pour la suite des expériences, sachant que les résultats obtenus avec cette souche pourront être transposables à *L. monocytogenes* plus sensible à la bactériocine. Les résultats sont donnés dans le Tableau 30 pour *L. innocua* et *S. aureus*.

Acide stéarique (%)	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>
0	6 ± 2	6 ± 2
10	74 ± 10	88 ± 18
20	61 ± 19	79 ± 19
30	47 ± 17	61 ± 19
40	47 ± 17	56 ± 10
50	47 ± 17	61 ± 19

**Tableau 30 : Activité anti-bactérienne de films contenant  $10^5$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine et différents pourcentages en acide stéarique. Les données à 0 % d'acide stéarique correspondent à des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les autres résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux films sans composé lipidique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

Le Tableau 30 montre que, quelle que soit la bactérie testée, l'augmentation de la teneur en acide stéarique diminue significativement les pourcentages d'inhibition des films, avec un plateau au-delà de 30 % en acide stéarique. Plus du tiers de l'activité anti-bactérienne résiduelle des films est perdue entre 10 et 30 % en acide stéarique. Une interaction entre la nisine et l'acide stéarique semble donc être responsable de la perte d'activité anti-bactérienne des films.

Pour étudier plus finement ces interactions, des gammes de concentrations en nisine comprises entre  $5 \cdot 10^3$  et  $10^5$  et des pourcentages d'acide stéarique compris entre 0 et 50 % sont testés sur *M. luteus*. Cette bactérie, comme précisé précédemment, est beaucoup plus sensible à la nisine que les *Listeria* ou les Staphylocoques, et peut être utilisée en tant que souche modèle pour détecter de faibles différences de diamètre d'inhibition, liées à de faibles variations en quantité de nisine désorbée du film. Les résultats sont donnés dans le Tableau 31.

Acide stéarique (%)	Nisine (UI.ml <sup>-1</sup> )			
	5 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
0	10 ± 1	11 ± 1	14 ± 2	14 ± 1
10	72 ± 25	79 ± 1	93 ± 5	97 ± 12
20	67 ± 14	74 ± 7	94 ± 10	96 ± 8
30	54 ± 20	68 ± 16	86 ± 13	89 ± 7
40	51 ± 9	68 ± 11	82 ± 8	84 ± 10
50	-	74 ± 7	57 ± 20	70 ± 27

**Tableau 31 : Activité anti-bactérienne sur *M. luteus* de films contenant différentes teneurs en acide stéarique et en nisine. Les données à 0 % d'acide stéarique correspondent à des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les autres résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux films sans composé lipidique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

Les résultats montrent, comme précédemment, que l'activité anti-bactérienne des films diminue avec l'augmentation du pourcentage en acide stéarique. De plus, à teneur égale en acide stéarique, l'activité anti-bactérienne augmente avec l'élévation de la concentration en nisine.

### III Activité anti-bactérienne d'enrobages composites

Afin de conforter les résultats préalablement obtenus et étudier l'activité anti-bactérienne des enrobages composites, un dénombrement bactérien a été mis en place. Des enrobages composites, contenant 0 ou 15 % en acide stéarique et 5.10<sup>3</sup> ou 10<sup>4</sup> UI.ml<sup>-1</sup> de nisine, sont déposés à la surface de boîtes de Petri préalablement inoculées à hauteur de 20-30 ou 150-200 UFC par boîte (*L. innocua* ou *S. aureus*). Les pourcentages d'inhibition, calculés après énumération microbienne, sont donnés dans le Tableau 32.

	UFC/boite	Enrobage contenant de la nisine (UI.ml <sup>-1</sup> )					
		Nisine en solution		0 % acide stéarique		15 % acide stéarique	
		5 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
<i>L. innocua</i>	19 ± 2	1 0 0 % d ' i n h i b i t i o n					
	138 ± 15	35 ± 4	40 ± 9	67 ± 12	67 ± 11	19 ± 4	33 ± 13
<i>S. aureus</i>	24 ± 7	56 ± 9	87 ± 12	100 ± 0	92 ± 16	79 ± 16	97 ± 4
	184 ± 42	58 ± 11	82 ± 5	100 ± 0	100 ± 0	78 ± 6	99 ± 1

**Tableau 32 : Activité anti-bactérienne sur *L. innocua* et *S. aureus* d'enrobages contenant 0 ou 15 % en acide stéarique et 5.10<sup>3</sup> ou 10<sup>4</sup> UI.ml<sup>-1</sup> en nisine, comparée à celle de solution de nisine. Les résultats sont donnés en pourcentage d'inhibition par rapport aux boites témoins et sont la moyenne de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

A des charges microbiennes faibles en *L. innocua* (19 UFC/boite), l'inhibition est totale et ce quelle que soit la teneur en acide stéarique ou en nisine, et que ce soit en solution de nisine ou sous forme d'enrobage. Avec une charge bactérienne supérieure, l'activité anti-bactérienne augmente faiblement entre 5.10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> UI.ml<sup>-1</sup>. Cependant, une différence significative est obtenue entre l'inhibition en solution et celle en enrobage. L'enrobage à base d'HPMC semble améliorer les propriétés anti-bactériennes, par probablement :

- ✓ Une meilleure concentration de la nisine à la surface du gel pour l'enrobage, contrairement à une diffusion rapide de la nisine vers le cœur du gel lorsque la nisine est amenée sous forme de solution.
- ✓ Ou encore une limitation des transferts de gaz et particulièrement les transferts de dioxygène. Par synergie avec la nisine, les emballages seraient ainsi plus actifs sur des bactéries aéro-anaérobies facultatives.

Enfin, lorsque l'acide stéarique entre dans la composition de l'enrobage, l'activité anti-microbienne chute de façon significative, confirmant les résultats déjà obtenus en zone d'inhibition.

Pour *S. aureus*, les résultats sont similaires, avec une activité anti-bactérienne qui augmente en élevant la concentration en nisine et qui diminue après incorporation d'acide gras.

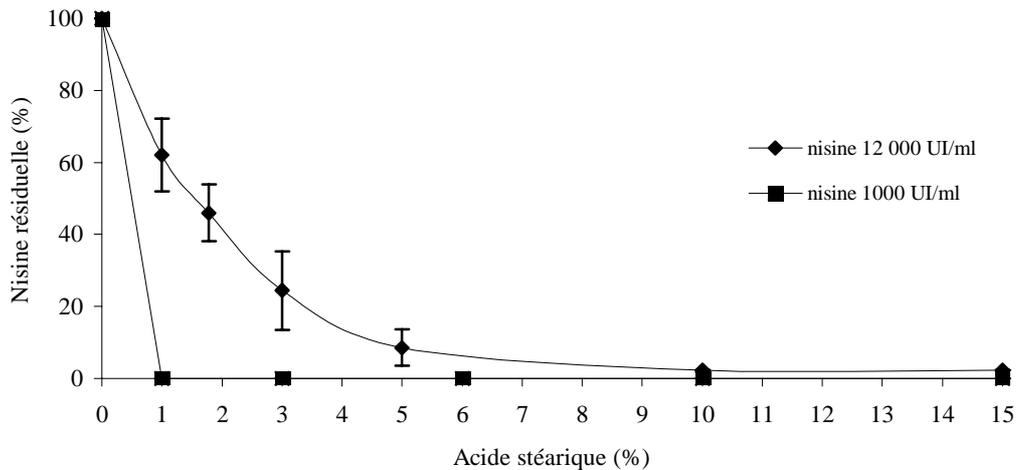
L'addition d'acide stéarique, dans le but d'améliorer les propriétés barrière du film à la vapeur d'eau, semble conduire à des films faiblement actifs. Des effets similaires ont été rapportés par Jung *et al.* (1992) qui ont observé une chute de 88 % de l'activité de la nisine dans un système contenant 13 % en matière lipidique. De même, Dean et Zottola (1996) montrent que la nisine est plus active dans une crème glacée à 3 % en matière lipidique qu'à 10 %.

Dans la suite du travail, l'étude des interactions entre acide stéarique et nisine va être menée pour tenter d'améliorer l'activité anti-bactérienne des films composites, en défavorisant les interactions entre la nisine et les constituants du film.

## **IV Analyse des interactions entre la nisine et l'acide stéarique**

### **IV.1 Etude des interactions entre la nisine et l'acide stéarique**

Les expériences présentées plus haut ont montré, que ce soit par diamètre d'inhibition ou par dénombrement bactérien, que la nisine interagit spécifiquement avec l'acide stéarique. Cette interaction, mise en évidence en milieu de culture complexe, a été vérifiée en tampon phosphate pH 6,1 en présence uniquement de nisine et d'acide stéarique. La quantité d'acide stéarique à incorporer dans la solution tampon a été calculée à partir de la masse théorique d'HPMC à incorporer dans un volume de 40 ml. Les résultats, exprimés en quantité de nisine résiduelle libre, mesurée par le test colorimétrique BCA après filtration, sont donnés dans la Figure 51.



**Figure 51 : Variation du pourcentage de nisine résiduelle en fonction de la teneur en acide stéarique et pour deux concentrations en nisine ( $10^3$  et  $1,2 \cdot 10^4$  UI.ml<sup>-1</sup>). La nisine résiduelle est mesurée par kit BCA. Chaque valeur du graphique correspond à une moyenne de 3 répétitions et les intervalles de confiance sont schématisés par les barres verticales.**

Pour une concentration de  $10^3$  UI.ml<sup>-1</sup> et dès les plus faibles pourcentages en acide stéarique, le dosage BCA ne révèle pas de nisine résiduelle en solution. A la concentration supérieure de  $1,2 \cdot 10^4$  UI.ml<sup>-1</sup>, la nisine résiduelle diminue avec l'augmentation de la teneur en acide stéarique entre 0 et 5 %. Au-delà de 5 % en acide stéarique, la quantité en nisine résiduelle est proche de 0.

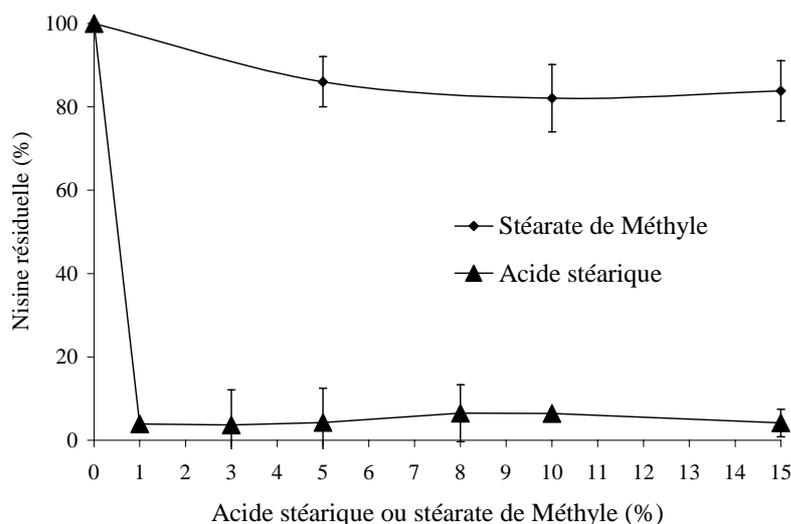
Deux types d'interactions peuvent intervenir entre la nisine et l'acide stéarique, à savoir interactions hydrophobes et/ou interactions électrostatiques. La nature hydrophobe de la bactériocine et la longueur de la chaîne alkyle de l'acide gras peuvent en effet être à l'origine d'interactions hydrophobes responsables de la diminution de l'activité inhibitrice du peptide bioactif.

Par ailleurs, sachant que le point isoélectrique de la nisine est compris entre 8 et 9, la nisine va se trouver majoritairement sous forme cationique dans nos conditions expérimentales (pH = 6,1) du fait de la protonation des fonctions amines primaires des résidus lysine et de l'extrémité N terminale (Breukink et De Kruijff, 1999 ; Lins *et al.*, 1999).

Pour que des interactions électrostatiques puissent expliquer la faible activité des matériaux composites, l'acide stéarique doit donc se trouver en majorité sous forme dissociée. Son insolubilité dans l'eau rend difficile la détermination de son pK<sub>a</sub>. Toutefois, les pK<sub>a</sub> des acides

carboxyliques encore solubles dans l'eau, dont la chaîne hydrogénocarbonée varie entre 2 et 8, sont compris entre 3,75 et 4,89, pour rester inférieur à 5 pour les acides de plus longues chaînes. Ainsi, à pH supérieur au  $pK_a$ , l'acide stéarique est majoritairement chargé négativement. En conséquence, les charges potentiellement positives de la nisine et négatives de l'acide stéarique dans nos conditions expérimentales et le caractère hydrophobe des deux molécules peuvent expliquer l'interaction nisine-acide stéarique, responsable de la faible activité biologique des films composites. Dans les deux cas, les sites actifs protonés de la nisine seraient masqués et la bactériocine serait incapable de se fixer sur les bactéries cibles et agir. Cette hypothèse d'interactions hydrophobes et électrostatiques est d'autant plus plausible que l'on sait que la nisine agit sur les bactéries cibles par formation de pores en deux étapes : interactions électrostatiques entre nisine cationique et phospholipides membranaires chargés négativement, puis interactions hydrophobes et insertion de la nisine dans la membrane des cellules cibles pour y former des pores transmembranaires (Abee, 1995 ; Driessen *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1996).

Afin d'avoir des informations sur l'importance des interactions hydrophobes, le stéarate de méthyle a été utilisé à la place de l'acide stéarique. Le stéarate de méthyle a la particularité d'avoir le même caractère hydrophobe que l'acide stéarique, sans avoir la possibilité de porter une charge négative du fait de l'estérification de la fonction acide carboxylique par un groupement méthyle. L'expérience a été conduite de la même manière que précédemment et la nisine résiduelle est quantifiée par dosage BCA (Figure 52).



**Figure 52 : Variation du pourcentage en nisine résiduelle en fonction de la teneur en acide stéarique ou en stéarate de méthyle et pour une concentration initiale en nisine de  $3 \cdot 10^3$  UI.ml<sup>-1</sup>. La nisine résiduelle est mesurée par kit BCA. Chaque point du graphique correspond à une moyenne de 3 répétitions et les intervalles de confiance sont schématisés par les barres verticales.**

La Figure 52 montre que le stéarate de méthyle interagit environ 5 fois moins avec la nisine que l'acide stéarique ( $p < 0,05$ ).

La mise en oeuvre de films contenant de l'acide stéarique ou du stéarate de méthyle a permis de vérifier ces résultats par mesure de l'activité anti-bactérienne sur *M. luteus* (Tableau 33).

Composés hydrophobes (%)	Acide stéarique	Stéarate de méthyle
0		10,0 ± 1,0
20	2,7 ± 0,4	9,0 ± 1,0
50	2,6 ± 0,6	7,9 ± 1,1

**Tableau 33 : Activité anti-bactérienne sur *M. luteus* de films contenant différentes teneurs en acide stéarique ou en stéarate de méthyle et  $5.10^3$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition après dépôt de disque de films (mm). Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.**

L'incorporation d'acide stéarique réduit de 70 % l'activité anti-bactérienne des films à base d'HPMC et de nisine, alors que l'incorporation de stéarate de méthyle n'a pas d'effet significatif sur cette propriété. A 20 % comme à 50 %, le film à base d'acide stéarique est 3 fois moins actif que le film contenant du stéarate de méthyle.

Par conséquent, il apparaît que l'interaction nisine-acide stéarique est majoritairement autre que hydrophobe.

Pour vérifier la nature électrostatique des interactions entre la nisine et l'acide stéarique, une méthode complémentaire pour vérifier que l'acide stéarique était majoritairement sous sa forme dissociée dans nos conditions expérimentales a été menée. Les interactions potentielles entre l'acide stéarique et un ion positif ont été appréhendées. Pour ce faire, nous avons dosé le calcium Ca<sup>2+</sup> résiduel dans une solution contenant différentes teneurs en ion calcium en présence de 15 % en acide stéarique. La quantité de calcium résiduelle est mesurée par absorption atomique et les résultats sont donnés dans le Tableau 34.

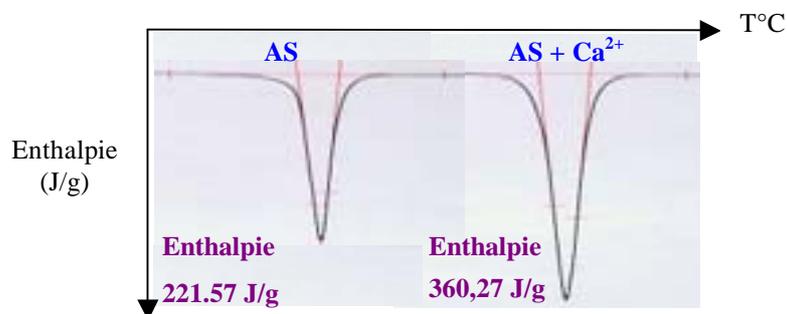
	Concentration en $\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{g.l}^{-1}$ )		
Teneur en $\text{Ca}^{2+}$ initiale	$7,95 \pm 0,27$	$3,78 \pm 0,13$	$1,77 \pm 0,13$
$\text{Ca}^{2+}$ résiduel après addition d'acide stéarique	$7,08 \pm 0,03$	$3,46 \pm 0,01$	$1,62 \pm 0,06$

**Tableau 34 : Variation de la quantité en calcium résiduel en fonction de 3 concentrations en calcium initiales et en présence de 25  $\text{g.l}^{-1}$  d'acide stéarique. Le calcium résiduel est mesuré par absorption atomique. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

Les teneurs en calcium résiduel, tout en étant significativement différentes des teneurs initiales, restent particulièrement élevées. En fonction de la quantité initiale en calcium, 89 % à 92 % en calcium résiduel sont retrouvés dans le mélange réactionnel.

L'acide stéarique interagit beaucoup moins avec l'ion calcium que ce qu'on aurait pu attendre, et aucune relation stœchiométrique n'a pu être établie. La différence de seulement une unité pH ( $\text{pK}_A$  (acide stéarique)  $\leq 5$  ;  $\text{pH}$  (solution tampon) =6,1) peut expliquer un équilibre entre forme chargée  $\text{AS-COO}^-$  et forme neutre  $\text{AS-COOH}$  qui donne une fixation partielle de l'ion calcium sur l'acide stéarique.

Une autre technique a alors été mise en œuvre. Après recristallisation, l'acide stéarique ayant été ou non mélangé avec des ions calcium ( $80 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a été étudié par analyse thermique différentielle (ATD) et la variation d'enthalpie a été quantifiée (Figure 53). Au cours de la fusion, l'échantillon absorbe une certaine quantité d'énergie calorifique, équivalente à une variation d'enthalpie (surface du pic), proportionnelle à un état



d'organisation.

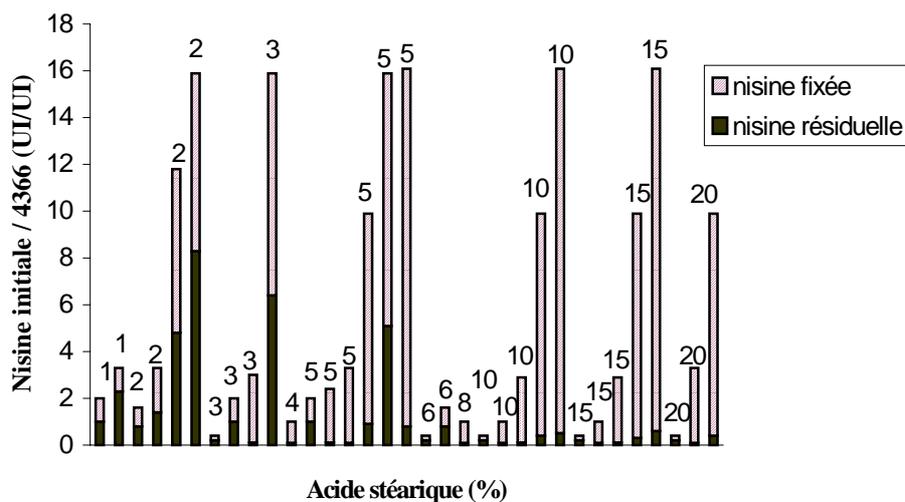
**Figure 53 : Enthalpie libre, calculée par ATD de cristaux d'acide stéarique purs, et ayant préalablement été mélangés au calcium en solution tampon pH 6,1.**

L'enthalpie de fusion est 40 % plus grande pour les cristaux qui ont été mis en contact avec le calcium (Figure 53). Cette augmentation d'enthalpie traduit une organisation plus rigide du réseau cristallin de l'acide stéarique en présence de calcium. Ce phénomène est sûrement due à la fixation des ions calcium sur des molécules d'acide stéarique de nature anionique, pour donner une conformation plus stable aux cristaux d'acide stéarique qui nécessitent une plus grande énergie de fusion pour fondre et se désorganiser.

En conclusion, l'acide stéarique est majoritairement chargé négativement, ce qui explique que la nisine interagisse électrostatiquement avec les molécules d'acide stéarique. Afin d'améliorer les propriétés anti-bactériennes des films, tout en les ayant des propriétés barrière à la vapeur d'eau satisfaisantes, un modèle d'interaction nisine-acide stéarique a été étudié afin de déterminer la quantité optimale en nisine, à ajouter à la solution filmogène contenant 15 % en acide stéarique. Parallèlement, deux voies de réduction de ces interactions, basés soit sur l'ajout de calcium, soit sur une variation de pH ont été mises en oeuvre.

#### IV.2 Modélisation des interactions entre la nisine et l'acide stéarique

Afin d'établir un modèle capable de prévoir la quantité de nisine résiduelle nécessaire à incorporer dans un film composite, plusieurs concentrations en nisine et en acide stéarique sont mises en solution en tampon phosphate pH 6,1 et la nisine résiduelle est mesurée par BCA (Figure 54).



**Figure 54 : Variation de la quantité en nisine en fonction de la teneur en nisine initiale (hauteur totale de l'histogramme) et du pourcentage en acide stéarique. La nisine est dosée par BCA. Les valeurs sont des moyennes d'au moins 3 répétitions.**

La lecture de la Figure 54 est simplifiée en divisant la concentration en nisine (z) par 4366 :

$$z = \frac{\text{concentration en nisine}}{4366}$$

avec  $4366 \text{ UI.ml}^{-1}$  correspondant à la quantité de nisine fixée par 1 % en acide stéarique (y).

Ainsi, la Figure 54 montre que l'augmentation des pourcentages en acide stéarique diminue les teneurs en nisine résiduelle pour atteindre des teneurs très faibles pour les hauts pourcentages en lipide. La quantité de nisine résiduelle dépend à la fois de la nisine initiale et de l'acide stéarique introduit dans la solution.

Un modèle basé sur une régression linéaire multifactorielle a été mis en œuvre et les données ont été traitées par le programme statistique Statgraphic 4.1 (Sigma-plus). Un niveau de signification égale à 95 % de probabilité a été choisi pour cette étude. L'analyse des effets des facteurs y, z, yy et zz et de leurs interactions yz montrent que tous les facteurs et leurs effets sont significativement différents de 0 ( $p < 0,05$ ) à l'exception de l'interaction zz qui était à la limite de la signification statistique. Un modèle a été établi donnant l'équation suivante:

$$\text{Nisine résiduelle} = 0.615 - 0.247 * y + 0.323 * z + 0.013 * y^2 - 0.027 * y * z$$

Le coefficient de corrélation  $R^2$  à peine supérieur à 80 % était certes faible, mais il a été vérifié par dépôt de disques de films sur souches bactériennes et a donné une très bonne approximation. Une concentration en nisine de  $10^5 \text{ UI.ml}^{-1}$  doit être introduite dans un film composite contenant 15 % en acide stéarique pour avoir une activité inhibitrice résiduelle du film égale à  $5.10^3 \text{ UI.ml}^{-1}$ .

Comme cette haute concentration entraîne un surcoût important du film, des expériences complémentaires ont été menées afin de réduire la part en nisine en tentant de diminuer les interactions entre la nisine et l'acide stéarique.

### IV.3 Réduction des interactions entre la nisine et l'acide stéarique

#### IV.3.1 Par ajout d'ions calcium

La possibilité de saturation des sites anioniques de l'acide stéarique par le calcium a été envisagée afin de réduire, par compétition, les interactions établies entre la nisine et l'acide

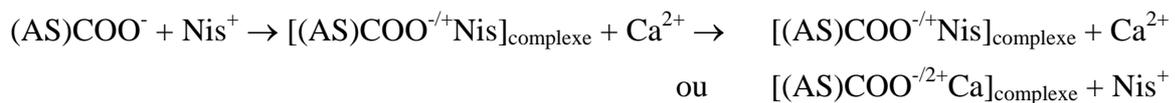
gras. La compétition potentielle entre les deux composés cationiques ( $\text{Ca}^{2+}$  et nisine- $\text{Nis}^{+-}$ ) pour la fixation sur la molécule d'acide stéarique a été tout d'abord testée en solution tampon phosphate. La nisine résiduelle est mesurée par BCA.

La concentration de  $8 \text{ mg.l}^{-1}$  en calcium a été choisie de façon à saturer théoriquement l'ensemble des sites  $\text{COO}^-$  des molécules d'acide stéarique.

Trois types d'expériences ont été menés, et les résultats sont donnés dans le Tableau 35.

### Cas 1.

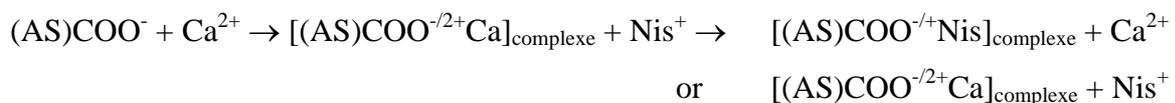
La nisine a été mise en contact avec l'acide stéarique avant l'incorporation de calcium. La capacité du calcium à remplacer la nisine ayant interagi sur les molécules d'acides stéariques est ainsi évaluée :



A  $8 \text{ mg.l}^{-1}$  de calcium, l'acide stéarique fixe plus de 97 % de la nisine initiale. L'addition de calcium ne permet pas de diminuer les interactions entre nisine et acide stéarique (Tableau 35).

### Cas 2.

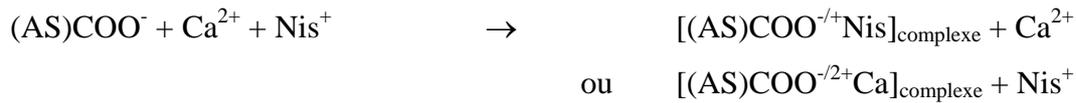
L'acide stéarique a été ensuite mis en contact avec le calcium avant addition de nisine.



La comparaison des cas 1 et 2 montre que l'addition de calcium à  $8 \text{ mg.l}^{-1}$  avant d'introduire la nisine ne diminue pas les interactions de la nisine avec l'acide stéarique ( $p < 0,05$ ). Une fixation de l'ordre de 96 % de la nisine sur l'acide stéarique est encore observée (Tableau 35).

### Cas 3.

Enfin, les trois composés nisine-ion calcium-acide stéarique sont introduits simultanément et la nisine résiduelle est mesurée par BCA :



La comparaison des cas 1, 2 et 3 montre que le mélange simultané des trois composés réduit significativement les interactions nisine-acide stéarique ( $p < 0,05$ ). Mais encore une fois, seul 8 % de la nisine initialement introduite est libre (Tableau 35).

		Concentration en nisine résiduelle (UI.ml <sup>-1</sup> )	
		Ca <sup>2+</sup> (8 mg.l <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup> (80 mg.l <sup>-1</sup> )
Cas 1	$[(AS)COO^{-/+}Nis]_{\text{complexe}} + Ca^{2+}$	370 ± 40	(1,60 ± 0,11). 10 <sup>5</sup>
Cas 2	$[(AS)COO^{-/2+}Ca]_{\text{complexe}} + Nis^+$	590 ± 140	(1,60 ± 0,11). 10 <sup>5</sup>
Cas 3	$(AS)COO^- + Ca^{2+} + Nis^+$	1120 ± 160	(1,60 ± 0,11). 10 <sup>5</sup>

**Tableau 35 : Interaction nisine-acide stéarique en présence de 8 ou de 80 mg.l<sup>-1</sup> de calcium. La nisine initiale est de (1,77 ± 0,20).10<sup>5</sup> UI.ml<sup>-1</sup> et la nisine résiduelle est quantifiée par BCA. Les valeurs sont des moyennes de 6 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.**

En conclusion, l'addition de calcium à 8 mg.l<sup>-1</sup> ne prévient guère la fixation de la nisine sur l'acide stéarique. Une plus grande concentration en ion calcium égale à 80 mg.l<sup>-1</sup> a été testée et les résultats sont donnés dans le Tableau 35. A cette concentration, l'addition de calcium réduit quasi-totalement l'interaction entre la nisine et l'acide stéarique et ce quel que soit l'ordre d'addition des composés. Dans les cas 2 et 3, à 80 mg.l<sup>-1</sup>, le calcium empêche la nisine de se fixer sur l'acide stéarique. Dans le cas 1, le calcium remplace la nisine pour saturer les sites anioniques de l'acide gras.

Il faut donc un excès en calcium pour observer un effet favorable sur la diminution des interactions entre nisine et acide stéarique.

Cette potentialité à réduire les interactions nisine-acide stéarique a été vérifiée par mesure de l'activité anti-bactérienne sur *L. monocytogenes*, et les résultats sont donnés dans le Tableau 36.

	Films à $5.10^4$ UI.ml <sup>-1</sup> en nisine		
	0 % acide stéarique	15 % acide stéarique	
		Sans Ca <sup>2+</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup> en Ca <sup>2+</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	7 ± 1	4 ± 1	4 ± 1

**Tableau 36 : Activité anti-bactérienne sur *L. monocytogenes* de films contenant 0 ou 15 % en acide stéarique et 0 ou 80 mg.ml<sup>-1</sup> de calcium. Les données représentent des diamètres de zones d’inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.**

Dans le cas d’ajout ou non d’ions calcium, l’acide stéarique à 15 % réduit de plus de 43 % l’activité anti-bactérienne du film sur *L. monocytogenes* (Tableau 36). L’addition d’ions calcium, même en excès (80 mg.l<sup>-1</sup>), ne parvient pas à améliorer l’activité anti-bactérienne des films composites. Le calcium semble alors avoir une action sur l’activité inhibitrice propre de la bactériocine. En effet, les ions calcium pourraient intervenir au niveau de la membrane bactérienne en neutralisant les charges négatives des phospholipides membranaires, ce qui empêcherait la nisine de se fixer sur la membrane de *L. monocytogenes* et agir. Cette hypothèse semble être confortée par les travaux de Gupta (1969), qui a observé une diminution de l’activité anti-bactérienne de la nisine sur *M. flavus* en présence d’ions divalents tels que le magnésium Mg<sup>2+</sup> ou le calcium Ca<sup>2+</sup> et d’ions monovalents tels que le sodium Na<sup>+</sup>. De même, Abee *et al.*, (1994) et Bhunia *et al.*, (1991) ont montré que certains cations divalents comme le Ca<sup>2+</sup> et le Mg<sup>2+</sup> diminuent l’action de la nisine vis-à-vis de *L. monocytogenes* et de la pédiocine AcH vis à vis de *Lb. plantarum* en se liant aux phospholipides membranaires de la cellule cible chargés négativement. La neutralisation de ces charges induirait la condensation des lipides, ce qui aurait pour effet de rendre la membrane plus rigide et par conséquent les bactéries plus résistantes aux bactériocines.

L’addition de calcium, tout en ayant le potentiel de diminuer les interactions entre acide stéarique et nisine, ne parvient donc pas à améliorer l’activité des films.

L’autre voie étudiée est basée sur l’influence de la variation de pH sur la forme dissociée ou non de l’acide stéarique.

### IV.3.2 Par diminution du pH

Afin de défavoriser la dissociation de l'acide stéarique, le pH de la solution filmogène a été fixé à une valeur inférieure au  $pK_a$ . L'influence du pH sur les propriétés anti-bactériennes des films a été étudiée sur *M. luteus* par la technique des disques (Tableau 37).

	pH	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Film sans matière lipidique	8	12 ± 1
	7	7 ± 2
Film composite	5	8 ± 0
	3	12 ± 2

**Tableau 37 : Activité anti-bactérienne sur *M. luteus* de films composites contenant 15 % en acide stéarique. Le pH de la solution filmogène est fixé à pH 3, 5 et 7 avant addition d'acide stéarique et de nisine à  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup>. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance.**

Les diamètres d'inhibition obtenus montrent que la diminution du pH de formation des films composites permet d'améliorer leur activité anti-bactérienne. Une inhibition équivalente entre films sans lipide et films composites est obtenue à pH 3. A ce pH, aucune interaction entre nisine et acide stéarique ne semble intervenir, induisant par conséquent une activité anti-bactérienne optimale.

En conclusion, le film composite à bas pH (= 3) est un bon compromis pour disposer d'un film à la fois anti-microbien et barrière à la vapeur d'eau.

## V Activité anti-bactérienne des films réticulés imprégnés

La mise en œuvre de la réticulation par l'acide citrique n'a pas permis de maintenir une activité anti-bactérienne du film, du fait du choc thermique nécessaire à la modification chimique de l'HPMC.

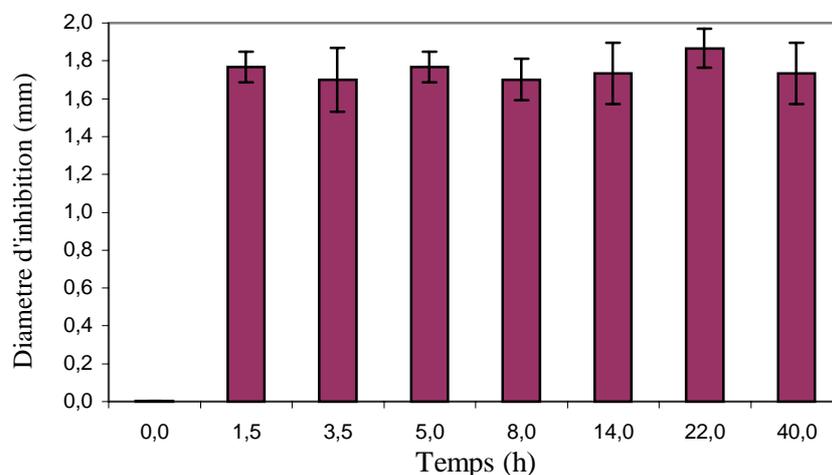
Pour pouvoir exploiter les films réticulés et les films composites réticulés, qui ont donné des propriétés mécaniques et barrière à la vapeur d'eau intéressantes, tout en étant totalement insolubles dans l'eau, il était nécessaire de mettre en œuvre un moyen leur conférant une

activité anti-bactérienne. L'imprégnation de films déjà réticulés dans des solutions de nisine a alors été envisagée. Des techniques d'adsorption de molécules anti-bactériennes ont déjà été développées pour l'élaboration d'emballages actifs. Scannell *et al.* (2000) ont par exemple adsorbé la lacticine et la nisine à la surface de papier cellulosique ou de poches plastiques par immersion. L'activité anti-bactérienne a été validée sur produit alimentaire avec une réduction de plus de 2 log pour *L. innocua* et presque 1,5 log pour *S. aureus*.

Une imprégnation des films réticulés durant 40 h dans une solution de  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine a été conduite selon la méthode de Scannell *et al.* (2000). Une activité anti-bactérienne correspondant à 15 mm de diamètre d'inhibition sur *M. luteus* a été obtenue. Ce diamètre d'inhibition équivaut à celui des films non réticulés incorporant  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine.

La technique d'imprégnation permettrait donc de conférer une activité anti-bactérienne aux films modifiés chimiquement.

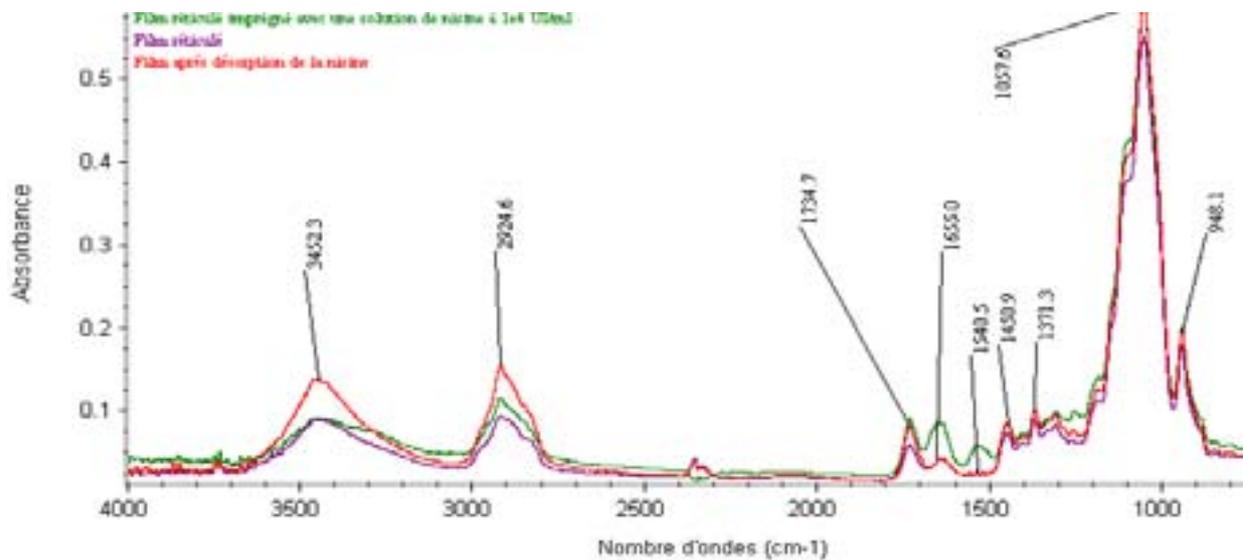
Des essais préliminaires ont été menés pour réduire le temps d'imprégnation et rendre concevable une adaptation industrielle. Les diamètres d'inhibition de films imprégnés ont été étudiés en fonction du temps d'imprégnation afin de réduire la durée de la technique (Figure 55).



**Figure 55 : Variation du diamètre d'inhibition de films imprégnés à  $10^4$  UI.ml<sup>-1</sup> de nisine en fonction du temps et sur *M. luteus*. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions et les barres verticales représentent les intervalles de confiance.**

Les résultats de la Figure 55 montrent que l'imprégnation est optimale pour des temps à partir de 1,5 h. Selon Appendini et Hotchkiss (2002), les protéines ont une forte capacité d'adsorption sur les bioemballages du fait de leur caractère amphiphile. Ils ajoutent que l'activité anti-bactérienne des films imprégnés augmente avec l'hydrophilie de la matrice polymérique.

L'analyse par IRTF en ATR des films imprégnés a permis de vérifier l'adsorption de la nisine à la surface du film (Figure 56).



**Figure 56 : Spectres obtenus en analysant par IRTF en ATR des films réticulés, réticulés imprégnés et réticulés après désorption.**

L'aire de la plage 1700-1200  $\text{cm}^{-1}$ , avec des bandes spécifiques de la nisine vers 1655  $\text{cm}^{-1}$  (vibration des liaisons peptidiques CO-NH) et l'apport des chaînes hydrogénéocarbonées par la nisine vers 1460 et 1370  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations asymétriques des liaisons CH des groupements méthyles) est supérieure pour le film réticulé imprégné par rapport au film témoin non imprégné.

L'imprégnation de films réticulés et de films composites réticulés dans une solution à  $10^4$   $\text{UI.ml}^{-1}$  de nisine a été conduite et les résultats d'activité inhibitrice sur *M. luteus* sont proposés dans le Tableau 38.

	Film imprégné	Film après désorption de la nisine	Solution de désorption
<b>Film réticulé</b>			
<b>Film composite réticulé</b>	15 ± 2	7 ± 1	10 ± 1

**Tableau 38 : Activité anti-bactérienne sur *M. luteus* de films réticulés ou composites réticulés après 2 h d'imprégnation dans une solution à 10<sup>4</sup> UI.ml<sup>-1</sup> de nisine, désorbés et de la solution de désorption. Les données représentent des diamètres de zones d'inhibition (mm) après dépôt de disque de films ou de test de solution de nisine en puits. Les résultats sont des moyennes de 3 répétitions suivies de leurs intervalles de confiance (p=95 %).**

Le diamètre d'inhibition des films imprégné est égal à celui des films non réticulés incorporant 10<sup>4</sup> UI.ml<sup>-1</sup> de nisine.

Par ailleurs, il n'y a pas de différence en terme d'activité anti-bactérienne entre le film réticulé imprégné et le film composite réticulé imprégné. Aucune interaction entre nisine et acide stéarique n'est observée. L'interaction chimique de l'acide stéarique avec la matrice filmogène et le faible pH du film réticulé (2,6) favorisant la forme neutre non dissociée de l'acide stéarique (pH < pK<sub>A</sub>) sont sûrement à l'origine de ces résultats.

L'analyse des diamètres d'inhibition de films après désorption et des solutions de désorption montre que le film libère plus de 67 % de la nisine adsorbée tout en gardant une certaine activité résiduelle. Ce maintien d'activité anti-bactérienne à la surface d'un aliment est très important, car le film permet ainsi de protéger essentiellement en surface, zone très sensible à l'attaque bactérienne.

## VI Conclusion

Quatre films anti-microbiens ont été obtenus en fonction de la composition et des conditions de fabrication mises en oeuvre :

- Le film à base de cellulose présente une bonne activité anti-bactérienne.
- Le film composite a montré des interactions électrostatiques fortes entre la nisine cationique et l'acide stéarique anionique. Ces interactions réduisent l'activité anti-bactérienne des films. La réduction du pH limite ces interactions et permet l'élaboration d'un bioemballage anti-bactérien.

- La réticulation s'est avérée impropre à la conception de films anti-bactériens par incorporation de bactériocine. L'imprégnation de films réticulés et de films composites réticulés a montré cependant des résultats intéressants en conférant aux films une activité anti-bactérienne équivalente aux films à base d'HPMC non réticulés et incorporant la nisine.

Enfin, l'efficacité anti-bactérienne de ces films dépendra en alimentaire de l'activité de la bactériocine, de la sensibilité des souches à la nisine et surtout de la diffusion de la molécule au sein des produits alimentaires.

Dans la dernière partie de ce travail, la diffusion de la nisine dans des gels d'agarose modèles a ainsi été étudiée en analysant en particulier les effets de la teneur en matière sèche, en lipides, ainsi que l'influence du temps de contact et de la température de diffusion.

# RESULTATS ET DISCUSSION

## partie 4

Outre la sensibilité des souches indésirables ou pathogènes aux bactériocines, l'activité anti-bactérienne des films dépend beaucoup de la capacité de diffusion de la nisine dans l'aliment et des conditions physico-chimiques du produit alimentaire. Le pH, l' $a_w$ , la force ionique, la température et la composition de l'aliment (protéines, lipides) sont autant de facteurs capables d'influencer la diffusion de la nisine et par là-même son activité anti-bactérienne.

Comme la diffusion des molécules dans un aliment est lente, et d'autant plus complexe que la structure de l'aliment est hétérogène, l'étude de la diffusion de la nisine a alors été réalisée dans une matrice simple à base d'agarose. Ce polymère a aussi la particularité d'être non chargé, ce qui ne devrait pas perturber la diffusion de la nisine par l'intervention d'interactions électrostatiques.

Un modèle Fickien a été établi puis utilisé pour étudier la diffusion apparente de la nisine en gel d'agarose.

La diffusion de la nisine a été appréhendée en étudiant l'effet des facteurs concentration en nisine dans la solution de diffusion, durée, température de diffusion, teneur en agarose, teneur et nature des lipides introduits dans la matrice du gel.

## **I Résultats préalables**

### **I.1 Méthode d'extraction de la nisine du gel d'agarose**

L'extraction de la nisine des gels puis son dosage ont été les deux premières étapes limitantes dans l'étude de la diffusion de la nisine. Plusieurs auteurs évoquent les difficultés d'extraction et d'analyse de peptides à partir de matrices complexes, et identifient comme paramètres importants : le moyen de broyage mis en œuvre, la température, le temps d'homogénéisation et le ratio échantillon/diluant (Bican *et al.*, 1994 ; Lee, 1996).

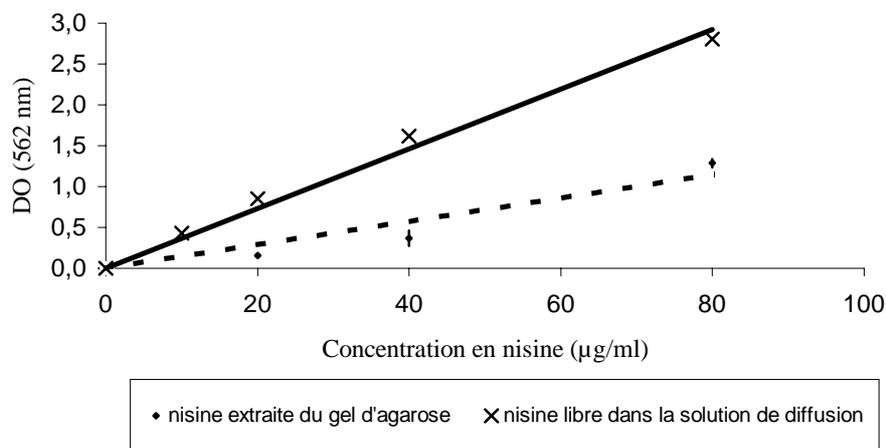
Deux procédés d'extraction, issus de ces différents travaux, ont été comparés. Dilué au demi dans de l'eau ultrapure, l'échantillon est soit broyé à l'Ultraturax 5 min à vitesse rapide, puis est homogénéisé 1 h à 40 °C avant d'être filtré sur membrane, soit il est broyé manuellement au mortier et est homogénéisé 15h à 4°C avant d'être filtré.

Entre ces deux protocoles, seul le broyage au mortier associé à un entreposage des échantillons 15 h à 4 °C a permis d'établir une corrélation satisfaisante et significative ( $p < 0,05$ ) entre l'absorbance (562 nm) (dosage BCA) et la concentration en nisine extraite du gel d'agarose.

## I.2 Etablissement des droites étalons

Des gammes de concentration en nisine de 0 à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ont été mises en œuvre pour établir des droites de corrélation reliant proportionnellement la  $\text{DO}_{562\text{nm}}$  mesurée par BCA et les concentrations soit en nisine libre solubilisée dans du HCl 0,01M, soit en nisine extraite à partir de gels préalablement fabriqués avec des concentrations connues en nisine. Les résultats sont donnés dans la Figure 57.

L'établissement d'une droite étalon pour des solutions de nisine libre diluée en tampon HCL 0,01M nous sert de témoin pour calculer le rendement d'extraction.



**Figure 57 : Droite étalon du dosage par BCA de solution de nisine et de nisine extraite des gels d'agarose. Les droites sont des moyennes de 9 répétitions, et les intervalles de confiance sont représentés par les barres verticales.**

Des coefficients de corrélation supérieurs à 99 et 94 % sont déterminés respectivement pour la nisine libre et après extraction.

Le rapport des pentes des deux droites donne un rendement d'extraction de la nisine à partir d'un gel d'agarose à 3 % en matière sèche, égal à 43 %.

Ce rendement, obtenu dans nos conditions expérimentales, reste tout de même faible et a constitué dans notre étude une difficulté non négligeable.

Par ailleurs, ce protocole d'extraction a été ensuite validé pour les gels à plus hautes teneurs en agarose et/ou incorporant des lipides, et la même droite étalon peut ainsi être utilisée dans tous les cas de diffusion et quelle que soit la composition du gel. Cependant, malgré des

différences non significatives ( $p < 0,05$ ), les essais montrent tout de même que l'extraction de la nisine est d'autant plus difficile que le gel contient d'avantage d'agarose ou de lipides.

### I.3 Détermination de la concentration d'équilibre dans le gel

Des tranches de gel de 1 mm d'épaisseur ont été immergées dans des solutions de nisine à différentes concentrations et à des températures de 5 et 23 °C. Après 6 jours d'immersion, la concentration à l'équilibre est obtenue : la concentration en nisine dans le gel est égale à la concentration en nisine en solution. En conséquence, pour l'ensemble des expériences présentées ci-dessous, après au moins 6 jours de diffusion à 5 °C, la concentration en nisine dans le gel à  $x=0$  peut être considérée égale à la concentration en nisine dans la solution de diffusion, soit :

$$C_{sol}^* = C_{sol}$$

avec  $C_{sol}$  : Concentration en nisine de la solution rapportée au volume total de gel (en  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de gel) et  $C_{sol}^*$  : concentration d'équilibre en nisine dans le gel à  $x=0$  ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

### I.4 Vérification de la condition à la limite

La choix du modèle du mur semi-infini implique une condition à la limite (en  $x=0$ ) constante tout au long de l'expérience (pour tout  $t$  supérieur ou égal à 0). Pour vérifier que cette condition était bien obtenue, chaque jour, des prélèvements dans la solution de diffusion ont été réalisés. Pour chaque prélèvement, la nisine était dosée au BCA. Quelle que soit l'expérience de diffusion, les résultats ont montré qu'aucune variation significative de la concentration en nisine dans la solution n'était observée ( $C_{init} = \text{constante}$ ).

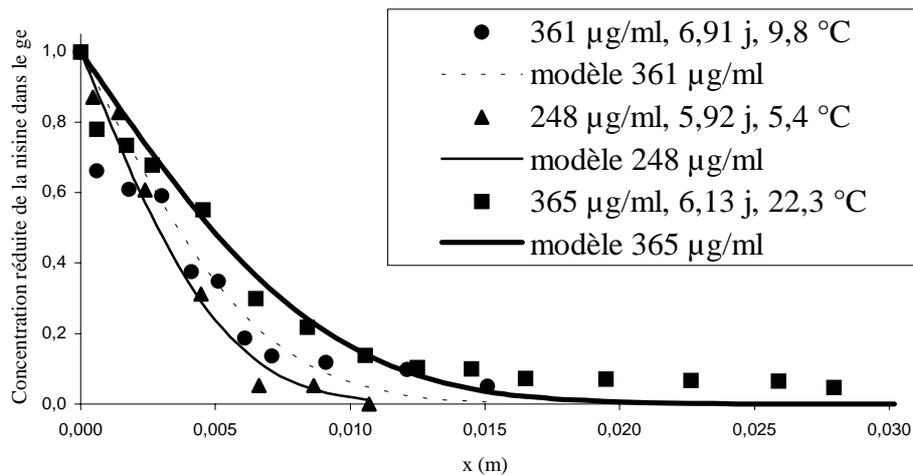
## II Identification du coefficient de diffusion apparent de la nisine en gel d'agarose et validation du modèle

### II.1 Identification du coefficient de diffusion de la nisine en gel d'agarose

La nisine, comme toute molécule, est soumise lors de sa diffusion à un double mécanisme physico-chimique et thermodynamique. Sa diffusivité peut être influencée entre-autre par le temps de diffusion, la température et la concentration en nisine dans la solution diffusante.

Pour bien encadrer le phénomène de diffusion de la nisine, et tenir ainsi compte des différents facteurs pouvant influencer la diffusion de la bactériocine, l'identification du paramètre  $D$  a été conduite à trois températures différentes (5, 10 et 22 °C), à 6 et 12 jours de diffusion et à différentes concentrations en nisine dans la solution diffusante (248, 326 et 365  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

L'influence des divers paramètres sur le coefficient de diffusion de la nisine dans le gel d'agarose à 3 % a été évaluée et les résultats sont donnés dans la Figure 58 et dans le Tableau 39.



**Figure 58 : Influence des divers paramètres (température, temps et concentration en nisine dans la solution) sur la diffusion de la nisine dans un gel d'agarose à 3 %. Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.**

Les concentrations en nisine ont été réduites dans un souci de comparaison des essais les uns avec les autres, sachant que l'on n'avait pas les mêmes concentrations en nisine dans les solutions diffusantes entre les différents essais (cf. matériels et méthodes).

Conditions expérimentales		Température (°C)	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Erreur moyenne ( $\bar{e}$ %)	Nombre de Fourier
C <sub>sol</sub> * (μg.ml <sup>-1</sup> )	Temps (j)				
248	5,9	5,4	1,75 x 10 <sup>-11</sup>	1,4	0,01
326	11,6	10,2	2,50 x 10 <sup>-11</sup>	1,8	0,02
365	5,9	22,3	5,03 x 10 <sup>-11</sup>	1,5	0,02

**Tableau 39 : Coefficient de diffusion apparent de la nisine en gel d'agarose à 3 %. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.**

Les courbes (Figure 58) montrent tout d'abord que les profils de concentration modélisés représentent correctement les expériences. Les faibles valeurs des écarts moyens  $\bar{e}$  (%) inférieures à 1,8 % montrent une bonne correspondance entre les profils expérimentaux et calculés (Tableau 39).

Les nombres de Fourier égaux à 0,01 et 0,02 sont inférieurs à 0,05, ce qui confirme le caractère semi-infini du système étudié.

Les coefficients de diffusion ainsi identifiés varient entre 1,75 et 5,03x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> (Tableau 39). Ces coefficients sont inférieurs à ceux rapportés dans la littérature. En effet, Geurts *et al.* (1974) et Turhan (1996) ont estimé la diffusion de molécules de sel dans le fromage respectivement à 23x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> et 51x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> à 20 °C. Giannakopoulos et Guilbert (1986a) ont quant à eux calculé un coefficient de diffusion apparent pour l'acide sorbique dans un gel d'agar (1,5 % p/p) de 90x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> à 25 °C. A cette même température, Gros et Ruëg (1987) ont déterminé un coefficient de diffusion pour le sel en gel d'agar (3 % p/p) égal à 140x10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Certes, les coefficients de diffusion obtenus par ces auteurs sont supérieurs à nos coefficients de diffusion pour la nisine. Cependant, la différence entre la taille des molécules, la structure de la matrice du gel, la teneur en matière sèche et la différence des températures expliquent aisément ces résultats.

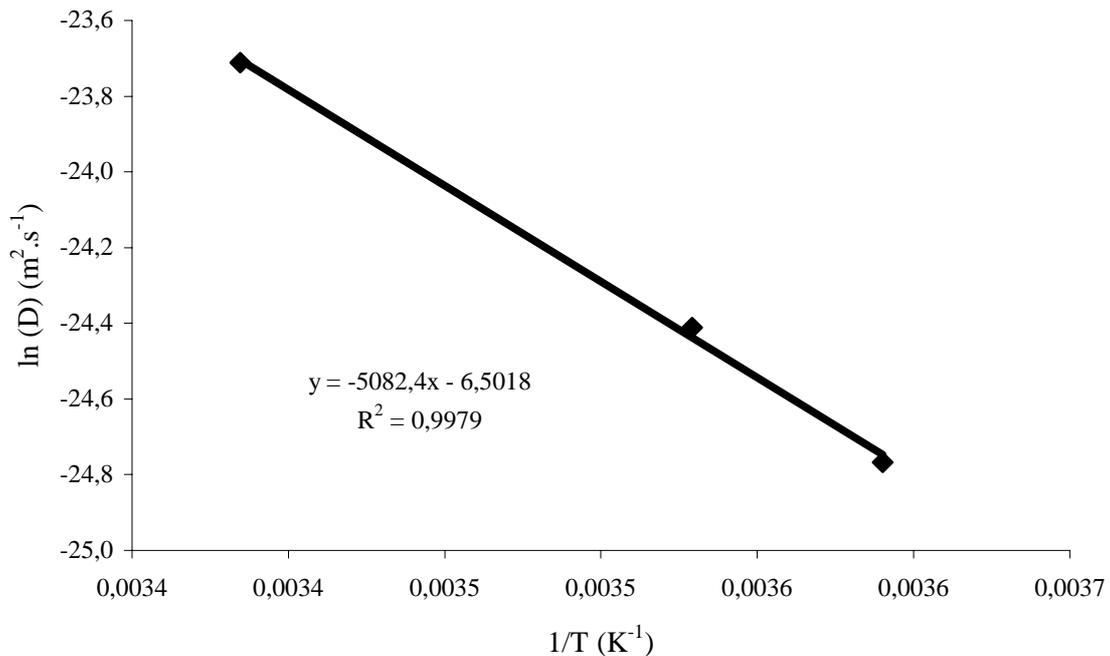
En effet, la nisine est un polypeptide de 34 acides aminés, avec un poids moléculaire de 3488 g.mol<sup>-1</sup> (Delves-Broughton *et al.*, 1996). D'une part, il est facilement concevable que la diffusion de la nisine soit inférieure à celle du sel NaCl (58,5 g.mol<sup>-1</sup>) ou de l'acide sorbique (112 g.mol<sup>-1</sup>) de plus petites tailles. D'autre part, les matrices de diffusion à base d'agar sont connues pour être moins denses, plus désorganisées et chargées négativement par rapport à la matrice d'agarose, ce qui a tendance à accélérer la diffusion (Hirota *et al.*, 2000).

Schwartzberg et Chao (1982) ont rapporté que la diffusion diminue quand le poids moléculaire augmente. Ces résultats sont d'autant plus cohérent que l'équation de Stokes-Einstein montre que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon des molécules diffusantes (Loncin, 1980).

Par ailleurs, les coefficients de diffusion augmentent avec la température,  $\ln(D)$  a été tracé en fonction de  $1/T$  pour vérifier si la variation des coefficients de diffusion en fonction de la température respecte la loi d'Arrhenius, dont l'équation est la suivante :

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1)$$

où  $E_a$  est l'énergie d'activation,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température (Kelvin). Les résultats sont donnés dans la Figure 59.



**Figure 59 : Variation du coefficient de diffusion  $\ln(D)$  en fonction de la température ( $1/T$ ).**

Un coefficient de corrélation supérieur à 99 % montre que la diffusion de la nisine satisfait correctement la loi d'Arrhenius (Figure 59). L'énergie d'activation  $E_a$  et  $D_0$  sont égaux respectivement à  $42,28 \text{ kJ.mol}^{-1}$  et  $1,50 \times 10^{-3} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ .

L'influence de la température a été observée par de nombreux auteurs. Biquet et Guilbert (1986) observent que la diffusivité de l'eau augmente avec la température. L'équation

d'Arrhenius a été validée et des énergies d'activation égales à  $20 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ont été calculées. Bayarri *et al.* (2001) ont rapporté des coefficients de diffusion en agar ou en K-Carraghénane de saccharose et d'aspartame à  $37 \text{ °C}$  égaux à  $7,7 \times 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ . Ces coefficients de diffusion diminuent quand la température baisse à  $5 \text{ °C}$  et ne sont plus que de  $2,47 \times 10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ .

Gros et Ruëg (1987) ont obtenu une énergie d'activation de  $16 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour la diffusion de sel en gel d'agar. Giannakopoulos et Guilbert (1986a) rapportent des valeurs de  $18 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour la diffusion de l'acide sorbique dans un gel équivalent.

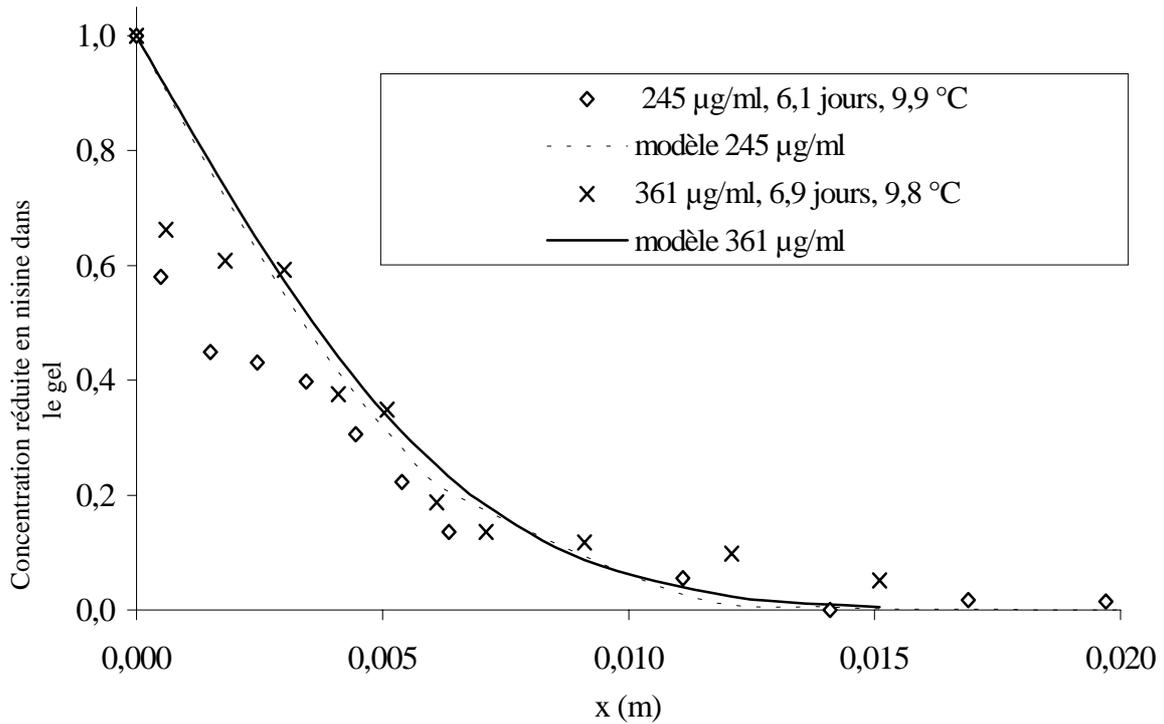
L'énergie d'activation correspond en fait à l'énergie nécessaire pour initier la diffusion de molécules. La valeur de  $42 \text{ kJ.mol}^{-1}$  pour la nisine est supérieure à celles rapportées dans les différentes études. Mais cette différence peut encore une fois être expliquée par la taille de la nisine, le choix du gel d'agarose comme matrice de diffusion et des conditions expérimentales mises en œuvre.

Dans des matrices plus complexes, denses et à faibles  $a_w$ , des énergies d'activation de l'ordre de  $45$  et de  $65 \text{ kJ.mol}^{-1}$  ont été rapportées respectivement pour la diffusion d'acide ascorbique dans des préparations à base de petits pois ou pour la diffusion de la thiamine dans des plats d'épinard (Mittal, 1999).

## II.2 Validation du modèle de diffusion de la nisine en gel d'agarose

### II.2.1 En fonction de la concentration en nisine dans la solution

Deux profils de concentration en nisine dans le gel d'agarose à  $3 \%$  sont présentés sur la Figure 60 et dans le Tableau 40, pour deux solutions de concentrations en nisine différentes ( $245$  et  $361 \text{ µg.ml}^{-1}$ ) après 6 jours de diffusion à  $10 \text{ °C}$ .



**Figure 60 : Influence de la concentration en nisine dans la solution de diffusion (245 et 361 µg.ml<sup>-1</sup>) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d’agarose. Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.**

Conditions expérimentales

C <sub>sol</sub> (µg.ml <sup>-1</sup> )	Temps (j)	Température (°C)	Coefficient de diffusion (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> ) Simulés (équation 1)	écart moyen $\bar{e}$ (%)	Nombre de Fourier
245	6,1	9,9	2,39.10 <sup>-11</sup>	3,8	0,01
361	6,9	9,8	2,37.10 <sup>-11</sup>	3,0	0,01

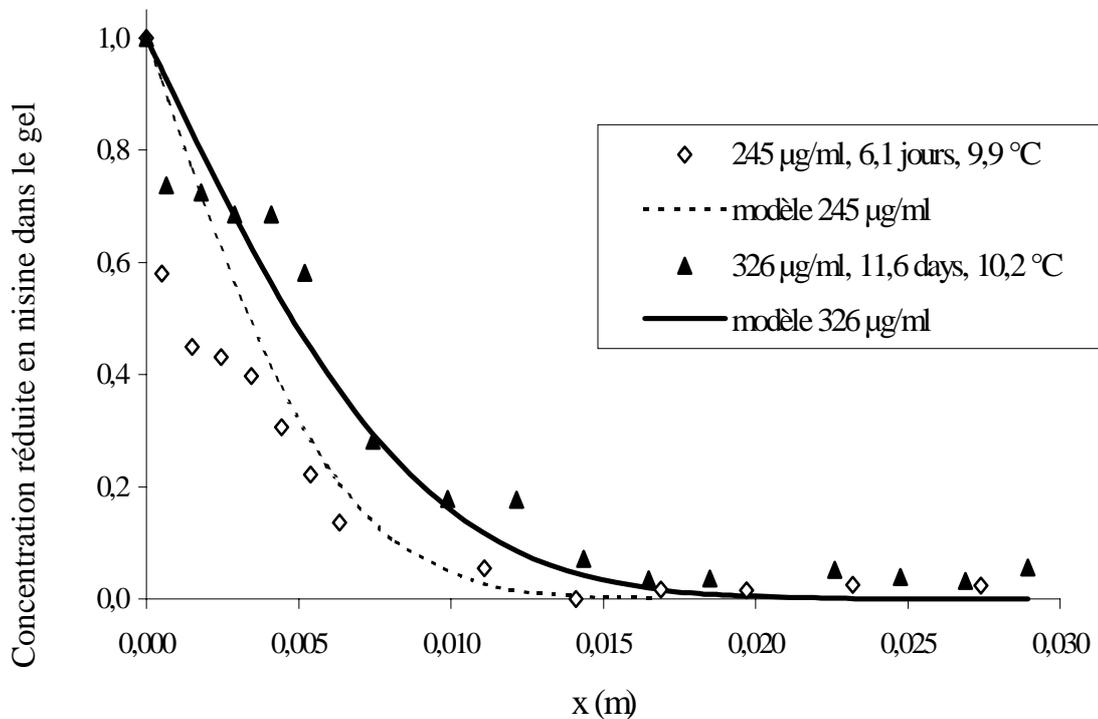
**Tableau 40: Influence de la concentration en nisine dans la solution de diffusion (245 et 361 µg.ml<sup>-1</sup>) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d’agarose. Les valeurs sont des moyennes de 3 répétitions.**

Quelle que soit la concentration de la solution en nisine, pour une même température et un même temps de diffusion, les deux profils de diffusion sont similaires. Les écart-moyens  $\bar{e}$  (%) respectivement égaux à 3,8 % et 3,0 % pour 245 et 361 µg.ml<sup>-1</sup> sont faibles et indiquent une bonne adéquation entre les données expérimentales et théoriques calculées.

La concentration de la solution n'a pas d'influence sur la forme du profil obtenu. Elle a bien sûr une forte influence sur la quantité absolue de nisine qui a diffusé dans le gel modèle. Ainsi, on peut affirmer que le coefficient de diffusion est indépendant de la concentration en nisine dans la solution diffusante.

### II.2.2 En fonction du temps de diffusion

Des expériences complémentaires sont conduites à 6 et 12 jours, à 10 °C, et pour des concentrations en nisine dans la solution de diffusion égales à 245 et 326  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Figure 61, Tableau 41).



**Figure 61 : Influence du temps (6 et 12 jours) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentration en nisine (245 et 361  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.**

Conditions expérimentales					
$C_{sol}$ ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Temps (j)	Température ( $^{\circ}\text{C}$ )	Coefficient de diffusion ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ) Simulés (équation 1)	écart moyen	Nombre de Fourier
245	6,1	9,9	$2,39.10^{-11}$	3,8	0,01
326	11,6	10,2	$2,50.10^{-11}$	2,8	0,01

**Tableau 41: Influence du temps (6 et 12 jours) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentration en nisine (245 et 361  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.**

Le modèle représente fidèlement les profils expérimentaux de diffusion à 6 et 12 jours de diffusion. L'erreur moyenne  $\bar{e}$  (%) entre les profils expérimentaux et théoriques est inférieure à 3,8 %, montrant ainsi la bonne adéquation entre le modèle et l'expérience.

Même si le temps de contact est doublé, les profils restent comparables et le modèle permet, dans les deux cas, une bonne estimation de la profondeur de pénétration de la nisine.

La concentration en nisine dans le gel d'agarose augmente quand le temps de diffusion augmente. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chamba (1982) qui a rapporté que la concentration du sel dans la phase aqueuse du fromage augmente avec le temps de saumurage.

En conclusion, les expériences menées jusqu'à présent montrent que la nisine diffuse dans un gel d'agarose à 3 % en matière sèche. Compte tenu des écarts moyens obtenus, qui sont du même ordre de grandeur que les écarts moyens des expériences correspondantes pour les essais utilisés pour l'identification de D, le modèle déterminé est relativement bien adapté pour l'étude de la diffusion de la nisine et est donc validé.

De plus, que ce soit à partir des expériences qui ont fait varier la concentration en nisine dans la solution de diffusion, ou celles réalisées à des temps de diffusion différents, l'indépendance de la diffusivité de la nisine vis à vis de la concentration en nisine dans le gel confirme d'une part que la diffusion est Fickienne, et valide d'autre part la condition nécessaire pour l'utilisation de la solution analytique de l'équation de la deuxième loi de Fick.

En fait, l'indépendance de la concentration en nisine n'est pas étonnante dans la mesure où on travaille à des concentrations très diluées en nisine par rapport à la phase aqueuse de la matrice de diffusion.

Par ailleurs, pour les distances inférieures à 3 mm, le modèle a tendance à légèrement surestimer les valeurs expérimentales (Figure 60). Ce phénomène est certainement dû aux difficultés que l'on a rencontré pour apprécier les conditions aux limites.

Cependant, le modèle est plus juste aux distances supérieures à 3mm, et nous permet ainsi de prédire les distances de pénétrations, qui se traduisent en microbiologie par la distance maximale où la nisine protégera l'aliment contre les contaminations bactériennes. La nisine, dans ces conditions, peut diffuser jusqu'à 10 à 15 mm. A ces distances, la nisine a une concentration de  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ( $1000 \text{ UI.ml}^{-1}$ ) est encore mesurée. La nisine, à des CMI égales à  $1000 \text{ UI.ml}^{-1}$ , reste localisée en surface. Cette localisation est fort intéressante dans la mesure où la nisine est potentiellement effective pour lutter contre les bactéries pathogènes ou altérantes aéro-anaérobies qui prolifèrent préférentiellement à la surface des produits alimentaires.

### **III Etude de l'influence de la teneur en matière sèche sur la diffusion de la nisine en gel d'agarose**

Des gels à 3, 6 et 8 % en agarose ont été élaborés et la diffusion de la nisine dans ces gels a été étudiée. Pour ces trois essais, la température était de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  et la concentration en nisine de la solution était comprise entre 250 et  $300 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les profils de concentration ont été déterminés après 6 jours de diffusion.

Afin de savoir si le modèle de diffusion élaboré et validé pour un gel à 3 % de matière sèche reste valable pour un gel contenant plus de matière sèche, les coefficients de diffusion calculés avec l'équation 1 (3 % en agarose) ont été comparés avec ceux directement identifiés à 6 et 8 % selon la méthode décrite dans la partie matériels et méthodes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 42.

Conditions expérimentales		Coefficient de diffusion ( $m^2.s^{-1}$ )	
Concentration en agarose (%)	Température (°C)	Valeurs simulées (selon l'équation 1)	Valeurs identifiées
3	9,8	$2,37 \times 10^{-11}$	-
6	10,3	$2,45 \times 10^{-11}$	$2,41 \times 10^{-11}$
8	9,7	$2,50 \times 10^{-11}$	$1,16 \times 10^{-11}$

**Tableau 42 : Coefficient de diffusion apparent, simulé et identifié, de la nisine en gel d'agarose à 3, 6 et 8 %, à 10 °C et à 250-300  $\mu g.ml^{-1}$ . Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions.**

Les résultats montrent que pour 6 % de matière sèche, les deux coefficients calculé avec l'équation 1 ou identifié sont très proches l'un de l'autre. Par contre, lorsqu'on passe à 8 % de matière sèche, les 2 coefficients de diffusion deviennent nettement différents. En effet, la valeur identifiée est nettement plus faible que la valeur issue de l'équation 1. Ainsi, la diffusion diminue lorsque la concentration en agarose augmente, ce qui se traduit par une quantité de nisine introduite dans le gel plus faible pour un même temps de mise en contact.

L'augmentation de la matière sèche rigidifie le gel, diminue la part de la phase aqueuse et la taille des pores et des interstices où la nisine diffuse, ce qui explique la diminution des coefficients de diffusion.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Biquet et Guilbert (1986) qui ont rapporté que la diffusion de molécules d'eau dans des gels modèles à 1,7 ou 0,3 % en agar varie entre  $2,7$  et  $4,8.10^{-10} m^2.s^{-1}$  lorsque la teneur en agar diminue. Ces auteurs ont corrélé la diminution du coefficient de diffusion à une rigidification du réseau du gel d'agar. Belton et Wilson (1982) ont modélisé la diffusion des ions  $CrO_4^{2-}$  dans des gels d'agar et montrent que le coefficient de diffusion passe de  $1,12$  à  $0,99.10^{-9} m^2.s^{-1}$  quand la concentration en agar varie de 1 à 5 %.

La diffusion dans les gels d'agarose, comme la diffusion dans tout polymère, correspond à une diffusion dans le solvant d'une matrice poreuse, où les pores sont remplis par le solvant et sont reliés les uns aux autres. Quand la teneur en agarose augmente, cette part de solvant et la taille des pores diminuent pour certainement réduire la diffusion de molécules dans le gel (Giannakopoulos et Guilbert, 1986b).

## **IV Etude de l'influence de la teneur en matière lipidique sur la diffusion de la nisine en gel d'agarose**

Les protéines sont des molécules complexes dont l'enchaînement d'acides aminés à caractères acides ou basiques leur confère une charge positive ou négative selon leur pI et le pH de travail. Au pH expérimental, la nisine de pI=8-9 est cationique. De plus, la nisine a un caractère plutôt hydrophobe. Ces deux spécificités peuvent induire des interactions entre la nisine et certains composants du gel dont les lipides en particulier.

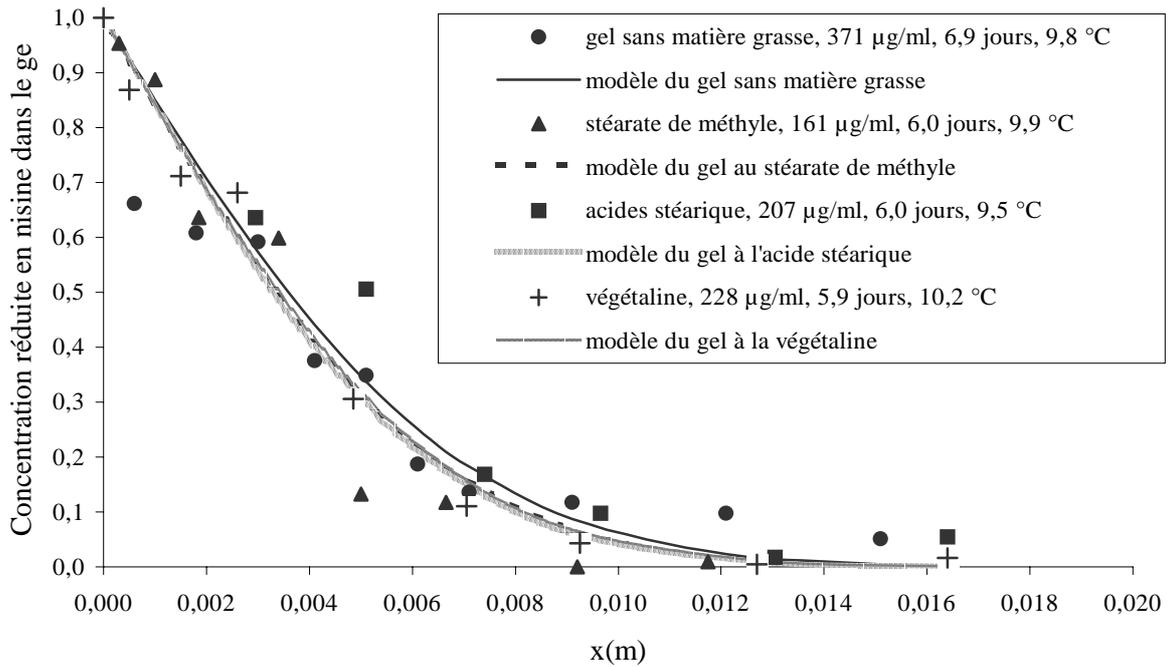
Plusieurs auteurs ont souligné l'influence de la composition du gel sur les phénomènes de diffusion, en rapportant en particulier que la présence de composés hydrophobes limitait la diffusion de certaines molécules (Biquet et Guilbert, 1986 ; Mittal, 1999).

Des effets similaires ont été rapportés par Jung *et al.* (1992) et Dean et Zottola (1996) qui ont observé une chute de l'activité de la nisine dans des systèmes contenant des matières lipidiques.

De plus, notre étude a mis en évidence des interactions fortes entre la nisine et l'acide stéarique par mise en place d'interactions électrostatiques.

Ainsi, acide stéarique, stéarate de méthyle et huile de coprah (végétaline) ont été incorporés à 50 % (p/p agarose) dans la matrice du gel d'agarose à 3 % dans le but d'étudier l'influence de l'addition et de la nature des acides gras sur la diffusion de la nisine.

La teneur de 50 % en lipides a été choisie car elle est souvent rencontrée dans des produits de type fromage ou charcuterie, bien que la comparaison avec les produits alimentaires soit assez lointaine du fait d'une matière sèche dans le gel d'agarose beaucoup plus faible. L'acide stéarique (espèce majoritairement anionique au pH expérimental) est comparé au stéarate de méthyle (espèce non chargée) pour étudier l'influence des charges sur la diffusion de la nisine (cationique). Enfin, la végétaline est une matière grasse d'utilisation commune en cuisine et qui a été utilisée pour approcher la composition des produits alimentaires. Les profils sont donnés dans la Figure 62.



**Figure 62 : Influence de la teneur en matière lipidique (50 %) et de la nature en matière lipidique (acide stéarique, stéarate de méthyle et huile de coprah) sur la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % d'agarose et pour des concentrations en nisine comprises entre 161 et 371 µg.ml<sup>-1</sup>. Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données calculées (tracé) sont la moyenne de 3 répétitions.**

Les profils de la Figure 62 montrent que la diffusion de la nisine n'est pas affectée par la présence de 50 % en lipides. La nature des lipides ne semble pas induire non plus des différences par rapport à la diffusion de la nisine dans un gel à 3 % en agarose et sans matière lipidique.

Les écarts moyens ( $\bar{\epsilon}$  (%)) sont inférieurs à 3,3 %, suggérant que d'une part les lipides ne sont pas un facteur limitant dans les phénomènes de diffusion de la nisine. D'autre part, le modèle représente correctement le profil expérimental et semble être encore une fois bien adaptée à l'étude de la diffusion de nisine dans un gel d'agarose et quelle que soit sa composition.

Le fait que la présence d'acide stéarique n'ait pas d'effet significatif sur la diffusion de la nisine était inattendu, suite aux résultats préalablement obtenus sur les interactions fortes entre la nisine cationique et l'acide stéarique anionique. Pour tenter d'expliquer ce résultat, plusieurs hypothèses sont possibles :

- ✓ La concentration en nisine dans la solution de diffusion est suffisamment élevée pour saturer toutes les molécules d'acides stéariques. Les molécules de nisine libre peuvent alors diffuser librement.
- ✓ Pendant le phénomène de diffusion, les interactions entre acide stéarique/polymère sont supérieures aux interactions acide stéarique/nisine, expliquant que la diffusion de la nisine ne soit pas affectée par la présence d'acide stéarique.
- ✓ La teneur en matière lipidique est trop faible pour observer un impact sur la diffusion de la nisine.

En fait, une autre explication peut être apportée : en effet, le pH du gel d'agarose est de 6-7. Au-dessus de la solution de nisine, dans les 20 premiers mm où la nisine est susceptible de diffuser, la mesure du pH a donné des valeurs comprises entre 2 et 3. Ces pH bas s'expliquent par une acidification du gel au niveau de la face en contact avec la solution de nisine diluée en solution de HCl 0,01 M avec un pH proche de 2. Cette acidification du gel place le pH du gel en dessous du  $pK_a$  de l'acide stéarique ( $pK_a > 5$ ), et favorise la forme neutre de l'acide stéarique. Aucune interaction électrostatique ne peut alors avoir lieu et la nisine diffuse sans être gênée par l'acide stéarique.

Cependant, même si la totalité des acides stéariques ne sont pas sous leur forme neutre, Bayarri *et al.* (2001) et Hirota *et al.* (2000) ont comparé la diffusion de molécules chargées dans des matrices neutres (agarose) ou chargées (K-Carraghénane) et rapportent que la diffusion du lysozyme par exemple est meilleure dans le cas du gel de K-Carraghénane du fait d'attractions électrostatiques entre la matrice et la molécule diffusante qui accélèrent la diffusion moléculaire.

## V Conclusion

Un modèle Fickien satisfaisant la loi d'Arrhenius a été validé dans le cas de la diffusion de la nisine dans le gel d'agarose. Dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, la matière sèche de 6 % et la présence de lipides n'influencent pas la diffusion de la nisine. Au-delà, la rigidification trop importante du réseau du gel influence fortement la diffusion de la nisine.

La nisine diffuse parfaitement jusqu'à une distance de 15 mm et une concentration supérieure à la CMI encore mesurable montre la potentialité de la nisine à protéger les aliments des contaminations bactériennes en surface.

Mais, gardons à l'esprit que le degré de précision (multiplication des étapes d'extraction, non-spécificité du dosage BCA, faible rendement d'extraction) peut être trop important pour n'avoir pas pu nous permettre de mettre en évidence des différences plus fines au niveau de la diffusion de la nisine.

Les perspectives de ce travail s'attacheront surtout à améliorer la méthode d'extraction et à mettre en place un dosage spécifique de la nisine (immuno-chimique par exemple) pour pouvoir mesurer la nisine et l'étudier dans des systèmes complexes de type alimentaire.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

« Que ton aliment emballé soit ta seule médecine »  
Hippocrate... ou presque

Ce travail de thèse s'est attaché à concevoir des bioemballages à activité anti-bactérienne en s'appuyant sur une approche interdisciplinaire comportant des études microbiologiques, physico-chimiques et basées sur les transferts matières.

Dans un premier temps, l'efficacité de la nisine pour lutter contre la prolifération de *L. monocytogenes* et *S. aureus* a été confirmée et une concentration égale à 1000 UI.ml<sup>-1</sup> a été choisie pour être incorporée dans la matrice du film. La nisine s'est avérée plus active sur les bactéries en phase exponentielle qu'en phase stationnaire de croissance, et l'addition de la nisine en phase de latence a retardé significativement le développement bactérien.

Après la phase de lyse bactérienne sous l'action de la nisine, un phénomène de résistance transitoire a été observé. L'association de différentes bactériocines et notamment l'utilisation combinée de nisine-curvaticine a permis de retarder efficacement la reprise de la croissance. Les souches résistantes à la nisine n'ont pas montré de phénomènes de résistance croisée, ce qui ouvre les champs d'investigation vers d'autres bactériocines ou d'autres molécules anti-bactériennes autres que les peptides.

La deuxième partie de ce travail de thèse a montré que le caractère hygroscopique du film HPMC était responsable de sa faible barrière à la vapeur d'eau. L'application de ce matériau en alimentaire n'aurait donc que peu d'influence sur les phénomènes de déshydratation ou de réhydratation des denrées. Pour diminuer cette sensibilité à l'eau, l'incorporation dans la matrice du film d'acide stéarique à 15 % (p/p HPMC) et/ou la mise en œuvre de la réticulation du film en présence de 15 % d'acide citrique (p/p HPMC) en tant qu'agent de réticulation, ont montré une amélioration significative des propriétés barrière à la vapeur d'eau du matériau, en augmentant sensiblement son caractère hydrophobe.

Le film composite et le film réticulé ont diminué le CTVE respectivement de 70 et de 34 %. Le transfert matière plus important pour les films réticulés peut être expliqué par une augmentation de la taille des interstices du matériau et une diminution de la cohésion des films. De plus, la présence de fonctions acide carboxylique résiduelles pourrait favoriser l'adsorption et la diffusivité des molécules d'eau. La réticulation de matériaux contenant des composés hydrophobes a abouti aux films composites réticulés ayant donné les plus faibles CTVE, avec les avantages supplémentaires d'une structure plus homogène et totalement lisse et d'un film non hydrosoluble.

Toutefois, l'incorporation d'acide stéarique tout comme la réticulation ont diminué les propriétés mécaniques du film. L'acide stéarique, sous forme d'inclusion dans la matrice, crée

des discontinuités à l'origine de la perte de l'intégrité du film alors que la réticulation crée des liaisons covalentes inter-chaînes qui rigidifient le film.

Les films composites réticulés ont quant à eux, montré des propriétés mécaniques et optiques fort intéressantes.

Dans la troisième partie, des films anti-bactériens ont été obtenus après l'introduction de 1000 UI.ml<sup>-1</sup> de nisine dans la solution filmogène. Cependant, l'incorporation de 15 % en acide stéarique a réduit de 70 % l'activité anti-bactérienne résiduelle des films. Une interaction de type électrostatique entre la nisine majoritairement cationique et l'acide stéarique majoritairement anionique dans nos conditions expérimentales a été mise en évidence. La saturation des sites cationiques de la nisine par l'acide gras dissocié, limitant ainsi l'interaction électrostatique avec les phospholipides membranaires anioniques de la cellule cible reste à vérifier.

Un modèle basé sur une régression linéaire multifactorielle a été établi pour déterminer la concentration en nisine à introduire dans le film afin d'obtenir l'activité anti-bactérienne résiduelle désirée. Ce modèle a donné une très bonne approximation de l'activité inhibitrice des films composites en fonction de la teneur en acide stéarique.

De fortes concentrations en nisine sont ainsi nécessaires dans le cas de films composites. Deux approches ont alors été menées dans le but de limiter les interactions entre la nisine et l'acide gras.

Tout d'abord, une approche basée sur l'introduction d'ions calcium Ca<sup>2+</sup> a été mise en œuvre afin de saturer les charges anioniques de l'acide. L'introduction de calcium à une teneur de 80 mg.l<sup>-1</sup> diminue le phénomène d'interaction entre le peptide et l'acide gras. Toutefois, l'application en film n'a pas permis d'améliorer l'activité anti-bactérienne du matériau. L'ion calcium neutraliserait en fait les charges des phospholipides membranaires et empêcherait ainsi la nisine de se fixer sur les bactéries cibles.

Une deuxième approche a alors été appréhendée, basée sur la diminution du pH de la solution filmogène. L'acidification de la solution filmogène à pH 3 a permis d'atteindre une activité inhibitrice proche des films témoins sans matière lipidique en favorisant la forme neutre de l'acide stéarique. Ce procédé a permis d'aboutir à des films à la fois anti-bactériens et barrière à la vapeur d'eau.

D'autre part, la réticulation des films préalablement associés à la nisine n'a pas permis de maintenir une activité anti-bactérienne du film. Une double action de dénaturation de la nisine sous l'effet du choc thermique et de rétention de la bactériocine dans la matrice du film

semble être à l'origine de ce phénomène. En effet, les fonctions amines primaires de la nisine peuvent potentiellement réagir sur les fonctions acide carboxylique du triacide pour former des liaisons amides. Par ailleurs, un greffage de la nisine sur l'HPMC peut intervenir par l'intermédiaire de liaisons ester entre la fonction acide carboxylique en position C terminale du peptide et les fonctions alcool du biopolymère.

L'adsorption de la nisine en surface par imprégnation des films dans des solutions de nisine a permis d'obtenir des activités anti-bactériennes équivalentes à celles des films témoins.

Enfin, la diffusion de la nisine dans des gels d'agarose modèles a été étudiée en analysant l'influence en particulier des effets de la teneur en matière sèche et en lipides dans le gel, et du temps et de la température de diffusion. Un modèle Fickien suivant la loi d'Arrhenius a été validé avec une énergie d'activation de  $42 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, la matière sèche de 6 % et la présence de lipides n'influencent pas la diffusion de la nisine. Au-delà de 6 % en agarose, la rigidification trop importante du réseau du gel diminue fortement la diffusion de la nisine.

La nisine diffuse parfaitement jusqu'à une distance de 15 mm et une concentration supérieure à la CMI est encore mesurable et montre la potentialité de la nisine à protéger les aliments des contaminations en surface.

En perspective de ce travail, compte tenu du phénomène de résistance des bactéries à la nisine, l'approche basée sur l'association de la nisine à d'autres bactériocine a donné des résultats intéressants en culture liquide, qu'il faudra obligatoirement confirmer en film. De plus, l'association de la nisine à des acides organiques ou à d'autres molécules chimiques ou systèmes enzymatiques biologiquement actifs serait intéressante à étudier pour améliorer l'efficacité des films sur les bactéries pathogènes, et notamment les souches Gram négatif.

La réduction du CTVE des films à base d'HPMC a été obtenue par introduction d'acide stéarique et/ou par réticulation. L'amélioration des propriétés barrière peut également être envisagée par l'élaboration de films à base de copolymère glucide-protéine ou glucide-PLA. Le PLA comme les protéines sont connus pour être moins sensibles à l'eau que les films polysaccharidiques.

Dans cette étude, seule la diffusion de la nisine a été étudiée. La désorption de la nisine devra être modélisée puis corrélée au modèle de diffusion que nous avons établi.

Par ailleurs, ce travail a été basé sur l'utilisation de nisine ayant une pureté supérieure à 95 %. Or, une seule formulation de peptide bioactif est aujourd'hui commercialisée sous le nom de

Nisaplin<sup>®</sup>. Ce produit avec 2 % de pureté, associe la nisine à d'autres composés de type protéique et glucidique. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'influence de ces contaminants sur les propriétés biologiques et physico-chimiques des films.

Enfin, le dosage non spécifique de la nisine dans une matrice complexe a constitué une difficulté non négligeable. Un dosage spécifique de type immunochimique devra être mis au point pour doser plus finement le peptide. De plus, ce dosage permettrait d'étudier la diffusion de la nisine dans des produits alimentaires complexes de type fromage ou charcuterie.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Quelques articles qui m'ont emballé

...

Abee, T., Rombouts, F. M., Hugenholtz, J., Guihard, G., and Letellier, L. (1994). "Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A growth at high and low temperatures" Applied and Environment Microbiology, 60, 1962-1968.

Abee, T. (1995). "Pore forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self protection mechanisms of producers organisms." FEMS Microbiology letters, 129, 1-10.

Adesiyun, A. A., and Krishnam, C. (1995). "Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campilobacter* spp. In slaughter pigs and carcasses in Trinidad." Food Microbiology, 12, 99-107.

Anker, M., Berntsen, J., Hermansson, A. M., and Stading, M. (2002). "Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride." Innovative Food Science and Emerging Technologies, 3, 81-92.

Appendini, P., and Hotchkiss, J. H. (2002). "Review of antimicrobial food packaging." Innovative Food Science and Emerging Technologies, 3, 113-126.

Ariyapitipun, T., Mustapha, A., and Clarke, A. D. (2000). "Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin." Journal of Food Protection, 63(1), 131-136.

Arnott, S., Fulmer, A., Scott, W. E., Dea, I. C. N., Moorhouse, R., and Rees, D. A. (1974). "The agarose double helix and its function in agarose gel structure." Journal of Molecular Biology, 90, 269-284.

Ayranci, E., and Tunc, S. (2001). "The effect of fatty acid content on water vapour and carbon dioxide transmissions of cellulose-based edible films." Food Chemistry, 72, 231-236.

Baccus-Taylor, G., Glass, K. A., and Luchansky, J. B. (1993). "Fate of *Listeria monocytogenes* and *Pediococcal* starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage." Poultry science, 72, 1772-1778.

Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., and Flandrois, J. P. (1996). "The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions." International Journal of Food Microbiology, 29, 201-211.

Banker, G. S. (1966). "Film coating theory and practice." Journal of pharmacology Science, 55, 81-89.

Bayarri, S., Rivas, I., Costell, E., and Duran, L. (2001). "Diffusion of sucrose and aspartame in kappa-carrageenan and gellan gum gels." Food Hydrocolloids, 15, 67-73.

Belton, P. S., and Wilson, R. H. (1982). "An experimental simple method for measuring diffusion in food gels." Journal of Food Technology, 17, 531-539.

Bester, B. H., and Lombard, S. H. (1990). "Influence of lysozyme on selected bacteria associated with gouda cheese." Journal of Food Protection, 53, 306-311.

Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., Spoorenberg, E., and Rombouts, F. M. (1996). "*Listeria* species in domestic environments." Epidemiology and Infection, 117(3), 437-442.

- Bhunja, A. K., Johnson, M. C., Ray, B., and Kalchayanand, N. (1991). "Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains." Journal of Applied Bacteriology, 70, 25-33.
- Bican, P., Spahni, A., and Schaller, J. (1994). "Partial characterization of peptides from Emmentaler cheese." Food Biotechnology, 8, 229-241.
- Bican, P., Spahni, A., and Schaller, J. (1994). "Partial characterization of peptides from emmentaler cheese." Food Biotechnology, 8 (2 and 3), 229-241.
- Biquet, B., and Guilbert, S. (1986). "Diffusivités relatives de l'eau dans des aliments modèles à humidité intermédiaire." Lebensm. Wiss. u. Technol., 19, 208-214.
- Bird, R. B., Steward, W. E., and Lightfoot, E. N. (1960). "Transport phenomena." John Wiley and Sons, New York, 780.
- Blom, H., Katla, T., Hagen, B. F., and Axelsson, L. (1997). "A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins." International Journal of Food Microbiology, 38, 103-109.
- Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., and Zucca, J. (1996). "Microbiologie alimentaire, tome 1." Edition Tech et Doc, Lavoisier.
- Bouttefroy, A., and Millière, J. M. (2000). "Nisin-Curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313." International Journal of Food Microbiology, 62, 65-75.
- Bozariis, I. S., and Adams, M. R. (1999). "Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives." International Journal of Food Microbiology, 53, 105-113.
- Brackett, R. E. (1988). "Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in Food and water." Food technology, 162, 164-178.
- Breand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L., and Tornassone, R. (1998). "Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves." International Journal of Food Microbiology, 40, 185-195.
- Breukink, E., and De Kruijff, B. (1999). "The lantibiotic nisin, a special case or not?" Biochimica et Biophysica Acta, 1462, 223-234.
- Buchanan, R. L., and Klawitter, L. A. (1990). "Effect of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5." Journal of Food Science, 55, 1754-1756.
- Burianek, L. L., and Yousef, A. E. (2000). "Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures." Letters in Applied Microbiology, 31, 193-197.
- Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E. T. (2001). "Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH Whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids." Journal of Food Science, 66(6), 865-870.
- Carneiro, A. M. S., Cassar, C. A., and Miles, R. J. (1998). "Trisodium phosphate increases

*sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin.*” Journal of Food Protection, 61(7), 839-844.

Cenatiempo, Y., Berjeaud, J. M., Biet, F., Fremaux, C., Hechard, Y., and Robichon, D. (1996). “*Batériocines de bactéries lactiques : données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leurs déterminants génétiques.*” Lait, 76, 169-177.

Chamba, J. F. (1982). “*Le salage de l'Emmental.*” thèse de doctorat, Université de Nancy.

Chen, Y., and Montville, T. J. (1995). “*Efflux of ions and ATP depletion induced by pédiocine PA-1 are concomitant with cell death in Listeria monocytogenes scott A.*” Journal of Applied Bacteriology., 79, 684-690.

Chen, M. C., Yeth, G. H. C., and Chiang, B. H. (1996). “*Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative.*” Journal of Food Protection and Preservation, 20, 379-390.

Chen, Y., Ludescher, R. D., and Montville, T. J. (1997). “*Electrostatic interaction, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pédiocine PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles.*” Applied and Environmental Microbiology., 63, 4770-4777.

Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J. C., and Lebert, A. (1998). “*Effects of pH and aw stress on growth of L. monocytogenes.*” International Journal of Food Microbiology, 42, 71-77.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). “*Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation.*” International Journal of Food Microbiology, 71, 1-20.

Colonna, P. (1992). Conditionnement alimentaire, Pouzauges, 203-213.

Coma, V. (2001a). “*Les emballages actifs, produits d'avenir en agroalimentaire.*” Les dossiers techniques du pôle Aquitain Agroalimentaire et nutrition, N°3.

Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., and Deschamps, A. (2001b). “*Edible anti-microbial films based on chitosan matrix.*” Journal of Food Sciences, 67(3), 1162-1169.

Conn, R. E., Kolstad, J. J., Borzelleca, J. F., Dixler, D. S., Filer, L. J., Ladu, B. N., and Pariza, M. W. (1995). “*Safety Assessment of Polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer.*” Food and Chemical Toxicology, 33(4), 273-283.

Crank, J. (1975). “*The mathematics of diffusion.*” Oxford university Press, Ely House, London W.1, second edition, 1-414.

Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J. L., and Guilbert, S. (1995). “*Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties.*” Journal of Food Science, 60(6), 1369-1374.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., and Guilbert, S. (1996). “*Functional properties of myofibrillar protein-based bio packaging as affected by film thickness.*” Journal of Food Science, 61(3), 580-584.

- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., and Guilbert, S. (1997). "Selected Functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 622-626.
- Dal Pozzo, A., Vanini, L., Fagnoni, M., Guerrini, M., De Benedittis, A., and Muzzarelli, R. A. A. (2000). "Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-crosslinked reacylated chitosans." Carbohydrate polymers, 42(201-206).
- Davies, E. A., Bevis, H. E., and Delves-Broughton, J. (1997). "The use of the bacteriocin nisin as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*." Letters in Applied Microbiology, 24, 343-346.
- Dawson, P. L., Carl, G. D., Acton, J. C., and Han, I. Y. (2002). "Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna." Poultry Science, 81(5), 721-726.
- De la Cruz, G. V., Torres, J. A., and Martín-Polo, M. O. (2001). "Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films." Journal of Food Engineering, 48, 91-94.
- De llano, D. G., Polo, M. C., and Ramos, M. (1995). "Study of Proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides." Journal of Dairy Science, 78, 1018-1024.
- De Smet, M. J., and Eggink, G. (1983). "Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane." Journal of Bacteriology, 154, 870-878.
- Dean, M., and Zottola, E. A. (1996). "Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*." Journal of Food Protection, 59, 476-480.
- Debeaufort, F., and Voilley, A. (1995). "Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films." International Journal of Food Science and Technology, 30, 183-190.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., and Voilley, A. (1998). "Edible films and coatings: Tomorrow's Packagings: A review." Critical Reviews in Food Science, 38(4), 299-313.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Delporte, B., and Voilley, A. (2000). "Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films." Journal of membrane science, 4679, 1-8.
- Delves-Broughton, J. (1990). "Nisin and its use as food preservative." Food Technology, 11, 100-113.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, R. J., Evans, P., and Hugenholtz, J. (1996). "Applications of the bacteriocin, nisin." Antonie Van Leeuwenhoek, 69, 193-202.
- Diaz, G., Wolf, W., Kostaropoulos, A. E., and Spiess, W. E. L. (1993). "Diffusion of low molecular compounds in food model systems." Journal of Food Processing and Preservation, 17, 437-454.

- Doi, Y., and Segewa, A. (1990). "Production of biodegradable copolymers by *Alcaligenes eutrophus*", Kluwer academic publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Driessen, A. J., Van Der Hooven, H. W., Kuipers, W., Van de, K. M., Sahl, H. G., and Konings, W. N. (1995). "Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles." Biochemistry, 34, 1606-1614.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K. D. (1994). "Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3." Applied Environmental Microbiology., 60, 814-825.
- Fenlon, D. R. (1999). "Listeria monocytogenes in the natural environment in Listeria, Listeriosis and food safety." , E. T. Ryser and E. H. Marth, eds., Dekker, M., New York, 21-37.
- Freier, T., Kunze, C., Nishan, C., Kramer, S., Sternberg, K., Sab, M., Hopt, U. T., and Shmitz, K. P. (2002). "In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)." Biomaterials, 23, 2649-2657.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Fréhel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991). "Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigen from Gram-positive cocci." Cell, 65, 1127-1141.
- García, M. A., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. (2000). "Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings." Food Chemistry and Toxicology, 65(6), 941-947.
- Garver, K. I., and Muriana, P. M. (1994). "Purification and partial amino acids sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47." Applied and Environmental Microbiology, 2191-2195.
- Gaya, P., Medina, M., and Nunez, M. (1991). "Effect of the lactopéroxydase system on *Listeria monocytogenes* behaviour in raw milk at refrigeration temperatures." Applied and Environmental Microbiology., 57, 3355-3360.
- Geurts, T. J., Walstra, P., and Mulder, H. (1974). "Transport of salt and water during salting of cheese. 1. Analysis of the processes involved." , Netherlands Milk and Dairy Journal (28), 102-129.
- Geurts, T. J., Walstra, P., and H., M. (1980). "Transport of salt and water during salting of cheese. 2. Quantities of salt taken up and of moisture lost." Netherlands Milk and Dairy Journal, 34, 229-254.
- Giannakopoulos, A., and Guilbert, S. (1986a). "Determination of sorbic acid diffusivity in model food gels." Journal of Food Technology, 21, 339-353.
- Giannakopoulos, A., and Guilbert, S. (1986b). "Sorbic acid diffusivity in relation to the composition of high and intermediate moisture model gels and foods." Journal of Food Technology, 21, 477-485.
- Gontard, N. (1991). "Films et enrobages comestibles: étude et amélioration des propriétés filmogènes du gluten," , Thèse de l'université de Montpellier II.

- Gontard, N. (2000). « *Les emballages actifs* », Tec et Doc ,Lavoisier, Paris.
- Gould, G. W. (1995). “*Biodeterioration of food and an overview of preservation in the food and dairy industries.*” International bio détérioration et biodégradation, 267-277.
- Goulet, V., Rocourt, J., Staïner, F., and Thomas, J. C.(1998). “*Impact des mesures de contrôle mises en œuvre depuis 10 ans sur l'incidence de la listériose en France.*” Deuxième journée scientifique du réseau national de santé publique, St Maurice.
- Greener-Donhowe, I. G., and Fennema, O. (1994). “*Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods.*” Edible coatings and films to improve food quality.
- Gros, J. B., and Ruëgg, M. (1987). “*Determination of the Apparent Diffusion Coefficient of Sodium Chloride in Model Foods and Cheese.*” Physical properties of foods (2), New York., 71-108.
- Guilbert, S., Giannakopoulos, A., and Cheftel, J. C. (1985). “*Diffusivity of sorbic acid in food gels at high and intermediate water activities.*” Edition Simatos and Multon, "Properties of water in foods", 343-356.
- Guilbert, S., and Graille, J. (1994). “*Biomatériaux et molécules fonctionnelles.*” Les applications non alimentaires des grandes productions agricoles, Nantes, 195-206.
- Guilbert, S., Gontard, N., and L.G.M., G. (1996). “*Prolongation of the shelf-life of Perishable food products using biodegradable films and coatings.*” Lebensm. Wiss, u, Technol., 29, 10-17.
- Gupta, K. G. y. (1969). “*Effect of monovalent and divalent ions upon the activity of nisin against Micrococcus Flavus.*” Folia Microbiology, 14, 36-39.
- Halek, W., and Garg, A. (1989). “*Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film.*” Journal of Food Safety, 9, 215-222.
- Hanlin, M. B., Kalchayanand, N., Ray, P., and Ray, B. (1993). “*Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity.*” Journal of Food Protection, 56(3), 252-255.
- Harris, L. J., Fleming, H. P., and Klaenhammer, T. R. (1991). “*Sensitivity and resistance of Listeria monocytogenes ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin.*” Journal of Food Protection, 54(11), 836-840.
- Havarstein, L. S., Diep, D. B., and Nes, I. F. (1995). “*A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export.*” Molecular Microbiology, 16, 229-240.
- Henry, Schwartzberg, G., and Chao, R. Y. (1982). “*Solute diffusivities in leaching processes.*” Food technology, 73-86.
- Herron, C. M., Hanser, T. R., Cooper, D. J., and Hersko, B. S. (1990). “*Process for preparing individualized, polycarboxylic acid crosslinked fibers.*” , European Patent 0, 427, 317, A2.

- Hirota, N., Kumaki, Y., Narita, T., Gong, J. P., and Osada, Y. (2000). "Effect of charge on protein diffusion in Hydrogels." Journal of Physics and Chemistry., 104, 9898-9903.
- Hjærtstam, J., and Hjertberg, T. (1999). "Effect of hydroxyl group content in ethyl cellulose on permeability in free films and coated membranes." Journal of Applied Polymer Science, 72, 529-535.
- Hoffman, K. L., Han, I., and Dawson, P. L. (2001). "Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid and EDTA." Journal of Food Protection, 64(6), 885-889.
- Holmes, P. A. (1987). "Biologically produced (R)-3-Hydroxyalcanoate polymers and copolymers." Biomaterials, 1-65.
- Holzappel, W. H., Geisen, R., and Schillinger, U. (1995). "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes." International Journal of Food Microbiology, 24, 343-362.
- Hurst, A. (1981). "Nisin." Advances in Applied Microbiology, 27, 85-123.
- Irissin-Mangata, J. (1998). "Recherche de nouveaux matériaux d'emballage à hautes performances à base de Gluten de blé et de polymères synthétiques." Thèse université de la Réunion.
- Ishitani, T. (1995). "Active packaging for food quality preservation in Japan." Foods and packaging materials-Chemical interactions, P. Ackermann, M. Jaegerstaad, and T. Ohlsson, eds., Royal Society of Chemistry, Letchworth, UK, 177-188.
- Jack, R. W., Tagg, J., and Ray, B. (1995). "Bacteriocins of Gram positive bacteria." Microbiology Review, 59, 171-200.
- Jager, K., and Harlander, S. (1992). "Characterization of a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PC and comparison of a bacteriocin-producing strains using molecular typing procedures." Applied Microbiology and Biotechnology, 37, 631-637.
- Jung, D. S., Bodyfelt, F.W., and Daeschel, M. A. (1992). "Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk." Journal of Dairy Science, 75, 387-393.
- Kamper, S. L., and Fennema, O. (1984). "Water vapor permeability of an edible, fatty acids, bilayer film." Journal of Food Science, 49, 1482-1485.
- Kamper, S. L., and Fennema, O. (1985). "Use of an edible film to maintain water vapor gradients in foods." Journal of Food Science, 50(382-384).
- Katla, T., Moretro, T., Aasen, I. M., Holk, A., Axelsson, L., and Naterstad, K. (2001). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and or live *Lactobacillus sakei* cultures." Food Microbiology, 18, 431-439.
- Kawase, M., Michibayashi, N., Nakashima, Y., Kurikawa, N., Yagi, K., and Mizaoguchi, T. (1997). "Application of glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment." Biological Pharmaceutical Bulletin, 20(708-710).

- Kempton, B., and Bremer, E. (1998). "Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments." Archives of Microbiology, 170, 319-330.
- Kestler, J. J., and Fennema, O. R. (1986). "Edible film and coatings: a review." Food technology, 40(12), 47-59.
- Kestler, J. J., and Fennema, O. (1989). "An edible film of lipids and cellulose ethers : barriers properties to moisture vapor transmission and structural evaluation." Journal of Food Science, 54, 1383-1389.
- Kim, S. J., and Ustunol, Z. (2001). "Solubility and Moisture sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4399-4391.
- Klaenhammer, T. R. (1988). "Bacteriocins of lactic acid bacteria." Biochimie, 70, 337-349.
- Klaenhammer, T. R. (1993). "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." FEMS Microbiology Reviews., 12, 39-86.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., and Wagenknecht, W. (1998). "Comprehensive cellulose chemistry", Wiley-VCH, Germany.
- Kuchroo, C. N., and Fox, P. F. (1982). "Soluble nitrogen in cheddar cheese: Comparison of extraction procedures." Milchwissenschaft, 37(6), 331-335.
- Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., and Vos, W. M. (1993). "Characterization of the nisin gene cluster nis ABTCIPRK of *Lactococcus lactis* and evidence for the involvement of expression of the nis A and nis A genes in product immunity." European Journal of Biochemistry, 216, 281-291.
- Lalla, J. K., and Chung, N. (1990). "Biodegradable polymer polylactic acid. part 1: synthesis, evaluation and structural elucidation." Indian Drugs, 27(10), 516.
- Leclerc, H., Gaillard, J. L., and Simonet, M. (1995). "Microbiologie générale." Edition Doin.
- Lee, K. P. D., and Warthesen, J. J. (1996). "Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1058-1063.
- Lee, K. P. D., and J., W. (1996). "Preparative methods of isolating Bitter peptides from cheddar." Journal of Agricultural and Food chemistry, 44, 1058-1063.
- Levenberg, K. (1944). "A method for the solution of certain problems in least squares." Quarterly of Applied Mathematics, 2, 164-168.
- Lins, L., Ducarme, P., Breukink, E., and Brasseur, R. (1999). "Computational study of nisin interaction with model membrane." Biochimica et Biophysica Acta, 1420, 111-120.
- Liu, W., and Hansen, J. N. (1990). "Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*." Applied and Environmental Microbiology, 56(8), 2551-2558.
- Loncin, M. (1980). "Diffusion phenomena in solids." Food Process Engineering, 1, 354-363.

- Luna, J. A., and Bressan, J. A. (1987). "Mass transfer Ripening of Cuartirolo Argentino Cheese." Journal of Food Science, 52, 308-311.
- Marquardt, D. (1968). "An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters." SIAM Journal on Applied Mathematics, 11, 431-441.
- Martin, I., Ruyschaert, J. M., Sanders, D., and Giffard, J. (1996). "Interaction of the lantibiotic nisin with membranes revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan." European Journal of Biochemistry, 239, 156-164.
- Mathlouthi, M. (1996). « *Emballage et conservation des produits alimentaires* », Polytechnica.
- Mattisson, C., Roger, P., Jönsson, B., Axelsson, A., and Zacchi, G. (2000). "Diffusion of lysozyme in gels and liquids A general approach for the determination of diffusion coefficients using holographic laser interferometry." Journal of Chromatography, 743, 151-167.
- Mauduit, J., Pérouse, E., and Vert, M. (1996). "Hydrolytic degradation of films prepared from blends of high and low molecular weight poly(D-lactic acid)." Journal of Biomedical research, 30, 201-207.
- Mauer, L. J., Smith, D. E., and Labuza, T. P. (2000). "Water vapor permeability, mechanical and structural properties of edible beta-casein films." International Dairy Journal, 10, 353-358.
- Maynard, F. (1999). "Edible film and method." , European Patent 0935921
- Maynes, J., and Krochta, J. M. (1994). "Properties of edible films from total milk protein." Journal of Food Science, 59, 909-911.
- Mazzotta, A. S., and Montville, T. J. (1997). "Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C." Journal of Applied Microbiology, 82, 32-38.
- Miller, K. W., Cshamber, R., Osmanagaoglu, O., and Ray, B. (1998). "Isolation and characterization of padiocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity." Applied and Environmental Microbiology, 64, 1997-2005.
- Ming, X., and Deaschel, M. (1993). "Nisin resistance to food born bacteria and specific resistance response to *Listeria monocytogenes* Scott A." Journal of Food Protection, 56, 944-948.
- Ming, X., Weber, G. H., Ayres, J. W., and Sandine, W. E. (1997). "Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats." Journal of Food Science, 62(2), 413-415.
- Mittal, G. S. (1999). "Mass diffusivity of food products." Food Review International, 15(1), 19-66.
- Mohammed, Z. H., Hember, M. W. N., Richardson, R. K., and Morris, E. R. (1998). "Kinetic and equilibrium processes in the formation and melting of agarose gels." Carbohydrate

Polymers, 36, 15-26.

Montville, T. J., and Chen, Y. (1998). “*Mechanistic action of pédiocine and nisin: recent progress and unresolved questions.*” Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 511-519.

Mousavi, M., Desobry, S., Maucourt, M. N., and Hardy, J. (1999). “*Méthode de détermination des coefficients de diffusion de molécules volatiles dans un aliment solide.*” Sciences des Aliments, 19, 85-96.

Munton, T. J., and Russell, A. D. (1972). “*Effect of glutaraldehyde on the outer layer of Escherichia coli.*” Journal of Applied Bacteriology, 35, 193-199.

Naesens, W., Bresseleers, G., and Tobback, P. (1981). “*A method for determination of diffusion coefficients of food components in low and intermediate moisture systems.*” Journal of Food Science, 46, 1446-1449.

Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., and Holo, H. (1996). “*Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.*” Antonie van Leeuwenhoek, 70, 113-128.

Nielsen, T. (1997). *Active Packaging*, SIK. ISBN 91-7290-180-2

Nilsson, L., Graham, L., and Huss, S. H. (1999). “*Growth control of Listeria monocytogenes on cold smoked salmon using competitive lactic acid bacteria flora.*” Journal of Food Protection, 62, 336-342.

Orr, R. V., Han, I. Y., Acton, J. C., and Dawson, P. L. (1999). “*Effect of nisin in edible protein films on Listeria monocytogenes viability in Milk.*” Activities report of the R and D associates N°499602, 51(1), 300-305.

Osterholm, M. T., and Potter, M. E. (1997). “*Irradiation pasteurisation of solid foods : taking food safety to the next level.*” Emerging Infectious Diseases Journal., 3, 575-577.

Ouattara, B., Giroux, M., yefsah, R., Smoragiewicz, W., Saucier, L., Borsa, J., and Lacroix, M. (2002). “*Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by Gamma irradiation, food additives and edible coating film.*” Radiation physics and chemistry, 63, 299-304.

Padgett, T., Han, I. Y., and Dawson, P. L. (1998). “*Incorporation of food-grade antibacterial compounds into biodegradable packaging films.*” Journal of Food Protection, 61(10), 1330-1335.

Perez-Gago, M. B., and Krochta, J. M. (2001). “*Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties and oxygen permeability of Whey protein edible films.*” Journal of Food Science, 66(5), 705-710.

Periago, P. M., and Moezelaar, R. (2001). “*Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of Bacillus cereus.*” International Journal of Food microbiology, 68, 141-148.

Petersen, K., Nielsen, P. V., Bertelsen, G., Lawther, M., Olsen, M. O., Nilson, N. H., and Mortensen, G. (1999). “*Potential of biobased materials for food packaging.*” Trends in Food

Science and Technology, 10, 52-68.

Phan-Thanh, L., and Gordon, T. A. (1997). “Chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*.” International Journal of Food microbiology, 35, 91-95.

Phillips, C. R. (1952). “Relative resistance of bacterial spores and vegetative bacteria to disinfectants.” Bacteriol. Rev., 16, 135-138.

Prescott, Harley, and Klein. (1995). “Microbiologie.” Edition DeBoeck université.

Quezada Gallo, J. A. (1999). “Influence de la structure et de la composition de réseaux macromoléculaires sur les transferts de molécules volatiles (eau, arômes).” Thèse de l'université de Bourgogne.

Quezada Gallo, J. A., Debeaufort, F., Callegarin, F., and Voilley, A. (2000). “Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films.” Journal of Membrane Science, 4678, 1-10.

Radas, A., Ermel, G., Gerault, P., Salvat, G., and Colin, P. (1999) “Evaluation du risque posé par *Listeria monocytogenes* dans les abattoirs de volailles.” SFM, France.

Rasch, M., and Knochel, S. (1998). “Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A.” Letters in Applied Microbiology, 27, 275-278.

Redl, A., Gontard, N., and Guilbert, S. (1996). “Determination of sorbic acid diffusivity in edible wheat gluten and lipid based films.” Journal of Food Science, 61(1), 116-120.

Rekhif, N., Atrih, A., and Lefebvre, G. (1994). “Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains.” Current Microbiology, 28, 237-241.

Richard, J. (2001). “Protection biologique et maîtrise hygiénique des aliments.” Les outils biologiques dans les procédés et les techniques d'analyse, Tech et Doc, Lavoisier, Paris, 49-60.

Rocourt, J., Jacquet, C., and Reilley, A. (2000). “Epidemiology of human listeriosis and seafood. International.” Journal of Food Microbiology, 62(3), 197-209.

Rodgers, S. (2002). “Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures - a review.” Trends in Food Science and Technology, sous presse.

Rogers, A. M., and Montville, T. J. (1994). “Quantification of factors with influence nisin inhibition of *Clostridium botulinum* 56A in a model Food system.” Journal of Food Science, 59, 663-668.

Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., De Vos, W. M., and Siezen, R. J. (1995). “Improvement of solubility and stability of ther antimicrobial peptide nisin by protein engineering.” Applied and Environmental Microbiology., 61(8), 2873-2878.

Ryser, E. T. (1999). “Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products.” Listeria, Listeriosis, and food safety, E. T. Ryser and E. H. Marth, eds., Dekker, M., New York, 359-409.

- Sahl, H. G., Kordel, M., and Benz, R. (1987). "Voltage-dependent depolarisation of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin." Archives of Microbiology, 149, 120-124.
- Sahl, H. G., and Bierbaum, G. (1998). "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram positive bacteria." Annual Review of Microbiology, 52, 41-79.
- Savary, C. (1992). "Mélanges amidon-polymères synthétiques, structure et biofragmentation." thèse de l'université de Grenoble I.
- Scannell, A. G. M., Hill, C., Ross, R. P., Marx, S., Hartmeier, W., and Arendt, E. K. (2000). "Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lactacin 3147 and nisaplin." International Journal of Food microbiology, 60, 241-249.
- Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y., and Juven, B. J. (1993). "Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocine SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*." Journal of Applied Bacteriology, 74, 67-77.
- Schwartzberg, H. G., and Chao, R. Y. (1982). "Solute diffusivities in leaching processes." Food Technology, 2, 73-86.
- Shahidi, F., Arackchi, U. J. K., and Jeon, Y. J. (1999). "Food applications of chitin and chitosans." Trends in Food Science and Technology, 10, 37-51.
- Siew, D. C. W., Heilmann, C., Eastal, A. J., and Cooney, R. P. (1999). "Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3432-3440.
- Simal, S., Sanchez, E. S., Bon, J., Femenia, A., and Rossello, C. (2001). "Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer." Journal of Food Engineering, 48, 269-275.
- Singh, T. K., Fox, P. F., Hojrup, P., and Healy, A. (1994). "A scheme for fractionation of cheese nitrogen and identification of principal peptides." International Dairy Journal, 4, 111-122.
- Siragusa, G. R., Cutter, C. N., and Willett, J. L. (1999). "Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat." Food Microbiology, 16, 229- 235.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hunbinger, M. D., and Roques, M. A. (2001). "Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films." Food Hydrocolloids, 15, 423-432.
- Sobral, P. J. A., and Habitante, A. M. Q. B. (2001). "Phase transitions of pigskin gelatin." Food Hydrocolloids, 15, 377-382.
- Sommerer, N., Septier, C., Salles, C., and Le quéré, J. L. (1998). "A liquid chromatography purification method to isolate small peptides from goat cheese for their mass spectrometry analysis." Sciences des Aliments, 18, 537-551.

- Sorrels, K. M., Enigl, D. C., and Hatfield, J. R. (1989). "Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*." Journal of Food Protection, 52, 571-573.
- Sudirman, I., Mathieu, F., Michel, M., and Lefebvre, G. (1993). "Detection and properties of Curvaticin 13, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13." Current Microbiology, 27, 35-40.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. (1976). "Bacteriocins of Gram positive bacteria." Bacteriological review, 40, 722-756.
- Tagg, J. R. (1992). "Bacteriocins of Gram positive bacteria," Berlin Heidelberg (Germany).
- Thomas, L. V., and Wimpenny, J. W. T. (1996). "Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*." Applied and Environmental Microbiology, 62(6), 2006-2012.
- Thomas, I. V., Davis, E. A., Delves-Broughton, J., and Wimpenny, J. W. T. (1998). "Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria." Journal of Applied Microbiology, 85, 1013-1022.
- Tilney, L. G., Connelly, P. S., and Portnoy, D. A. (1990). "Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*." Journal of Cell Biology, 111, 2979-2988.
- Timm, A., and Steinbüchel, A. (1990). "Formation of polyesters consisting of medium chain-length 3-hydroxyalcanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonas." Applied and Environmental Microbiology, 56, 3360-ff.
- Turham, K. N., Sahbaz, F., and Güner, A. (2001). "A spectrophotometric study of hydrogen bonding in methylcellulose-based edible films plasticized by polyethylene glycol." Journal of Food Science, 66(1), 59-62.
- Turhan, M. (1996). "Modeling of salt transfer in white cheese during short initial brining." Netherlands Milk and Dairy Journal, 50, 541-550.
- Tütüncü, M. A., and Labuza, T. P. (1996). "Effect of geometry on the effective moisture transfer diffusion coefficient." Journal of Food engineering, 30, 433-447.
- Valenta, C., Christen, B., and Bernkop-Schnürch, A. (1998). "Chitosan-EDTA Conjugate: a novel polymer for topical gels." Journal of Pharmacy and Pharmacology, 50, 445-452.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hebraud, M., and Labadie, J. (1999). "Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*." Journal of Applied Microbiology, 86, 469-476.
- Velázquez de la Cruz, G., Torres, J. A., and Martín-Polo, M. O. (2001). "Temperature effect on the moisture sorption isotherms for methylcellulose and ethylcellulose films." Journal of Food Engineering, 48, 91-94.
- Viljanmaa, M., Södergrad, A., and Törmälä, P. (2002). "Lactic acid based polymers as hot adhesives for packaging applications." International Journal of Adhesion and Adhesives, 22,

219-226.

Wang, F. S. (2000). "Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged chinese-style sausage stored at 20°C." Meat Science, 56, 67-71.

Weng, Y. M., and Hotchkiss, J. H. (1992). "Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene containing the antimycotic imazalil." Journal of Food Protection, 55, 367-369.

Wilhoit, D. L. (1996). "Film and method for surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions." . US patent 5,573,797

Wilhoit, D. L. (1997). "Antimicrobial compositions, film and method for surface treatment of foodstuffs." . European Patent 0750853

Wong, D. W. S., Gastineau, F. A., Gregorski, K. S., Tillin, S. J., and Pavlath, A. E. (1992). "Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 540-544.

Yang, L., and Paulson, A. T. (2000). "Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film." Food Research International, 33, 571-578.

Zhou, Y. J., Luner, P., and Caluwe, P. (1995). "Mecanism of crosslinking of paper with polyfunctional carboxylic acids." Journal of applied polymers science, 58, 1523-1534.

## **Titre :**

Bio-emballage actif incorporant la nisine, diffusion de cette bactériocine en gel d'agarose.

## **Résumé :**

La croissance microbienne à la surface de produits alimentaires est une cause majeure d'altération des aliments et le développement de souches pathogènes telle que *L. monocytogenes* pose aujourd'hui encore des problèmes de santé publique. L'élaboration de matériaux d'emballages anti-microbiens et notamment anti-*listeria* est ainsi un domaine de recherche très prometteur. De plus, essentiellement pour des raisons environnementales, le développement de matériaux biodégradables ou comestibles est en plein essor. C'est dans cet objectif que des films à base d'un dérivé cellulosique, l'hydroxy propyl méthyl cellulose, ont été élaborés et étudiés et que la nisine, bactériocine produite par *Lactococcus lactis* a été introduite dans la matrice du film afin de synthétiser des bio emballages actifs sur certaines souches pathogènes. Pour limiter les phénomènes de transfert de vapeur d'eau à travers le film, deux approches basées sur l'introduction de lipides dans la matrice du film ou sur la réticulation du polymère cellulosique ont été conduites pour augmenter le caractère hydrophobe du film et diminuer le coefficient de transfert à la vapeur d'eau. Les propriétés mécaniques et la sensibilité des films à l'eau ont été appréhendées dans un double objectif : obtenir d'une part des films mécaniquement résistants et protégeant plus efficacement l'aliment emballé et moduler d'autre part la sensibilité des films à l'eau de façon à élargir leur champs d'utilisation en agroalimentaire. L'étude de la diffusion moléculaire a montré que la nisine diffuse selon un modèle Fickien et qu'elle reste essentiellement concentrée en périphérie, démontrant l'utilité des films, appliqués en surface, à mieux protéger l'aliment des attaques microbiennes.

## **Mots clés :**

*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, bactériocine, Nisine, emballage actif, anti-microbien, emballage biodégradable ou comestible, propriétés mécaniques, diffusion, Fick, agarose

## **Title :**

Edible bioactive film incorporating nisin, bacteriocin diffusion in agarose gel

## **Abstract :**

Active packaging is one of the innovative food packaging concepts, especially anti-microbial film or coating, that has been introduced as a response to microbial safety consumer demands. To control undesirable micro-organisms on food surface, anti-microbial agent can be incorporated into polymer matrix and bioactivity is based on the release of antimicrobial entities. So, anti-microbial activity of hydroxy propyl methyl cellulose films was obtained by incorporating nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* effective against Gram positive pathogenic bacteria such as *Listeria* strains. Then, to improve film moisture barrier properties, stearic acid was added into film formulation or film was cross-linked using citric acid in order to increase film hydrophobicity. Film mechanical properties and film water sensitivity were also investigated. At least, nisin diffusion in agarose gel was performed. Nisin diffusion was a Fickien molecular transfer and nisin low diffusion showed that nisin application through edible films concentrated nisin at food surface, protecting more efficiency food against bacteria.

## **Keywords :**

*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, bacteriocin, Nisin, actif packaging, anti-microbial, edible packaging, mechanical property, diffusion, Fick, agarose