



PROJET DE FIN D'ÉTUDES
PRESENTE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES
GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

Valorisation de l'algue rouge
“Gelidium sesquipedale” via des analyses
physico-chimiques et bactériologiques
de son extrait l'Agar-agar

Présenté par : **SAIDI Ranya**

Encadré par :

- Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna
- Mme. HAMASSI Ghizlane

Soutenu le : **19/07/2022**, Devant le jury compose de :

- Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna : FST-Fès
- Mme. HAMASSI Ghizlan : SETEXAM-Kenitra
- Pr. RACHIQ Saâd, FST-Fès
- Pr. Al FIGUIGUI Jamila : FST-Fès
- Pr. HALOUTI Said : FST- Fès

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma considération et mon amour éternel pour les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et mon bien être dans la vie par les meilleures conditions. Votre générosité et votre bonté ont toujours été un exemple pour moi.

A mes très chères sœurs et mon frère

A qui je dois ma reconnaissance, pour leurs encouragements, leur aide et leur soutien moral permanent.

A tous mes amis et mes collègues

Pour leur soutien, leur disponibilité et les agréables moments passés ensemble, et toute personne qui m'a aidé de loin ou de près par des idées ou des propositions pour la réussite de ce travail.

Et enfin à tous mes collègues étudiants du Master "Gestion et Conservation de la Biodiversité".

Remerciement

Toutes les louanges reviennent à Allah le tout miséricordieux, le très miséricordieux.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à **tous les Professeurs** de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, particulièrement à **mes chers professeurs** de la filière **Gestion et Conservation de la Biodiversité**.

Avant d'entamer ce rapport j'adresse mes plus profonds remerciements à mon encadrante **Pr. BOUCHAMMA El Ouazna** qui a mis tout son savoir-faire pour la réussite de ce projet de fin d'étude en me procurant conseil et assistance tant aux niveaux pédagogiques que techniques tout en m'incitant au travail.

Je tiens à remercier **Mme HAMASSI Ghizlan**, la coordinatrice du laboratoire de contrôle et d'analyse de la société **SETEXAM**, pour m'avoir soutenu par son aide, ses orientations et sa disponibilité ainsi que ses encouragements.

Je présente également mes vifs remerciements aux **Pr. Al FIGUIGUI Jamila, Pr. RACHIQ Saâd** et **Pr. HALOTI Said**, de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui m'ont honoré par leur présence à la soutenance de mon projet de fin d'études et par le temps qu'ils ont consacré à examiner et juger ce travail.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire **SETEXAM**, et les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, pour leur aide, soutien et encouragement ainsi pour tous les grands moments partagés ensemble qui ont rendu ce stage particulièrement agréable.

Résumé

L'exploitation des agarophytes constitue une part importante de l'économie du Maroc. A l'échelle industrielle, seule l'espèce *Gelidium sesquipedale* est actuellement exploitée pour l'extraction d'agar-agar. La présente étude effectuée au sein de la société SETEXAM, a pour objectif de contrôler la qualité de l'agar-agar extrait de *Gelidium sesquipedale*, en se référant aux normes internes de la société, du Codex Alimentarius et de la Pharmacopée Européenne. Une série d'analyses physicochimiques et bactériologiques ont été effectués sur 18 échantillons d'agar-agar, neuf échantillons destinés à l'utilisation alimentaire (Agar food) et neuf destinés à l'utilisation bactériologique (Agar bact). Les analyses physico-chimiques ont porter sur la mesure de plusieurs paramètres : le pH, la texture, la turbidité, la viscosité, l'humidité, la teneur en monoxyde de chlore, la dureté totale, la teneur en matière minérale, le taux de métaux lourds, le point de gélification, le point de fusion et la force du gel. Les analyses bactériologiques ont été effectuées dans le but de rechercher la présence de certains microorganismes dans les échantillons étudiés ; à savoir, la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les coliformes, les germes totaux, levures et moisissures, *Escherichia coli* et les salmonelles. Les résultats expérimentaux obtenus des analyses physico-chimiques et bactériologiques montrent que les cas de conformités sont plus élevés que celles de non-conformités. En effet, tous les paramètres physico-chimiques ont montré une conformité avec les normes, à l'exception le taux de monoxyde de chlore et de la force du gel dont les valeurs enregistrées dépassent celles de la norme exigée. Les analyses bactériologiques ont montré que les échantillons étaient exempts de germes totaux, d'*Escherichia Coli* et de *Salmonelles* et de levures et moisissures. Par contre, le dénombrement de FMAT et de coliforme a révélé une présence de ces microorganismes avec des taux de non-conformité de 33,34% et 27,78% respectivement, témoignant d'une éventuelle contamination.

Mots clés : Agarophytes, *Gelidium sesquipedale*, Agar-agar, Analyses physicochimiques, Analyses bactériologiques, Microorganismes, Conformité, Non-conformité.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de *Gelidium sesquipedale*

Tableau 4 : Taux des métaux lourds des neuf échantillons d'agar food étudiés.

Tableau 5 : Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale dans les échantillons d'agar bact

Tableau 6 : Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale dans les échantillons d'agar food

Tableau 7 : Dénombrement des coliformes totaux dans les échantillons d'agar bact

Tableau 8 : Dénombrement des coliformes totaux dans les échantillons d'agar food

Tableau 9 : Dénombrement des thermorésistant mésophiles dans les échantillons d'agar bact

Tableau 10 : Dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons d'agar bact

Tableau 11 : Dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons d'agar food

Tableau 12 : Recherche d'*Escherichia Coli* dans les échantillons d'agar food

Tableau 13 : Recherche d'*Escherichia Coli* dans les échantillons d'agar food

Tableau 14 : Recherche des Salmonelles dans les échantillons d'agar food

Tableau 15 : Recherche des Salmonelles dans les échantillons d'agar food

Liste des figures

Figure 1 : Organigramme de la société SETEXAM.

Figure 2 : Site de récolte du *Gelidium* pour SETEXAM.

Figure 3 : Différence morphologique entre une algue et une plante (Seki et al., 1998).

Figure 4 : Richesse spécifiques sur les façades maritimes au Maroc (ONEM, 1998).

Figure 5 : Production mondiale des algues en million de tonnes (FAO, 2016).

Figure 6 : Morphologie d'un thalle de *Gelidium sesquipedale*

Figure 7 : Distribution géographique de *Gelidium sesquipedale* (Fischer et al., 1987 ; Guiry, 2011).

Figure 8 : Agar-agar en poudre.

Figure 9 : Structure de l'agarose et de l'agaropectine (Kohajdová et Karovičová, 2009)

Figure 10 : Mécanisme de gélification de l'agar. (FAO, 1990).

Figure 11 : Procédure de fabrication d'agar-agar à partir du *Gelidium sesquipedale*

Figure 12 : Taille du marché de l'agar-agar à l'horizon 2026 (ANDA, 2017).

Figure 13 : Principales applications de l'agar (Perèz, 2009).

Figure 14 : Cellules de levures en microscopie électronique.

Figure 15 : Image microscopique de moisissures ou de champignons et spores en croissance.

Figure 16 : Souche d'*E. Coli* vue au microscope.

Figure 17 : Souche de Salmonelle vue au microscope.

Figure 18 : Dessiccateur à résistance chauffante LP16.

Figure 19 : Four industrielle Nobertherm réglé à 550°C.

Figure 20 : Spectrométrie à plasma à couplage inductif.

Figure 21 : Appareil "Nikan"

Figure 22 : Taux de l'humidité dans des échantillons d'agar.

Figure 23 : Taux de la matière minérale dans les échantillons d'agar.

Figure 24 : Teneur de l'agar Food en Monoxyde de Chlore.

Figure 25 : Concentration totale en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} dans les échantillons d'agar bact..

Figure 26 : pH des échantillons d'agar Food et bact.

Figure 27 : Viscosité des échantillons d'agar.

Figure 28 : Turbidité des échantillons d'agar.

Figure 29 : Point de gélification des échantillons d'agar.

Figure 30 : Point de fusion des échantillons d'agar.

Figure 31 : Force de gélification des échantillons d'agar.

Figure 32 : Norme générale codex pour les additifs alimentaires.

Figure 33 : Tableau de suivi des exigences applicables par SETEXAM.

Liste des abréviations

UFC : unités formant des colonies

TNTC: Too Numerous To Count

FMAT: Flore Mésophile Aérobie Totale

E. Coli : *Escherichia Coli*

ClO⁻ : Monoxyde de chlore

Ppm : partie par millions

Cps : Centipoises

NTU : Unité de Turbidité Néphélométrique

ICP : Plasma à couplage induit

PCA: plate count agar

BN : Bouillon Nutritif

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

TSB: Bouillon Trypticase Soja

TSA : Trypticase Soja Agar

EMB: Eosine-Bleu de Méthylène

TBX : Tryptone Bile Glucuronique

SS: Salmonella-Shigella 1gar

XLD : Xylose Lysine Deoxycholate Agar

VRBL : Violet Red Bile Lactose Agar

RM : Rouge de Méthyle

VP : Voges-Proskauer

Bact. : Bactériologique

Food : Alimentaire

TBALE DE MATIERE

INTRODUCTION GENERALE
PRESENTATION DE L'ENTREPRISE
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIE
I. CARACTERISTIQUES DES ALGUES	6
1. Généralités	6
2. Classification.....	7
3. Espèces marines présentes sur le territoire national	7
4. Facteurs influençant la répartition des algues	8
5. Zonation des algues	8
6. Intérêt économique	9
II. IDENTIFICATION DE <i>GELIDIUM SESQUIPEDALE</i>	10
1. Position systématique	10
2. Biologie.....	11
3. Distribution géographique et bathymétrie.....	11
4. Industrie de <i>Gelidium sesquipedale</i>	13
III. AGAR	14
1. Définition.....	14
2. Agarophytes.....	14
3. Propriétés physico-chimiques.....	15
4. Structure chimique.....	15
5. Composition inorganique	16
6. Mécanisme de gélification	16
7. Procédure de fabrication de l'agar	17
8. Marché de l'agar	18
9. Applications de l'agar	19
IV. MICROORGANISMES RECHERCHES DANS L'AGAR-AGAR	22
1. Flore Mésophile Aérobie Totale.....	22
2. Flore fongique	23
3. Germes totaux.....	24
4. Coliformes	25
5. <i>Escherichia coli</i>	25
6. <i>Salmonelles</i>	26
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES
I. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	27
1. Test de sédimentation	27
2. Taux d'humidité.....	27
3. Cendres totales	28
4. Trace d'eau de Javel.....	29
5. Méthode d'ICP	30
6. Détermination du pH de la solution d'agar.....	31
7. Test de viscosité	31
8. Turbidité	31
9. Point de gélification.....	32
10. Point de fusion.....	32
11. Force de gélification	32
II. ANALYSES BACTERIOLOGIQUES	33
1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.....	33
2. Dénombrement des coliformes	34

3.	<i>Dénombrement des germes totaux</i>	35
4.	<i>Dénombrement des levures et moisissures</i>	35
5.	<i>Recherche d'Escherichia Coli</i>	36
6.	<i>Recherche de Salmonelles</i>	37
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION		
I.	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES	40
1.	<i>Test de sédimentation</i>	40
2.	<i>Taux d'humidité</i>	40
3.	<i>Cendres totales</i>	41
4.	<i>Trace de Javel</i>	41
5.	<i>Technique d'ICP</i>	42
6.	<i>PH</i>	42
7.	<i>Viscosité</i>	43
8.	<i>Turbidité</i>	43
9.	<i>Point de gélification</i>	44
10.	<i>Point de fusion</i>	44
11.	<i>Force de gel</i>	45
I.	ANALYSES BACTERIOLOGIQUES	46
1.	<i>Dénombrement de FMAT</i>	46
2.	<i>Dénombrement des coliformes</i>	47
3.	<i>Dénombrement des germes totaux</i>	47
4.	<i>Dénombrement des levures et moisissures</i>	48
5.	<i>Recherche de Escherichia Coli</i>	49
6.	<i>Recherche des salmonelles</i>	50
7.	<i>Traitement de la non-conformité</i>	51
CONCLUSION GENERALE		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		
ANNEXES		

Introduction générale

Le Maroc, avec sa double façade Atlantique et Méditerranéenne, qui s'étale sur plus de 3500 Km, offre une richesse en matière algale inestimable de point de vue économique et qui pourra fournir la solution à de nombreux problèmes rencontrés dans plusieurs secteurs ; Agro-alimentaire, pharmaceutique, médicinal..., comme elle pourra faire l'objet d'un développement socio-économique régional voire même national. Malgré la grande diversité algale des côtes marocaines, un seul genre est exploité pour l'extraction de l'agar-agar ; *Gelidium* est la première source de matière première de l'industrie marocaine de production d'agar et représente à elle seule environ 90 % de la collecte des algues marines traitées (**Mouradi et al., 2007**).

L'exploitation du *Gelidium* a débuté au Maroc en 1949 et elle est orientée vers la production et l'exportation de l'agar ou de la gélose (**Hanif et al., 2014**). *Gelidium sesquipedale* est l'espèce la plus recherchée pour son rendement intéressant en agar 25 à 30% du poids sec et c'est la seule espèce d'algue qui est réglementée ; la période de récolte, qui est rarement respectée, est limitée entre juin et octobre. Cette ressource naturelle fait l'objet d'une exploitation intensive et présente d'importants signes de dégradation (**Givernaud et al., 2005**). Les tentatives pour la cultiver dans des bacs/bassins ont été réussies sur le plan biologique, sans l'être en général sur le plan économique.

L'industrie de l'agar a permis le développement, tout le long des côtes marocaines, d'une activité de récolte qui assure un emploi permanent ou temporaire à plus de 8000 personnes et ramène plus de 20 millions de dollars par an (**Mouradi et al., 2006**). Environ 80% de l'algue rouge est transformé en agar-agar à Setexam, l'unique usine de transformation du pays, situé à Kénitra. Il traite chaque année environ 4 000 tonnes de matières premières et produit environ 1095 tonnes d'agar-agar dirigée vers l'industrie alimentaire et pharmaceutique, et il génère un chiffre d'affaires à l'exportation d'environ 200 millions de MAD en moyenne, cette industrie place le Maroc parmi les premiers producteurs mondiaux. (**MPM, 2010**). L'agar-agar est un gélifiant ou phycocolloïde formé de polysaccharide hydrosoluble, localisés au niveau des parois cellulaires du *Gelidium*, très demandée sur le marché extérieur, (**Hanif et al., 2014**), il est extrait de l'algue par simple ébullition sous pression, le produit final est une poudre blanche qui a plusieurs applications.

L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de contamination que l'on peut observer dans l'agar-agar pour pouvoir le considérer comme de qualité microbiologique acceptable. Ces limites sont le plus souvent exprimées en UFC (unités formant des colonies). Il est très largement utilisé dans le cadre du contrôle officiel ainsi que des autocontrôles mis en œuvre par les industriels pour garantir la salubrité des produits qu'ils commercialisent.

C'est pour cela L'entreprise SETEXAM s'est penchée sur l'amélioration de son système de maintenance, de production et de qualité pour garder une image forte en répondant à la fois aux attentes du client et aux normes en vigueur.

L'objectif global de ce travail consiste à valider la conformité de l'agar de *Gelidium* pour garantir une qualité supérieure et assurer une salubrité irréprochable aux consommateurs, qui répond à la réglementation marocaine, aux cahiers d'analyses spécifique fournis par le client et également au Système Management Qualité et aux exigences réglementaires et légales (Food Chemical CODEX, et PHARMACOPEE européenne), ceci par :

- La détermination de la nature et la composition physico-chimique de l'agar du *Gelidium*.
- Le dénombrement des flores mésophiles aérobies totales, des coliformes, des levures et moisissures et des germes totaux.
- La mise en évidence de la présence ou l'absence de Salmonelle et *d'Escherichia Coli* dans l'agar du *Gelidium*.

Ce travail est divisé en trois parties : la première est consacrée à une synthèse bibliographique concernant les algues et l'agar extrait du *Gelidium sesquipedale*, ainsi que les micro-organismes recherchés. La deuxième partie décrit les méthodes utilisées pour les analyses physico-chimiques et microbiologiques, et la troisième partie présente les différents résultats obtenus et la discussion.

Présentation de l'entreprise

SETEXAM est une entreprise familiale créée en 1960, spécialisée dans le ramassage des algues marines *Gelidium sesquipedale* et la fabrication d'Agar-agar (E406) qu'elle commercialise sous différentes marques déposées selon leur domaine d'utilisation, les clients de SETEXAM sont dominés par trois catégories : Industrie alimentaire, industrie pharmaceutique et la préparation de milieux de cultures microbiologiques.

La société SETEXAM est une des leaders mondiaux dans son domaine d'activité, dirigée par le PDG monsieur Rachid Lebbar, située au quartier industriel El Assam km 7 de Tanger Kenitra avec un chiffre d'affaires de 100, 000,000 à 500, 000,000DH et un capital de S.A. 120, 000,000.00DH.

La société s'est lancée dans l'exportation de tous ses produits vers le monde entier. Ses clients restent principalement les Japonais, les Américains et les européens ce qui lui confère sa renommée internationale. Avec une production de plus de 1000 tonnes par an, elle occupe la 3ème place mondiale parmi les entreprises qui produisent l'agar-agar.

En effet, l'entreprise est certifiée par l'ISO 9001 ; Norme Internationale de Management de la Qualité, ISO 14001 et ISO 22000. Ainsi qu'elle a obtenu un certificat sanitaire par l'Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA) en 2014, certificat du Label HALAL par l'Institut Marocain de Normalisation (IMANOR) en 2016 et certificat du Label BIO par le ministère de l'Agriculture qui permet d'identifier les produits d'origine agricole destinés à l'alimentation humaine ou animale et qui respectent, depuis le producteur jusqu'au consommateur, la réglementation et le contrôle biologique.

SETEXAM est dotée d'une structure organisationnelle interne lui permettant de définir clairement les tâches de chaque personne au sein de l'entreprise, qui sont décrites sur des fiches de fonction selon un organigramme qui gère et définit les niveaux de responsabilité et la hiérarchie au sein de l'entreprise (Figure 1).

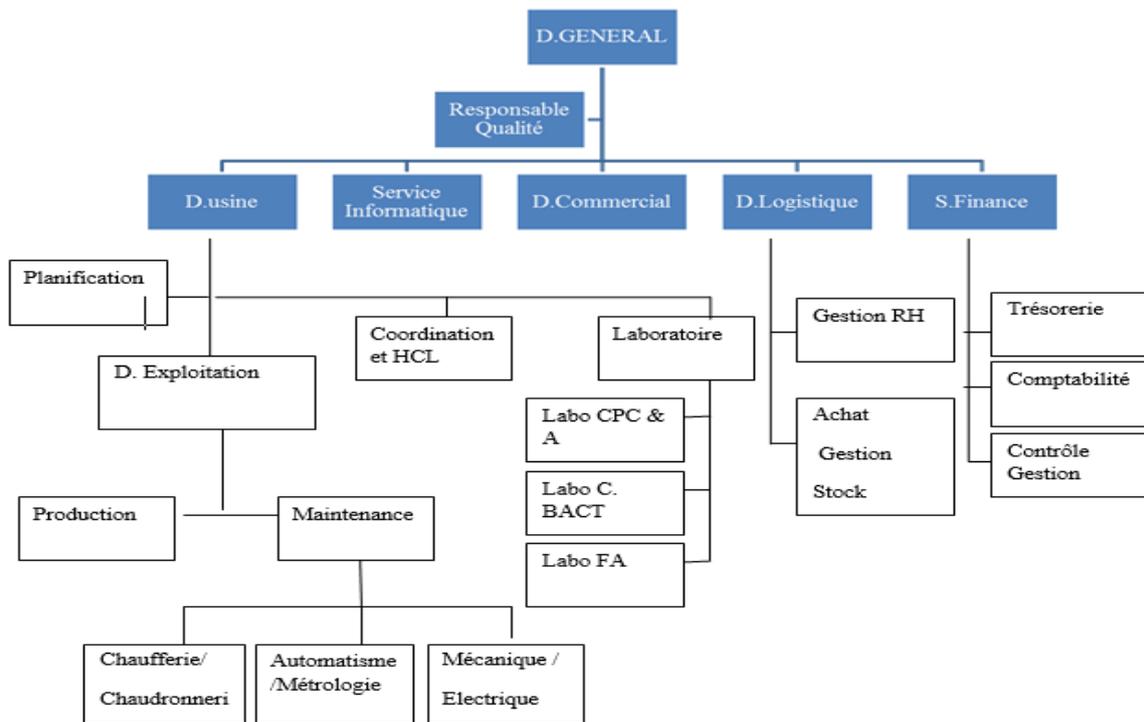


Figure 1 : Organigramme de la société SETEXAM

Le stage se déroule dans le Laboratoire de la société SETEXAM. De ce fait, on présenterait ci-dessous ces différentes activités permettant ainsi une vision claire du cœur du métier.

Le genre-espèce le plus utilisé à la SETEXAM est le *Gelidium sesquipedale*, dont la collecte est faite par ses trois agences situées à El Jadida, Safi et Essaouira qui opèrent tout au long du littoral atlantique marocain, et qui représente 90% de la collecte des algues marines.

Les algues récoltées, sont ramenées à terre, séchées au soleil et étalées sur le sable pendant une à deux jours, avant d'être stockées et transférer par camion aux trois agences de SETEXAM afin de trier les impuretés et divers déchets. Les algues sont bien séchées, emballées et stockées en vue de l'expédition vers le centre SETEXAM de Kenitra pour la transformation.

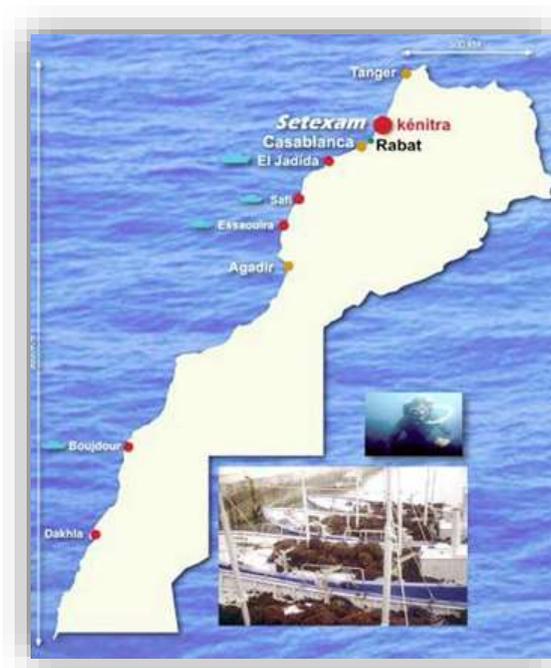


Figure 2 : Site de récolte du *Gelidium* pour SETEXAM.

Le procédé de fabrication effectué dans l'unité de production consiste à traiter les *Gelidium* pour en extraire l'agar-agar. Les échantillons de l'agar sont mis dans des sachets en plastique stériles pour servir aux analyses physico-chimiques et microbiologiques au laboratoire.

Le laboratoire d'analyse et de contrôle est une partie très importante dans l'entreprise, a le rôle de contrôler et valider le produit en cours de production et le produit fini. Il doit aussi être capable de produire des résultats techniquement valables en assurant la fiabilité des méthodes et des ressources par un encadrement et une formation continue.

- **Laboratoire de contrôle physico-chimique**

Ce laboratoire s'occupe d'analyser les différents paramètres physico-chimiques de l'agar, tels que la force du gel d'agar, le pH, la viscosité, la turbidité et le taux de l'humidité, des métaux lourds, ainsi la concentration en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} .

- **Laboratoire de contrôle bactériologique**

Ce laboratoire a pour objectif d'assurer le contrôle de la qualité bactériologique, ainsi que la validation des lots destinés aux clients.

Partie I : Revue bibliographie

I. Caractéristiques des algues

1. Généralités

Les algues sont parmi les membres les plus primitifs du règne végétal, après les champignons elles regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers, dont le cycle de vie se déroule le plus souvent en milieu aquatique (**Jean et Yann, 2002**). Elles comptent plus de 130.000 espèces dans le monde (**Perez, 1997**), et peuvent être classées en une dizaine d'embranchements selon les caractéristiques structurales, les polysaccharides de réserves et la composition pigmentaire (**Ruiz, 2005**).

Les algues se distinguent des autres végétaux par leur thalle et appareil végétatif peu évolué (Figure 3). Elles sont des plantes sans feuilles, tiges ou racines, d'où leur nom thallophytes. Elles ont des formes et des dimensions très variables, elles peuvent être unicellulaire ou pluricellulaire, mais elles ont toutes des caractères communs. (**Anning et al., 1982**).

Les algues sont des eucaryotes, leurs cellules comportent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures (**Garon, 2004**), elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés, comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs (**Cervantes et Gutierrez, 1994**).

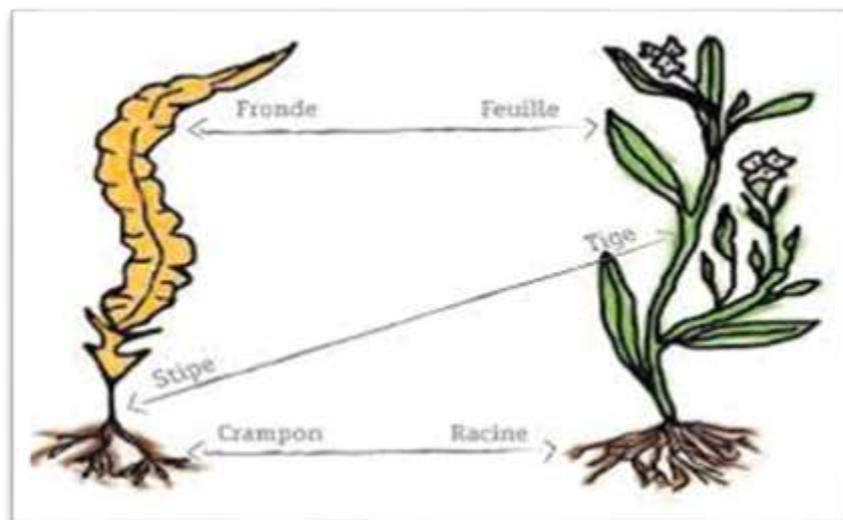


Figure 3 : Différence morphologique entre une algue et une plante (**Seki et al., 1998**).

2. Classification

Les algues sont généralement classées sur la base de leurs pigmentations qui permet de définir quatre grands groupes :

2.1. Chlorophytes

Les algues vertes forment une classe extrêmement variée datent d'au moins 600 Ma. Leurs plastides sont colorés en vert car elles possèdent les chlorophylles (a) et (b) qui assurent la photosynthèse l'exposition prolongée aux fortes intensités lumineuses provoque la synthèse de pigments photoprotectants (caroténoïdes). Les chlorophycées jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant aussi la vie animale. **(Baker et al., 1994)**.

2.2. Chromophytes

La majorité des algues brunes présentent une couleur brunâtre qui dû à l'association de pigments surnuméraires dominants xanthophylle et la fucoxanthine, qui masque les autres pigments (chlorophylle (a), (c) et β -carotène) **(Pérez, 1997)**.

2.3. Rhodophytes

Les algues rouges forment un groupe très diversifié, présente jusqu'à 6000 espèces réparties en 680 genres, la plupart d'entre eux sont fixées aux rochers ou à d'autres algues, mais certaines sont flottantes **(Raven et al., 2003)**. Ces végétaux possèdent que de la chlorophylle (a), mais élaborent deux protéines colorées ; la phycoyanine (bleue) et la phycoérythrine (rouge) qui impose sa teinte rouge.

2.4. Cyanophytes

Algues bleues ont été trouvées parmi les plus anciens fossiles de la terre, sont des bactéries Photosynthétiques, possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycoyanines) et rouges (Phycoérythrines) qui masquent la chlorophylle a. Les cyanobactéries ont été liées à des maladies humaines et animales dans le monde entier lorsqu'elles prolifèrent dans le milieu, lors d'efflorescences algales, elles libèrent des cyanotoxines. **(Carmichael et Falconer, 1993)**.

3. Espèces marines présentes sur le territoire national

Le Maroc, par sa position géographique, est situé au confluent des mers et des continents. Ses deux côtes de 3446 km connaissent un important trafic maritime et une grande activité socioéconomique. L'étude des algues marines a mis en exergue une richesse spécifique de 489 espèces : 303 Rhodophyceae, 99 Phaeophyceae, 87 Chlorophyceae et 12 Cyanophyceae. La

répartition géographique de cette flore révèle que 381 espèces (75%) sur la façade méditerranéenne et 323 espèces (64%) sur la côte Atlantique (Figure 8) (ONEM, 1998).

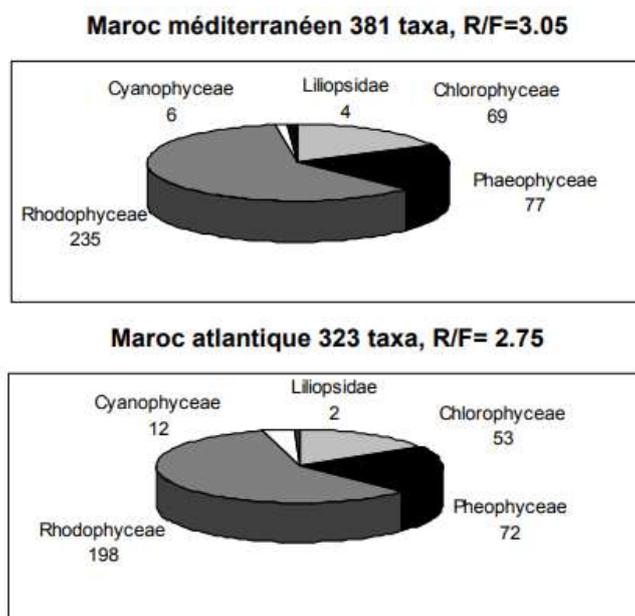


Figure 4 : Richesse spécifique sur les façades maritimes du Maroc (ONEM, 1998)

4. Facteurs influençant la répartition des algues

Comme tout organismes marins, les algues sont soumises à un ensemble de conditions propres à ce milieu et qui constituent leur environnement (Ceseau et al., 1964). La répartition des algues le long des côtes est dépendante d'un certain nombre de facteurs écologiques que l'on peut grouper en :

- Facteurs physiques : Le substrat, la température et la lumière.
- Facteurs chimiques : La salinité, le pH, l'oxygène et les sels nutritifs
- Facteurs dynamiques : L'agitation de l'eau et l'émersion.
- Facteurs biotiques : L'association avec d'autres espèces (Algues épiphytes ou épizoïques).

5. Zonation des algues

Les algues sont susceptibles de peupler les milieux les plus divers de la biosphère à cause de leur diversité et leurs exigences écologiques, elles jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre écologique du milieu aquatique, notamment le milieu marin où elles sont les principales responsables de la production primaire de toutes les chaînes alimentaires.

Au niveau du système littoral photique, la diversité des conditions de vie permet de distinguer un certain nombre de étages où les conditions écologiques varient régulièrement entre deux niveaux critiques, ces étages peuvent être divisés en :

- L'étage supralittoral : C'est la limite entre la végétation aérienne et niveau moyen des hautes mers de vive eau.
- L'étage littoral (Intercotidal) : C'est la partie de la côte exposée à des alternances assez régulières d'émersion et submersion.
- L'étage infralittoral situé au-dessous du niveau inférieur des basses mers de vive eau. Il est subdivisé en deux sous étages, l'un superficiel (photophile : Affinité des espèces pour la lumière) et l'autre profond (sciaphile : Affinité des espèces pour l'ombre).

En effet, dans le milieu marin certaines espèces peuvent se rencontrer dans des biotopes très éloignés de leur biotope moyen. Par exemple, une espèce sciaphile s'installe normalement à des profondeurs de 20 à 40m mais on peut la rencontrer au niveau des biotopes superficiels calmes et ombragés du mode battu ou il y a un renouvellement de l'eau au contact de l'algue et un rétablissement périodique des paramètres physico-chimiques. L'espèce retrouve à ce niveau des conditions proches de la sciaphile infralittorale. **(ONEM, 1998).**

En Méditerranée l'étagement algologique est beaucoup moins clair qu'en Atlantique à cause de la faible amplitude des marées et la morphologie côtière. Ainsi que les impacts directs ou indirects sur cette frange du littoral réduisent la diversité et diminuent le stock en espèces opportunistes d'intérêt économique et/ou écologique **(ONEM, 1998).**

6. Intérêt économique

Les algues représentent actuellement une source nutritionnelle et un produit industriel à valeur montante. Les populations littorales de tous les pays maritimes ont eu recours aux algues, soit pour des fins thérapeutiques, ou pour leur alimentation ou encore pour enrichir leurs terres. La production mondiale d'algues marines occupe environ 20% de la production aquacole marine mondiale en poids, avec une valeur annuelle de 6,7 milliards de dollars en 2013 **(FAO, 2016).** Il est passé de 11 504 milliers de tonnes en 2005 à 28 500 kilotonnes en 2015.

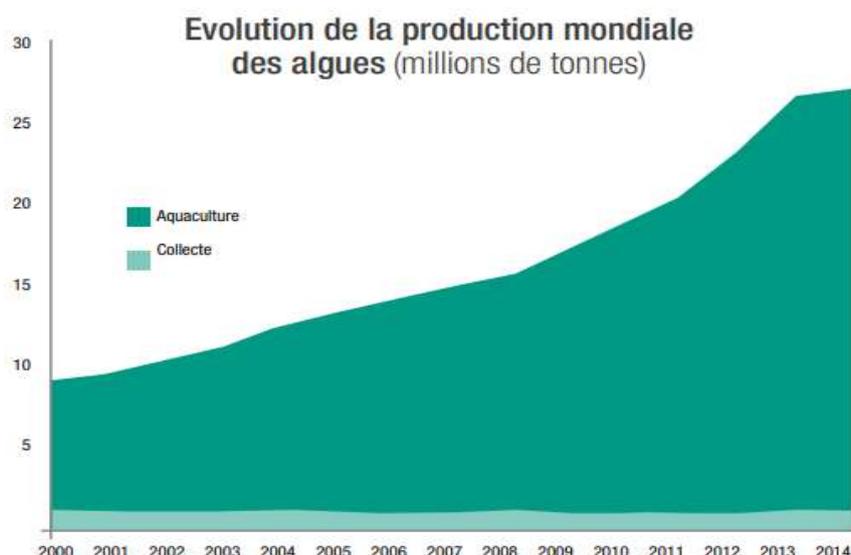


Figure 5 : Production mondiale des algues en million de tonnes (FAO, 2016).

Au Maroc, Les algues sont très peu connues dans nos habitudes alimentaires, c'est au début des années 1960, lorsque les industriels commencent à redécouvrir les vertus des substances naturelles que l'intérêt des algues commence à surgir. Aujourd'hui, les algues constituent un enjeu majeur de développement économique. En 2009, la production mondiale des macroalgues a atteint plus de 15 millions de tonnes (FAO, 2012), avec un taux de croissance estimé à 5,7 % par an (El Mtili et al., 2013).

II. Identification de *Gelidium Sesquipedale*

1. Position systématique

Sur le plan systématique, *Gelidium sesquipedale* occupe la position suivante (Perèz, 2009).

Tableau 1 : Classification de *Gelidium sesquipedale*

Règne	Plantae
Embranchement	Rhodophyta
Sous-embranchement	Rhodophytina
Classe	Florideophyceae
Sous-classe	Rhodymeniophycidae
Ordre	Gelidiales
Famille	Gelidiaceae

Genre	<i>Gelidium</i>
Espèce	<i>Gelidium sesquipedale</i>

2. Biologie

Gelidium sesquipedale est une algue rouge appartenant à la classe des Rhodophycées, de couleur rouge sombre et de taille variable entre 10 à 40 cm, est une algue robuste de consistance cartilagineuse non cassante (Figure 6), constitué de frondes comporte un ensemble d'axes principaux à croissance illimitée porteurs de ramifications latérales à croissance limitée, ce qui donne au thalle une forme pyramidale. Les frondes sont érigées regroupées en touffes rigides, s'élevant à partir de filaments rampants ; stolons qui assurent la fixation de l'algue au substrat. (Mouradi et al., 2007).

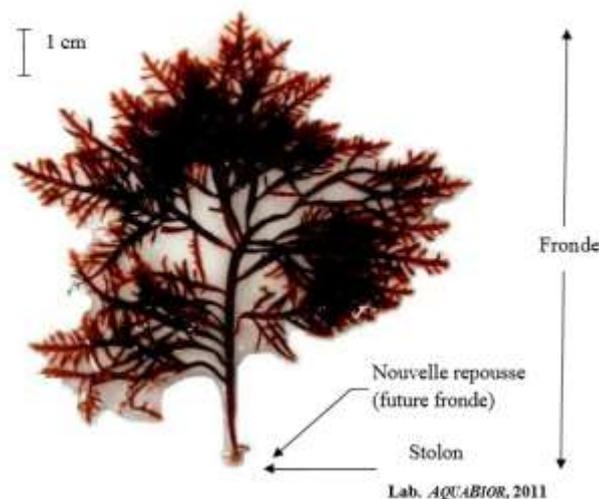


Figure 6 : Morphologie d'un thalle de *Gelidium sesquipedale*

La durée de vie de cette algue est de trois jusqu'à six ans, se reproduit par voie sexuée et par multiplication végétative. Cette espèce est pérenne diplobionte a cycle de vie trigénétique, de type haplodiplophasique, avec des phases tétrasporophytes et gamétophytes isomorphes qui sont morphologiquement identiques. (Zidane, 2010).

3. Distribution géographique et bathymétrique

Gelidium sesquipedale est une espèce originaire de l'atlantique boréal (Riadi, 1998). Cette espèce est observée le long des côtes atlantiques européennes, depuis la grande Bretagne, la France, l'Espagne, le Portugal, le détroit de Gibraltar jusqu'au Maroc ainsi qu'aux Açores, aux

iles Canaries et aux îles de Cap-Vert. (Guiry, 2011) jusqu'au Mauritanie (Ouhssine et al., 2006). Elle a été signalée au Maroc, en Corse, en Italie et en Algérie (Willam et al., 1994).



Figure 7 : Distribution géographique de *Gelidium sesquipedale*
(Fischer et al., 1987 ; Guiry, 2011)

3.1. Ecologie

Gelidium sesquipedale est une espèce sciaphile (Riadi, 1998), exclusivement marine et peuple naturellement les rochers et elle peut être blanchie par la forte intensité lumineuse dans les latitudes tropicales (McHugh, 2003). Elle se fixe sur les roches battues de la zone médiolittorale inférieure et infralittorale (Ouhssine et al., 2006). En général, les espèces du genre *Gelidium* se développent mieux à température comprise entre 15-20 °C, mais peuvent tolérer des températures plus élevées. Elles peuvent survivre dans des conditions pauvres en nutriments et certaines espèces s'adaptent à la diminution ou à l'élévation de salinité (McHugh, 2003).

Au Maroc, cette espèce est très fréquente de Larache à Lâayoune sur les rochers de la zone littorale inférieure et infralittorale (ONEM, 1998).

3.2. Récolte

Gelidium sesquipedale est la première source de matière première de l'industrie marocaine de production d'agar, et représente à elle seule environ 90 % de la collecte des algues marines traitées. Bien que cette espèce soit présente tout le long du littoral, elle ne forme de peuplements denses qu'en quelques points de la côte (Kabbaj et al., 1994). La majeure partie des algues exploitées se situe entre Larache et Laayoune, et plus particulièrement sur les côtes de Doukkala (Sabour, 2011).

L'exploitation du *G. sesquipedale* a débutée à El Jadida en 1949, où on a trouvé en abondance rejetée en épave par la mer ou sur les rochers du médiolittorale. Lors des périodes de récolte, la

zone des balancements de marées est exploitée par une main d'œuvre hétérogène (petits pêcheurs, agriculteurs, retraités, femmes et enfants), ce sont quelques milliers de riverains démunis et quelques centaines de barques qui charrient à l'aide de filets, une biomasse algale avoisinant les 14000 tonnes, générant ainsi un chiffre d'affaires dépassant les 30 millions dhs. À l'échelle nationale, les quantités débarquées dépassent les 8.000 tonnes sèches par an selon les chiffres officiels, alors qu'ils ne doivent pas dépasser les 5.000 tonnes durant la même période (AFP, 2015).

4. Industrie de *Gelidium sesquipedale*

L'industrie de *Gelidium sesquipedale* s'est développé, tout au long des côtes du Maroc, une activité de récolte qui assure un emploi permanent ou temporaire à plus de 8000 personnes et constitue un chiffre d'affaires à l'exportation de plus de 20 millions de dollars par an. Cette industrie place le Maroc parmi les premiers producteurs mondiaux avec 1095 tonnes d'agar agar et 200 millions MAD comme chiffre d'affaires (MPM, 2010).

4.1. Surexploitation

Les Rhodophycées sont considérées comme un groupe très menacé à cause de l'arrachage manuel pour l'exploitation industrielle. Cependant, il a été montré que les champs d'agarophytes souffrent d'une surexploitation importante liés à la diminution des rendements des champs exploités. Par conséquent, les champs d'algues constamment soumis à un effort de pêche ont vu leur densité de biomasse moyenne diminuer et passer de 1,1 kg/m² en 1999 à 500 g/m² en 2006 (IFREMER et al., 2006).

Cette diminution est due au non-respect de la période de collecte autorisée par la législation en vigueur qui est déterminée en trois mois de la collecte des *Gelidium sesquipedale* de 1 Juillet à 30 Septembre dans l'arrêté n° 1-118-93, BO n° 4231 du 1er décembre 1993 page 682. Malgré cette irresponsabilité de la part des plongeurs, la MPM a déclaré aussi l'arrêté N° 1511-04 en 6 août 2004 qui a déterminé la limite de la production à 6000 tonnes (ONEM, 1998).

D'autres problèmes d'ordre organisationnel entravent la gestion adéquate de ces champs et manque de matériels mis à la disposition du DPM pour le contrôle de cette activité qui s'étend sur 150 km de côte. Cette espèce, malgré sa grande régénération végétative, sa productivité d'une biomasse élevée, est devenue ces dernières années très rares sur une grande partie du littoral où elle était auparavant exploitée à 0.80 MAD/kg de matière séché contre 7 à 12 MAD/kg actuellement. Elle est la seule la flore marine marocaine, que la loi essaye de protéger de l'intense exploitation destructive.

III. Agar

1. Définition

L'agar est l'un des constituants de la paroi cellulaire de certaines espèces d'algues rouges appartenant aux familles des *Gelidiacées*, notamment les algues du genre *Gelidium* (**Craigie, 1990 ; Murano et al., 1998**). Il fut découvert au XVII^{ème} siècle par hasard vers 1658 par un Japonais, Minoya Tarozaemon. Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle que l'agar est connu dans le monde occidental (**FAO, 1990**). Il a été découvert, environ 200 ans avant que les deux autres phycolloïdes ; le carraghénane et l'alginate ont été découverts (**Armisen, 1997**). En fait, le mot « agar » est un terme malaisien et la double forme, « agar-agar », est utilisé pour décrire la gelée (**Imerson, 2011**).



Figure 8 : Agar-agar en poudre.

L'agar-agar est un produit gélifiant neutre au goût qui peut être mélangé à de nombreux ingrédients, c'est un additif alimentaire d'usage universel, référencé E406 et il est enregistré sous le numéro 9002-18-0 dans le registre du Chemical Abstracts Service (**Armisen et al, 2000**). Il est considéré comme "GRAS" (Generally Recognized as Safe, généralement reconnue comme sûr) par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) qui a indiqué que la concentration maximale admissible dépend de l'application (**McHugh, 2003**).

2. Agarophytes

Les algues appartenant au genre *Gracilaria* et *Gelidium* sont les principales algues utilisées pour la production commerciale de l'agar. *Gracilaria* est devenue l'algue préférée pour la fabrication de l'agar destiné surtout aux usages alimentaires, parce qu'elle est cultivée avec succès au Chili et en Indonésie. *Gelidium* jusqu' à maintenant n'a pas été commercialement cultivée, mais elle continue d'être l'algue préférée pour produire l'agar de qualité alimentaire, bactériologique et pharmaceutique. Les teneurs en agar par rapport au poids sec varient

fortement en fonction de l'espèce algue, du lieu et de la saison avec une teneur de l'ordre 19 et 29 % (Perèz,1992).

3. Propriétés physico-chimiques

L'agar est un liant et gélifiant végétal parfait pour remplacer la gélatine animale. Cette substance s'utilise en très petites quantités, il est inodore ou présente une légère odeur caractéristique, il peut donc être utilisé pour gélifier les produits alimentaires sans en altérer la couleur et la saveur. Il en rehausse le goût en agissant comme un fixateur d'arôme à long terme. L'indice de réfraction peut être augmenté par l'adjonction de sucre (glucose) ou de glycérine, ce qui donne un éclat attirant (Rochas et al., 1989).

Il s'agit en fait d'un gélifiant alimentaire caractérisé par un faible apport calorique dont la digestion ne se fait pas par l'estomac, ni par l'intestin et qui est peu fermentescible, il est riche en iode et en oligo-éléments et il est largement utilisé pour ses propriétés laxatives pour les troubles intestinaux.

Le gel d'agar a une excellente réversibilité, on peut le faire fondre et le faire gélifier de façon répétitive sans rien perdre de ses propriétés originelles. Il supporte un traitement thermique au-dessus de 100°C ce qui permet une bonne stérilisation. Il peut être utilisé dans une large gamme de pH allant de 5 à 8 et parfois au-delà (Mouradi, 1992). Il est résistant à l'état humide et friable à l'état sec. Il peut être jaunâtre orange, jaunâtre gris, jaunâtre à blanc ou incolore. L'agar est commercialisé sous formes de sous forme de poudre, de flocons, de bâtonnets ou de films.

4. Structure chimique

L'agar-agar se compose de deux polysaccharides ; l'agarose et l'agaropectine.

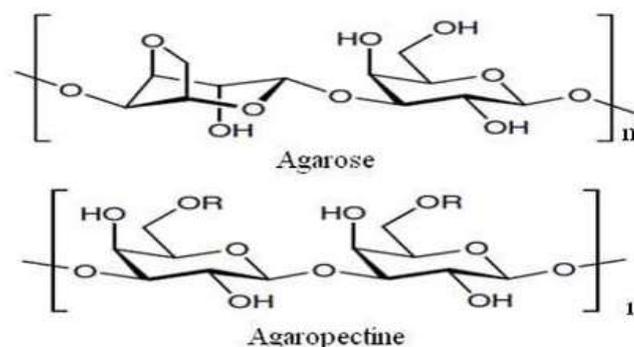


Figure 9 : Structure de l'agarose et de l'agaropectine (Kohajdová et Karovičová, 2009)

L'agarose est considérée comme le principal constituant de l'agar, représente un pourcentage compris entre 50-90% (**Nussinovitch, 1997**). C'est un polymère neutre fortement gélifiant, linéaire, pauvre en esters sulfuriques (OSO_3^-), composé d'unités d'agarobiose qui est influencé d'une part par les facteurs génétiques, et d'autre part par les facteurs écologiques telle la disponibilité des éléments nutritifs, la composition du substrat, sur lequel les algues croissent, et l'hydrodynamisme de l'habitat (**Armisen et al., 2000**).

L'agaropectine constitue la fraction mineure de l'agar, faiblement gélifiant (**Wickens, 2004**), il possède la même structure de base que l'agarose, mais il est plus riche en esters sulfuriques, se trouve associée à d'autres radicaux non glucidiques comme des acétyles, des méthyles ou des pyruvates (**Perèz, 1992**). Ces groupements peuvent être influencés par le cycle de croissance de l'algue, la saison de la collecte ou des facteurs écologiques.

5. Composition inorganique

L'agar n'est pas constitué que des sucres, mais il contient aussi des éléments inorganiques. L'analyse de la composition de la cendre de l'agar, montre que ce dernier contient les éléments inorganiques suivants ; le sulfate inorganique (1,0-8) (**Wickens, 2004**), le sodium (0,6-1,2%), le calcium (0,15-0,25) le magnésium (400-1200 ppm), le potassium (100-300 ppm), le phosphate (10-80 ppm), le fer (5-20 ppm), le manganèse (1-5 ppm), et le strontium(10-50ppm) (**Perèz, 2009**).

6. Mécanisme de gélification

L'agar forme un gel thermoréversible rigide à une concentration de 1% (**Nussinovitch, 2010**), et c'est grâce à l'agarose que l'agar agar peut se gélifier car il possède beaucoup de radicaux hydrophobes. Le gelé se forme à condition que l'agar-agar dilué dans l'eau à haute température plus de 85°C, il forme de simples hélices allongées (**FAO, 1990**). Les radicaux hydrophobes CH_2O vont chercher à éviter l'eau et donc les molécules de l'agar vont se rapprocher en formant des liaisons hydrogènes entre eux pour chasser l'eau. Au cours du refroidissement, ces simples hélices se contractent et s'associent entre elles pour former des doubles hélices emprisonnant l'eau en grande quantité, ensuite les doubles hélices s'agrègent et forment un réseau tridimensionnel (**Lahaye, 2001**) (Figure 10).

Ce dernier est stabilisé par le biais des liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles portés par le carbone 2 de l'unité galactose, et ceux portés par le carbone 5 des unités 3,6-anhydro-galactose positionnés vers l'intérieure de l'édifice (**Perèz, 2009**).

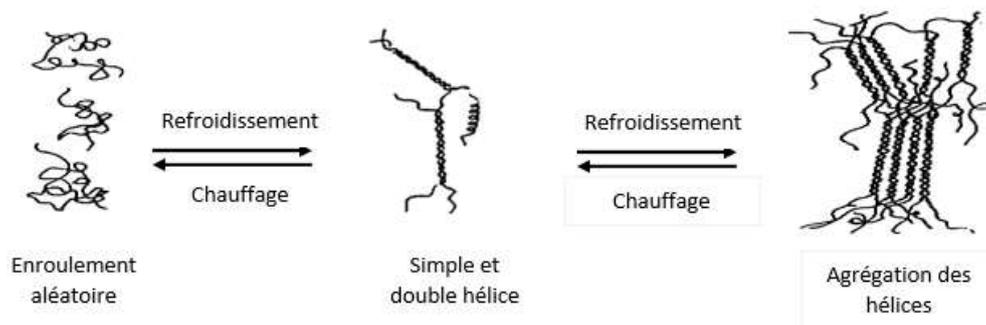


Figure 10 : Mécanisme de gélification de l'agar. (FAO, 1990)

Les gels d'agars générés sont alors solides puisqu'il n'y a pas de répulsion des charges. Les gels d'agars présentent un phénomène d'hystérèse, leur température de gélification étant de l'ordre de 40-50°C, et celle de fusion aux alentours de 80-90°C. Cette hystérèse thermique est ici aussi révélatrice d'une certaine stabilité du réseau tridimensionnel.

7. Procédure de fabrication de l'agar

La procédure de transformation des algues marines pour produire l'agar varie selon les espèces des algues traitées, généralement elles suivent les étapes suivantes : L'extraction et la déshydratation, répartie en trois parties. (Figure 11)

- ✓ L'extraction est effectuée par l'eau chaude à 90°C sous pression dans le réservoir ouvert pendant 2h après un lavage avec l'eau du robinet afin d'éliminer diverses substances dont le pigment rouge. Le jus extrait composée de 98% d'eau et 2% de l'agar-agar, est filtré à chaud dans un cylindre maintenu sous pression afin d'éliminer les résidus d'algues et toutes les impuretés restantes.
- ✓ Le filtrat obtenu est refroidi à l'eau glacé de 4°C ce qui lui permet de gélifier, le gel est ensuite déshydraté soit sous une pression mécanique d'une force de 5 à 10 kg/cm², soit par une congélation-décongélation, qui permettent le passage de l'eau et retiennent les molécules d'agar-agar comme un gâteau, ces deux opérations permettent de supprimer 70% de l'eau initiale.
- ✓ Une partie de l'humidité résiduelle est ensuite éliminée par séchage dans un séchoir programmé selon l'ordre de fabrication, la température, le temps et quantité de produit. On obtient l'agar sous forme granulé. Le granulé obtenu est acheminé vers le poste de mouture où il subira à un broyage pour préparer un produit final selon les exigences

demandées. Le moulin est équipé de tamis permettant ainsi d'obtenir la granulométrie demandée.

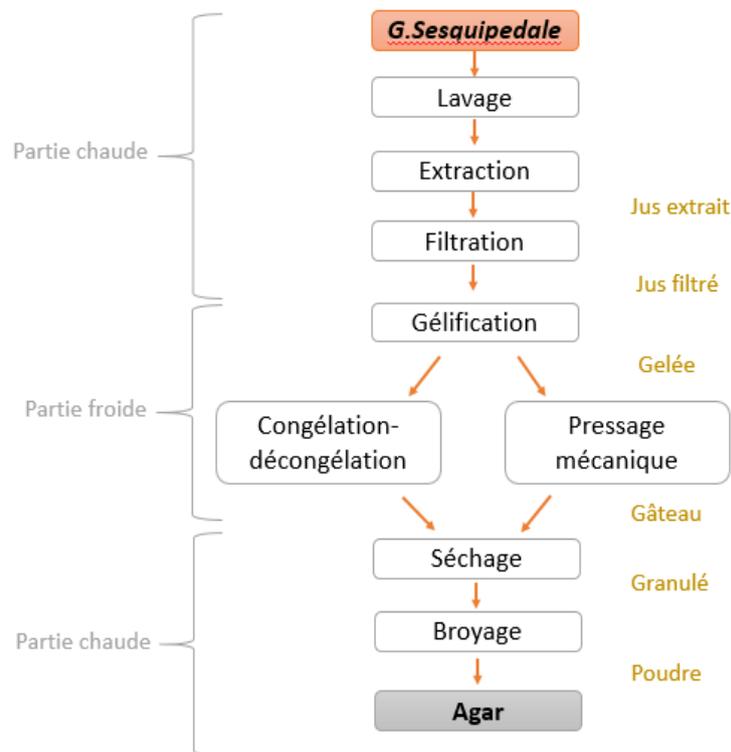


Figure 11 : Procédure de fabrication d'agar-agar à partir du *Gelidium sesquipedale*

8. Marché de l'agar

La Chine a été historiquement le principal producteur et utilisateur de l'agar, elle occupe environ 62% de la production. Actuellement, d'autres usines plus modernes voient le jour dans différents pays à travers le monde. Deux compagnies produisent environ 3600 t/an, soit environ 38 % de la production mondiale : "Algas Marinas" au Chili et "Agarindo Bogatama" en Indonésie, elles ont émergé en tant que leaders incontestés dans l'industrie de l'agar. Il existe d'autres producteurs clés dans le marché de la gélose comme "**Setexam**" au Maroc, "MSC Co" en Corée, "Hispanagar" en Espagne et la société industrielle des algues "Huey Shyang" en Chine. Ces six entreprises produisent environ 5500 t/an soit 57% du marché total actuel (**Bixler et Porse, 2010**).

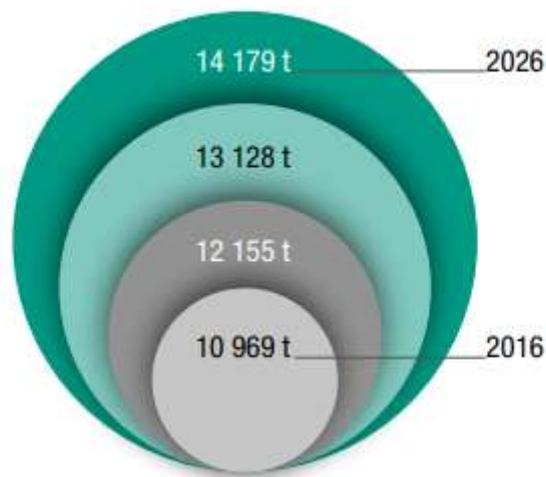


Figure 12 : Taille du marché de l’agar-agar à l’horizon 2026 (ANDA, 2017).

Le marché mondial de la gélose a été estimé à 268,58 millions d’USD en 2016, dans dix ans, la production mondiale de l’Agar - Agar atteindrait plus de 14 000 tonnes, soit une augmentation de 30 % par rapport à aujourd’hui. Par contre, la production en valeur serait plus importante et atteindrait 357 millions, soit une progression de 60 % par rapport à 2016 (ANDA, 2017).

9. Applications de l’agar

L’agar a de multiples applications, la plus ancienne est celle en industrie alimentaire où 88 % de la consommation de l’agar est consacré à ce domaine, les 18 % restants sont comptabilisés par les autres applications (Perèz, 2009).

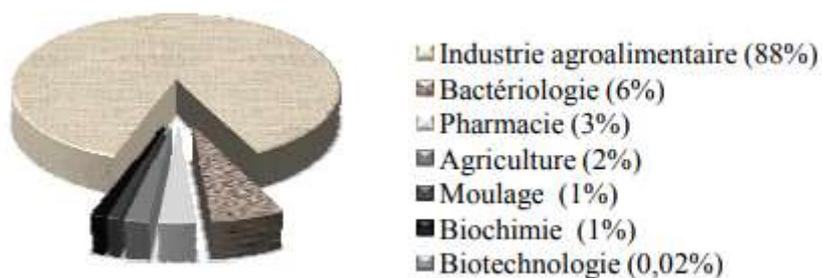


Figure 13 : Principales applications de l’agar (Perèz, 2009).

9.1. Industrie agroalimentaire

La gélose (E 406) est autorisée en tant qu'additif alimentaire dans l'Union européenne (UE) conformément à l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 sur les additifs alimentaires (Mortensen et al., 2016). Il est indigeste et donc il ne modifie pas l'apport calorique des aliments (Peréz, 2009).

- **Produits laitiers** ; L'agar est utilisé comme stabilisateur, son rôle essentiel est d'éviter la formation de cristaux de glace et d'améliorer la texture des produits laitiers comme le fromage, la crème, les flans et les yaourts, ... (McHugh, 2003).
- **Pâtisserie** ; L'agar permet d'éviter les craquelures et donne une meilleure brillance, et joue un rôle de stabilisation dans les garnitures des tartes comme les glaçages, les nappages, les meringues, les mousses, les fourrages et les gelées (Nussinovitch, 1997).
- **Confiserie** ; L'agar permet d'éviter la déshydratation des préparations comme les caramels et les gommes (Garon, 2004). Il entre dans la préparation des friandises et les bonbons gélifiés, il est peut-être utilisé à une concentration de 0,3 à 1,8 % (Nussinovitch, 1997). Il est aussi utilisé dans les produits à tartiner comme la confiture, en substitution à la pectine (réduction du taux de sucre), dans la mayonnaise, les sauces sucrées, et les légumes reconstitués.
- **Boisson** ; L'agar est utilisé dans le collage des vins, des jus de fruits, et des vinaigres. Il est plus efficace que la gélatine puisqu'il retire moins de tannins. Les niveaux appropriés pour une telle application sont de 0,05 à 0,15 % (Stewart, 1963).
- **Charcuterie et produits de pêche** ; Dès les années 60, les Japonais ont commencé à utiliser l'agar pour conserver les gros morceaux de thon exportés vers l'Europe occidentale (Nussinovitch, 1997), donc il permet d'éviter les dommages des tissus fragiles lors du transport et de prévenir la perte de la texture. Il est aussi utilisé dans la préparation de la viande tendre et dans les produits de pêche à des concentrations de 0,5-2 %. L'agar est aussi utilisé dans la préparation du poisson déshydraté pour utilisation dans les soupes et les préparations aromatisants (Stewart, 1963).

9.2. Bactériologie

L'agar-agar est le gélifiant le plus utilisé dans le secteur bactériologique, il convient comme agent solidifiant dans la préparation de milieux solides en raison de sa capacité à résister à la digestion par les enzymes bactériennes et à rester solide à des températures élevées. Il s'agit d'un poly-galactoside sulfaté formant un gel solide en présence de l'eau à une température basse à environ de 40 °C, tout en étant liquéfiable par ébullition. Les milieux solides destinés à être

coulés en boîtes de Pétri ou en tube ont une teneur en gélose assez élevée (15 g.L-1) tandis que les géloses molles ou semi-solides sont peu gélosées (3 à 5 g.L-1) et présentent une consistance intermédiaire (**Chiraz, 2022**).

9.3. Pharmacologie

La principale application de l'agar dans ce domaine reste en tant qu'excipients des préparations pharmaceutiques, en tant que stabilisants pour des solutions médicamenteuses contenant de l'alcool, en tant que gélifiants dans la confection des pommades, en tant qu'un lubrifiant en chirurgie, aussi comme agents de suspension du sulfate de baryum en radiologie. Puisqu'il est indigeste et infermentescible, il a été largement employé comme laxatif, en augmentant le volume et l'hydratation du bol fécal et en régularisant le transit (**Bruneton, 1999**). Aujourd'hui, l'agar est inclus dans le formulaire national américain pour être utilisé comme un ingrédient à libération lente pour l'absorption lente des agents pharmacologiques (**Armisen et al., 2000**), il est aussi utilisé comme véhicule pour les antibiotiques hydrosolubles (**Stewart, 1963**).

9.4. Agriculture

Les recherches sont en cours afin d'utiliser l'agar comme bio-engrais qui joue un rôle dans l'amélioration de la croissance des plantes cultivées, aussi dans la lutte biologique dont il permet de renforcer la défense naturelle contre les parasites, les champignons et les bactéries (**Brevet, 2022**).

9.5. Biotechnologie

Le principal débouché de l'agar actuellement est en biotechnologie où il constitue un matériel indispensable dans plusieurs spécialités à cause de nombreux avantages qu'il présente dont la confection des milieux de cultures, ainsi il présente l'un des supports de migration et de séparation des molécules en électrophorèse et en chromatographie (**Ouhssine et al., 2006**).

- **Culture microbienne et cellulaire** : L'agar est neutre du point de vue chimique et n'interfère pas avec les composants du milieu de culture des microorganismes. Il forme un gel relativement transparent, ce qui facilite le repérage des colonies et des réactions antigène/anticorps, il peut être utilisé pour la séparation de substances spécifiques en électrophorèse ou en chromatographie, il possède une macroporosité qui convient parfaitement à la migration des grosses molécules (**Imerson, 2011**).
- **Culture du tissu végétal et animal** : L'agar présente aussi un support de culture des tissus animaux, telles que les cellules hépatiques et tumorales (**Van Buren et al., 2007**) de telle façon qu'il soutient les milieux de culture avec une pression osmotique adaptée

aux exigences des cellules cultivées (**Armisen et al., 2000**). Les gels de l'agar contenant des éléments nutritifs appropriés sont utilisés comme substrat de croissance pour obtenir des clones des plantes dans les pépinières d'orchidées. De même, les méristèmes sont cultivés dans des milieux contenant de l'agar jusqu'à ce qu'il y a eu le développement des racines pour pouvoir être transplantés. L'avantage de ce système est que les plantes peuvent être cultivées dans un environnement stérile (**McHugh, 2003**). L'agar est aussi utilisé pour l'élevage des insectes, tels que les espèces de drosophiles utilisées dans les études génétiques, il fournit encore le support pour les aliments consommés par les larves pour la production non saisonnière des vers à soie (**Armisen et al., 2000**).

9.6. Médecine

L'agar peut servir comme fantôme pour des évaluations ultrasonores principalement en échographie, car c'est un matériau possédant des caractéristiques acoustiques similaires à celles de l'eau (**Bouakkaz et al., 1994**). Récemment, les agaro-oligosaccharides issus de l'hydrolyse de l'agarose ont montré un large éventail d'activités biologiques tels que des effets antimicrobiens, prébiotiques, anti-tumorale, anti-inflammatoires, et des effets antioxydants (**Liu et al., 2008**).

9.7. Cosmétologie

L'agar est très utilisé comme excipient dans les dentifrices, ou encore de gélifiant dans les crèmes (**Garon, 2004**).

IV. Microorganismes recherchés dans l'agar-agar

L'agar alimentaire présentant la majorité de la production de l'usine, il est soumis à plusieurs contrôles par analyses bactériologique et il s'agit des microorganismes responsables de l'altération, des microorganismes indicateurs de la contamination fécale et des microorganismes pathogènes responsables de toxiinfections alimentaires. Donc les microorganismes qui sont principalement rechercher lors de l'analyse bactériologique sont les flores mésophiles aérobies totales, les coliformes, les thermorésistants, les levures et moisissures, la *Escherichia coli* et les salmonelles.

1. Flore Mésophile Aérobie Totale

La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) présent dans un produit ou sur une surface à une température de 30°C, il ne s'agit pas d'un groupe taxonomique particulier mais de l'ensemble

de microorganismes mésophiles, chimio-organotrophes qui sont les bactéries majoritairement présentes dans les aliments et qui sont capables de se développer en aérobiose. Cependant, le plus souvent cette flore n'est pas pathogène, puisqu'elle est constituée de la flore naturelle des matières premières et de l'atelier de transformation, mais elle peut aussi être constituée d'une flore pathogène. La FMAT est responsable de l'altération des caractères organoleptiques et de la qualité nutritionnelle d'un produit alimentaire.

2. Flore fongique

Ce sont des germes d'altération, font partie du règne fongique et en sont les dignes représentantes malgré leur discrétion, on peut les rechercher pour évaluer l'état d'avancement de l'altération du produit.

2.1. Levures

Elles sont constituées de cellules vivantes d'un champignon microscopique unicellulaire qui se divisent par fission et par bourgeonnement (Figure 14), de diamètre compris entre 5 et 10 microns (invisible à l'œil nu) généralement de forme ovoïde ou sphérique, qui mise au contact de l'oxygène, de la chaleur ou d'éléments nutritifs vont se produire en se divisant. La température optimale de la culture des levures se situe en général entre 25 et 30°C, elles résistent alors à la dessiccation et à de basses températures. Les levures servent dans les préparations culinaires ou pour réaliser des boissons alcoolisées, car elles digèrent le sucre et le transforment en alcool sous l'action de la fermentation, elles sont très largement répandues dans l'environnement et se retrouvent de façon normale dans le lait. Le genre *Candida* est le plus fréquemment isolé chez l'Homme (AFSSA, 2008).

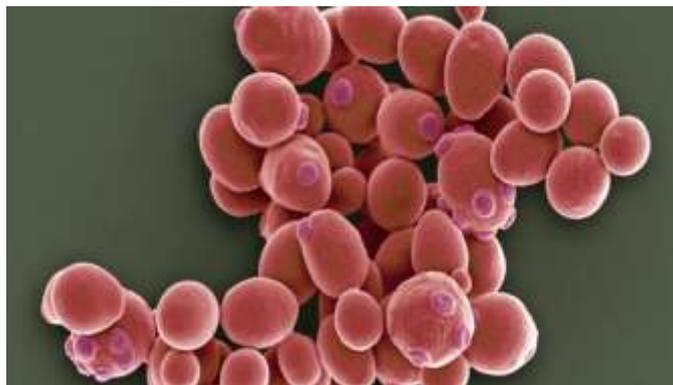


Figure 14 : Cellules de levures en microscopie électronique.

2.2. Moisissures

Sont des champignons filamenteux microscopiques ubiquistes (**Pitt et al., 2000**), hétérotrophes qui sont disséminés par l'émission des spores. Elles se développent la plupart du temps à un taux d'humidité importants avec une quantité d'oxygène et une température moyenne de 5 à 25°C, elles ont un système de filaments ramifiées appelées thalle ou hyphe, qui les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides et à absorber les éléments nutritifs permettant leur croissance (**Demain, 1981**).

Les moisissures ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme, certaines peuvent produire des substances naturelles hautement toxiques pour l'Homme et les animaux, via leurs métabolismes secondaires (**Steyn, 1998**). Les concentrations de moisissures ambiantes ne causent pas d'effets sur la santé de la majorité des personnes. Cependant, dans des situations où ces concentrations sont anormalement élevées ou dans le cas de certaines personnes malades. Les principaux effets sur la santé associée à une exposition aux moisissures sont les réactions d'hypersensibilité (allergie), les infections et l'irritation.



Figure 15 : Image microscopique de moisissures ou de champignons et spores en croissance.

Les moisissures sont considérées comme l'une des principales préoccupations de conservation des aliments, ils font partie des micromycètes et ornent les fromages. Leur croissance sur les aliments crus et transformés peut entraîner plusieurs types de détérioration en particulier l'altération de la qualité organoleptique : changement de la texture, développement de saveurs et l'émission d'odeurs.

3. Germes totaux

Ce sont des microorganismes résistants à de très fortes températures, deux groupes appartiennent à cette classe de microorganismes qui diffèrent par leurs températures optimales de croissance qui est chez les mésophiles, de l'ordre de 37°C et chez les thermophiles est de

55°C. Les spores ou les bactéries thermorésistantes ne sont pas détruites par la pasteurisation mais n'ont pas de rôle pathogène.

4. Coliformes

La définition adoptée par l'Organisation internationale de standardisation, les coliformes sont des micro-organismes en bâtonnets à Gram négatif, non sporulés, oxydase négative, facultativement anaérobie, fermentant le lactose avec production d'acide et de gaz en 48h à la température de 35-37°C, elles sont capables de cultivés en présence de sels biliaries ou d'autres agents de surface ayant des activités inhibitrices de croissance similaires.

Le groupe de coliformes est constitué de bactéries que l'on trouve dans la région intestinale chez l'Homme et les animaux à sang chaud mais sont également présents naturellement dans les eaux de surface, le sol et sur les débris végétaux et sont considérés comme des indicateurs de pollution. Ils sont recherchés dans les aliments, car ce sont de bons marqueurs de l'hygiène de leurs manipulations, mais le niveau de contamination dans les aliments est plutôt bas, et leur présence en nombre élevé est un signal d'alarme qui démontre une détérioration de la qualité du produit.

5. *Escherichia coli*

E.Coli, autrement appelé colibacille, sont des coliformes thermo-tolérants, capable de croître en aérobiose à 44°C en milieu liquide. Est une bactérie intestinale des mammifères très communes chez l'être humain, généralement commensal, à Gram négatif en forme de bâtonnet. Sa taille est de 0,5 de large sur 3 µm de longueur, non sporulés, généralement dépourvu de capsule. Ce sont des coliformes aéro-anaérobies facultatives qui possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif (Tap, 2004). Découverte en 1885 par Théodore Escherich, dans des selles des nourrissons, et son génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4 200 protéines, en effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie.

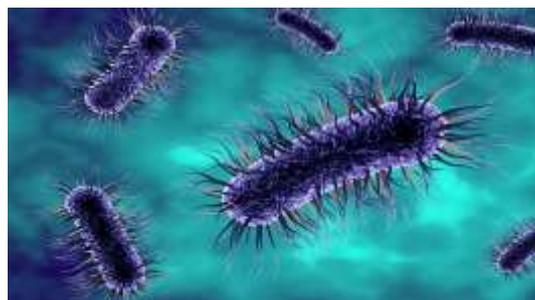


Figure 16 : Souche d'*E. Coli* vue au microscope.

6. Salmonelles

Les salmonelles sont des bactéries mésophiles de la famille des Enterobacteriaceae et du genre *Salmonella*, nom qui honore le médecin vétérinaire Daniel Elmer Salmon, elles sont des bacilles à gram négatifs de 1 à 6 μm de longueurs, aéro-anaérobies facultatifs et le plus souvent mobiles et ont une paroi épaisse de 8 à 12 nm, dont la membrane externe constituée par des lipopolysaccharides qui sont des complexes macromoléculaires toxiques (Avril et al., 1992). La majorité produit des gaz en fermentant le glucose, elles se développent à une température optimale de 35-37°C et peuvent se multiplier entre 5°C à 45-47°C avec une croissance nettement retardée dans les températures inférieures à 10°C.

Ce sont des microorganismes naturellement présents dans l'intestin des animaux et des hommes ainsi que dans l'environnement, mais elles ne sont pas commensales de l'intestin de l'Homme sain, *salmonella enteritidis* et *salmonella typhimurium*, les 2 principaux sérotypes de salmonellose transmise de l'animal à l'homme dans la plupart des régions du monde (OMS, 2018).



Figure 17 : Souche de Salmonelle vue au microscope.

Selon l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, 31% des TIA (toxi-infection alimentaire collective) entre 2000 et 2002 ont eu pour origine *Salmonella spp*, elle est la première cause de toxi-infection alimentaire en France (Lepoutre, 1996), ce pathogène utilise les volailles comme animal hôte, en colonisant leur tractus intestinal, et ce de manière asymptomatique pour les oiseaux. Au Maroc, selon le bilan des TIAC notifiées en 2010, 5,2% des cas confirmés sont dus à des salmonelles avec un taux de létalité de 0,06% (Delma, 2010).

Partie II : Matériel et Méthodes

Contrôle de qualité de l'agar

Comme tout autre produit destiné à être commercialisé, l'agar doit présenter une conformité aux normes établies ou décrites par la législation (Annexe 4), pour garantir une qualité supérieure et assurer une salubrité irréprochable aux consommateurs. Afin de veiller à ce que cette conformité soit respectée, 18 échantillons d'agar, ont été soumis à une série d'analyses physico-chimiques et bactériologiques. Ces analyses sont effectuées dès la réception des échantillons au laboratoire sous des conditions aseptiques.

I. Analyses physico-chimiques

18 échantillons de l'agar, ont été soumis à un certain paramètre physico-chimique ; 9 échantillons d'agar bactériologique (Agar bact) et 9 échantillons d'agar alimentaire (Agar food).

1. Test de sédimentation

1.1. Principe

Ce test permet de détecter la présence de particules ou sédiments de grosse taille (sup à 0,75mm) par tamisage de la poudre à travers un tamis de 20mesh ainsi de 40mesh.

1.2. Mode opératoire et interprétation

Une quantité de 30g de poudre d'agar à analyser est mise aseptiquement dans un tamis de 20 mesh qui a été monté sur celui de 40 mesh. La poudre a été secouée pendant 10 à 15 secs au-dessus d'un récepteur en inox propre, La présence de corps étrangers ou de granulés de grosse taille est vérifiée visuellement.

Selon la norme interne de la Société, le résultat est exprimé en P suivi d'un "+"

P : Absence de corps étrangers dans l'agar

P+ : Présence de faible quantité de corps étrangers

P2+ : Présence de quantité moyenne de corps étrangers

P3+ : Présences important de corps étrangers

2. Taux d'humidité

2.1. Principe

Détermination de la teneur en eau retenue dans l'échantillon d'agar à analyser.

2.2. Mode opératoire

A peu près 5g d'échantillon d'agar est distribué sur un plateau en Aluminium de dessiccateur à résistance chauffante LP16 qui possède une balance. Au terme du temps de séchage ; 15min à une température de 140°C, le chauffage est automatiquement débranché et le résultat sera affiché sur la balance.

- Le résultat final est donné en %



Figure 18 : Dessiccateur à résistance chauffante LP16

3. Cendres totales

3.1. Principe

Détermination du pourcentage de la matière minérale totale présente dans la poudre d'agar-agar par calcination.

3.2. Mode opératoire

Trois grammes d'agar-agar sont mis dans des creusets en silice sec (P_2) déjà pesés (P_1) et placé au four réglé à 550°C et laissé incinérer environ 5 heures. Les creusets sont récupérés et laissés refroidir puis sont pesés (P_3).



Figure 19 : Four industrielle Nobertherm réglé à 550°C

Le résultat sera exprimé en %, selon la formule suivante :

$$\text{Taux des cendres totales en } (\%) = \frac{P3 - P1}{\frac{(P2 - P1)(100 - H)}{100}} \times 100$$

P1 : Poids de creuset vide

P2 : Poids de creuset avec l'agar

P3 : Poids de creuset avec l'agar après calcination

H : Humidité de l'agar

4. Trace d'eau de Javel

4.1. Principe

Recherche des traces d'eau de javel dans la poudre d'agar-agar.

4.2. Mode opératoire

Une quantité de 8g d'agar-agar a été ajouté à 100ml d'eau déminéralisée dans un erlenmeyer. Puis après 15min d'agitation, 10ml de la solution d'iodure de potassium et 10ml de la solution d'acide acétique ont été ajoutés. Après cinq minutes d'incubation à une température ambiante, le changement de la coloration de la solution a été détecté, indiquant la présence de l'eau de javel dans la poudre de l'agar.

En cas de changement de la couleur, on titre par le thiosulfate jusqu'à ce que la solution devienne incolore.

Le résultat de trace d'eau de javel est exprimé en %.

$$\text{ClO}^- \text{ en } (\%) = \frac{(V \times MM)10 - 2}{m \times \frac{(100 - H)}{100}} \times 100$$

ClO⁻ : Monoxyde de Chlore

V : La tombé de burette en thiosulfate

H : Humidité de l'agar

m : La prise d'essai d'agar = 8

MM : Masse molaire de ClO⁻ = 51,45

5. Méthode d'ICP

5.1. Principe

Des équipements d'analyse ultrasensibles sont requis pour mesurer les très faibles quantités d'impuretés potentiellement toxiques comme le plomb (Pb), le mercure (Hg) et l'arsenic (As) afin d'identifier et de mesurer les contaminants métalliques présents dans nos échantillons. Ainsi la concentration totale en ions de calcium (Ca^{2+}) et de magnésium (Mg^{2+}). La spectrométrie à émission optique sur plasma à couplage inductif (ICP) est parmi les méthodes d'analyse classiques utilisées.

ICP consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans le plasma d'argon, les atomes de la matière sont transformés en ions par une sorte de flamme extrêmement chaude (jusqu'à 8000K). L'appareil est doté d'une option dite "à plasma froid" qui chauffe à plusieurs centaines de K permettant l'analyse de la dureté totale et de métaux lourdes. L'échantillon pénètre dans le plasma sous une forme condensée et doit subir les changements d'états suivants : vaporisation, ionisation.

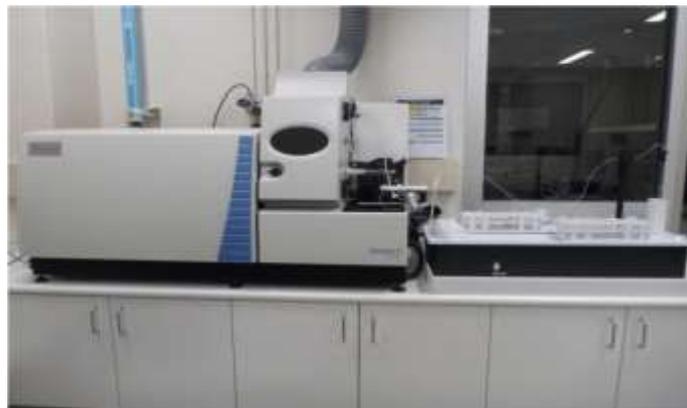


Figure 20 : Spectrométrie à plasma à couplage inductif

5.2. Mode opératoire

0,5g d'agar à analyser mis dans un tube spécifique au digesteur, 6ml d'acide nitrique, 1ml d'acide chlorhydrique et 4ml d'eau ultrapure sont ajoutés au tube, le tube est placé au digesteur pour réaliser la digestion afin de minéraliser l'échantillon à analyser. Ensuite la solution est introduite dans une fiole de capacité 25ml et on complète avec de l'eau pure jusqu'au trait jaugeé, et placée dans l'appareil d'ICP par des étalons spécifiques pour le prélèvement.

Le résultat des métaux lourds et des ions sera donné par le logiciel ICP-9000 et exprimé en ppm.

6. Détermination du pH de la solution d'agar

6.1. Principe

Détermination de l'acidité, basicité ou neutralité d'une solution d'agar (1,5%) à 80°C par mesure de son potentiel d'Hydrogène qui varie en fonction de la concentration des ions hydrogène et qui caractérise l'équilibre physico-chimique.

6.2. Préparation de la solution stock d'agar 1,5 %

Une quantité de 9g d'agar à analyser a été mélangé avec 600 ml d'eau déminéralisée dans un erlenmeyer, ensuite la solution a été chauffé sous agitation jusqu'à dissolution totale de l'agar. La solution de l'agar 1,5% est destinée aux différentes analyses biochimiques.

6.3. Mode opératoire

100ml de volume est pris de la solution d'agar stock afin de mesurer son pH à l'aide d'une électrode de référence de pH-mètre qui est introduite dans la solution.

7. Test de viscosité

7.1. Principe

Ce test consiste à vérifier la viscosité de la solution d'agar-agar à 1,5 % à la température de 80°C.

7.2. Mode opératoire

Un volume de 400ml de la solution stock d'agar-agar à 1,5% a été introduit dans un bêcher, puis la viscosité de la solution a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre TVB10.

Le résultat est affiché sur l'écran et exprimé en Cps.

8. Turbidité

8.1. Principe

Détermination de la clarté de la solution d'agar-agar à 1,5 % par un turbidimètre qui permet de mesurer la lumière diffusée sur les angles de 90°.

8.2. Mode opératoire

Le tube adaptable au turbidimètre est rempli avec la solution d'agar 1,5 %, et la valeur de la turbidité sera affiché sur l'écran.

Le résultat est exprimé en NTU

9. Point de gélification

9.1. Principe

Détermination de la température de gélification d'une solution d'agar à 1,5%, qui est donc la température à laquelle la solution commence à se gélifier, qui sera exprimée en °C.

9.2. Mode opératoire

Le tube à hémolyse a été rempli est moitié avec la solution d'agar à 1,5%, le thermomètre est placé à l'intérieur du tube avec une agitation douce jusqu'à ce que la solution commence à se gélifier.

10. Point de fusion

10.1. Principe

Consiste à déterminer la température de fusion d'un gel d'agar-agar à 1,5%.

10.2. Mode opératoire

Deux tubes à essai sont remplis avec la solution d'agar à 1,5% et laisser gélifier pendant une nuit. Puis, une bille en verre est mise au-dessus du gel de l'un des deux tubes. Ensuite les tubes ont été placés dans un bêcher de 1L de façon immerger les tubes qui sont posés sur un support adéquat.

Le thermomètre est introduit dans le tube ne contenant pas la bille en verre, tout est chauffer tout en surveillant l'effondrement de la bille. La température à laquelle la bille commence à descendre correspondra à la température de la fusion du gel et sera exprimé en °C.

11. Force de gélification

11.1. Principe

Cette méthode permet de mesure la force de compression nécessaire pour rompre le gel d'agar à 1,5 % en 20 secondes.

11.2. Mode opératoire

Un volume de 600ml de la solution d'agar à 1,5% a été verser dans une caissette métallique et laissé refroidir à température ambiante jusqu'à gélification de la solution, puis placé dans l'étuve réfrigérée à 20°C pendant 15 à 20 heures.

En utilisant le levier du côté droit de l'appareil "Nikan", lever et placer la caissette contenant le gel au centre.

Placer le poids semblant convenable sur le support du piston et baisser le piston, déclencher le chronomètre au moment du contact du piston avec la surface du gel. Si le piston est suffisant ou insuffisant, les mesures sont répétées jusqu'à obtenir une pénétration du piston correspond à 20 sec. Les masses des poids ajoutés au 100g du piston, représentent la force du gel.

Les résultats sont représentés en g/cm^2 qui est le poids auquel le gel à résister à un piston à fond plat, circulaire de 1cm^2 durant 20 secs.

II. Analyses bactériologiques

Certains micro-organismes ne posent pas de problème, alors que d'autre peuvent être dangereux pour la santé humaine. Pour cette raison, l'agar est soumis à plusieurs contrôles bactériologiques.

Cette étude nous permet de déterminer un critère d'acceptation quantitatif et qualitatif selon le cahier de charge du client, ensuite on applique ces critères pour interpréter les résultats et définir si la qualité du produit est satisfaisante ou non.

- Les critères quantitatifs sont définis sous forme d'une valeur,
- Les critères qualitatifs sont de la forme : absence ou présence de la bactérie dans le produit.

Le matériel utilisé lors de ces analyses a été préalablement stérilisé pour éviter toute source de contamination. Il y'a 2 types de stérilisation ; stérilisation à sec et stérilisation à vapeur.

- Les pipettes, les spatules et les boites de pétri sont enveloppées dans du papier kraft et stérilisées à l'étuve à 140°C pendant au moins 4 heures
- Les bouteilles Schott, les éprouvettes, les erlènes et les bouteilles en verres sont stérilisées par vapeur fluente à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

1.1. Principe

La FMAT représente le nombre total de microorganismes capables de former des colonies visibles sur un milieu de culture en présence d'oxygène et à une température optimale de croissance entre 25° et 37°C . Cette méthode consiste au dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies obtenues à 37°C

1.2. Procédure

Conformément aux spécifications de la norme ISO6887 et aux bonnes pratiques de la préparation pour analyse bactériologiques, 5g d'Agar à analyser sont introduits aseptiquement, dans une bouteille stérile contenant 100ml de diluant tryptone sel (Annexe 2). Et bien agités. 2ml de la solution ont été pipetés et mis dans deux boîtes de Pétri stériles à raison de 1ml par boîte. Une fois les deux boîtes sontensemencées, 12-15ml de milieu de culture PCA agar est ajouté dans chacune dont l'intérêt est de favoriser le développement à 30°C de tous les microorganismes qui ont été déposés (Annexe 2).

La gélose a été homogénéisée puis laissée solidifier sur une surface froide, et incubées couvercles en bas à 37°±2°C pendant 48 à 72h.

- La valeur moyenne des nombres d'unités formant colonies (NUFC) comptés grâce à un compteur de colonies sur les deux boîtes représentatives d'un échantillon est divisée par cinq (Prise d'essai) puis multipliée par 100 (Coefficient de dilution) pour avoir le nombre de FMAT par gamme d'agar. Les résultats sont exprimés en UFC/g selon la formule suivante :

$$\text{Nombre d'UFC} = \frac{\text{Moyenne des colonies comptées dans 2 boîtes}}{5} \times 100$$

2. Dénombrement des coliformes

2.1. Principe

Les bactéries coliformes qui peuplent l'intestin peuvent être identifiées par leur tolérance à une température de 44 - 45°C. La présence de ces coliformes thermotolérants est une preuve indiscutable d'une contamination par matières fécales.

2.2. Procédure

Une quantité de 5g d'agar à analyser est mise dans une bouteille stérile et 100ml de diluant stérile est ajouté, puis 1ml de la solution est déposé dans une boîte de Pétri stérile, cette opération est répétée deux fois. Ensuite 12 à 15ml de milieu VRBL (Annexe2) sont ajoutés dans chacune. La gélose est homogénéisée et laissée solidifier puis les boîtes sont incubées pendant 48h à 37±2°C.

La moyenne du nombre des coliformes totaux des deux boîtes est déterminée et le résultat est exprimé en UFC/g selon a formule suivante.

$$\text{Nombre d'UFC} = \frac{\text{Moyenne des colonies comptées dans 2 boites}}{5} \times 100$$

3. Dénombrement des germes totaux

3.1. Principe

Deux groupes de microorganismes sont dénombrés ; thermophiles et mésophiles. Le principe repose sur une incorporation de l'échantillon d'agar dans un milieu de culture approprié stérile, ensuite un traitement thermique pour activer les spores et éliminer les bactéries thermosensibles, puis une incubation à température optimale de croissance.

3.2. Procédure

Une quantité de 4g d'échantillon d'Agar à analyser $\pm 0.25g$ sont introduite aseptiquement, dans une bouteille stérile contenant 200ml de bouillon nutritif stérile (BN). La solution est bien agitée et autoclavée à 121°C pendant 5 à 15 minutes. Après, la suspension est coulée dans six boites de pétrie, puis incubés :

Trois boites destinées au dénombrement des microorganismes thermorésistants thermophiles sont incubées à 55°C pendant 48 à 72h.

Trois boites destinées au dénombrement des microorganismes thermorésistants mésophiles sont incubées à 37°C pendant 48 à 72h.

Le résultat est exprimé par UFC/g.

$$UFC/g = \frac{\Sigma UFC}{2} \times 100$$

4. Dénombrement des levures et moisissures

4.1. Principe

Le principe de cette méthode est basé sur un dénombrement de colonies visibles présentes dans l'échantillon incorporé dans un milieu de culture sélectif recommandé pour la culture des levures et moisissures.

4.2. Procédure

Conformément aux spécifications de la norme ISO6887 et aux bonnes pratiques de préparation des échantillons pour analyses bactériologiques. 5 \pm 0,25g d'agar-agar à analyser est introduite aseptiquement dans une bouteille stérile contenant 100 ml de diluant tryptone sel. A proximité

d'une flamme, deux boîtes de pétri stériles sont ensemencées avec 1ml de la suspension d'agar-agar mise dans la bouteille, ensuite 12 à 15ml du milieu stérile SDA est coulé dans chacune (Annexe 2), et incubées dans une étuve réglée à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 5 à 7 jours.

Le résultat est commun pour les levures et moisissures, il est exprimé en UFC/g selon la formule suivante :

$$\text{Nombre d'UFC} = \frac{\text{Moyenne des colonies comptées dans 2 boîtes}}{5} \times 100$$

5. Recherche d'*Escherichia Coli*

5.1. Principe

La méthodologie employée à la recherche de *E.Coli* est basée sur un pré-enrichissement de l'agar par Bouillon Trypticase Soya, puis un enrichissement par le Bouillon MacConkey, suivi d'un isolement sur milieu solide appropriés et une identification biochimique.

5.2. Procédure

✓ Pré-enrichissement

Dans des flacons stériles, 5g d'agar à analyser a été ajoutés à 100ml de milieu riche liquide TSB afin de favoriser la récupération et la croissance des *E.Coli*. Le mélange a été homogénéisé puis incubé à $35-37^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures ; ceci permet à *E.Coli* (éventuellement présentes) de se multiplier en abondance.

✓ Enrichissement

Le milieu utilisé dans cette phase est un milieu liquide sélectif permet la croissance sélective d'*E.Coli* et l'inhibition des autres bactéries. Après incubation, une portion de 0.1ml de cette suspension est ensemencée dans 10ml du milieu d'enrichissement ; Bouillon MacConkey. L'incubation a été réalisée à $42-44^{\circ}\text{C}$, pendant 24-48 heures.

✓ Isolement

Deux milieux de cultures sélectifs solides ont été utilisés ; EMB et TBX (Annexe 2). Et ensemencées par la technique de stries à partir du milieu liquide d'enrichissement. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à $35-37^{\circ}\text{C}$, pendant 18-48 heures. La présence de colonies bleues à bleu vert a été vérifiée sur milieu TBX. Et verdâtres à éclat métalliques sur EMB. Les

colonies suspectes sont également repiquées sur milieu TBX, puis incubées à 44°C pendant 18-24 heures pour le but d'identification biochimique

✓ **Identification biochimique**

Les souches qui présentent sur le milieu TBX une coloration bleue à bleu-vert sont repérées et confirmées par un test d'indole en versant directement une goutte de réactif de Kovacs sur les souches suspectes sur TBX.

Une Galerie classique est utilisée en parallèle en ensemençant les milieux suivants : Kligler, Citrate de Simmons et MR-VP. Si les résultats de la galerie classiques s'avèrent conformes aux caractéristiques d'*E. Coli* (Annexe 3), seront confirmés par utilisations de la galerie API 20E puis la lecture par logiciel API LAB (Annexe 3).

6. Recherche de Salmonelles

6.1. Principe

Quatre étapes ont été appliquées pour détecter la présence de salmonelle dans les différents échantillons d'agar-agar : le pré-enrichissement dans un milieu liquide approprié suivi d'un enrichissement sélectif dans un milieu liquide, isolement sur un milieu solide sélectif, et identification biochimique des colonies isolées après l'incubation des boîtes.

6.2. Procédure

✓ **Pré-enrichissement en milieu non sélectif liquide**

Le nombre de salmonelles dans la plupart des échantillons prélevés reste faible, d'où l'intérêt d'utiliser des milieux de pré-enrichissement pour pouvoir les isoler. Une quantité de $5 \pm 0,25$ g d'échantillon d'agar-agar a été ajouté dans un flacon contenant 100ml de bouillon TSB stérile. La suspension a été agitée puis incubé pendant 24 ± 2 h à 35-37°C. Ceci permet de revivifier et de multiplier le nombre des salmonelles préexistant. Toutefois, ce milieu reste non sélectif, parallèlement à la multiplication des Salmonelles, d'autres types de bactéries éventuellement associées au prélèvement peuvent croître.

✓ **Enrichissement sélectif**

Après incubation, 0,1ml a été prélevé de la suspension incubée et introduite dans 10ml de Bouillon Rappaport-Vassilliadis, puis incubés à 41-42°C pendant 24 ± 3 h pour enrichissement. La sélectivité du bouillon et la température d'incubation relativement élevée entraînent une croissance sélective des Salmonelles et l'inhibition d'une grande partie de la flore d'accompagnement.

✓ **Isolement**

L'isolement des salmonelles se fait sur des géloses sélectives solides qui inhibent la croissance des autres bactéries d'origine intestinale et donnent des informations sur les principales caractéristiques biochimiques différentielles des Salmonelles. Après incubation, des isolements ont été effectués à partir des milieux d'enrichissement sur deux milieux gélosés : SS et XLD (Annexe 2), ensemencées, puis incubés à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24\pm 3\text{h}$.

La présence probable des salmonelles est caractérisée par les caractéristiques suivantes : colonies sont bien développées rouges sur XLD et transparentes ou incolores avec ou sans centre noir sur SS. Dans le but d'identification biochimique, un isolement a été réalisé à partir de ces milieux, en prélevant les colonies suspectées et les étalées sur un nouveau milieu gélosé TSA, puis les incubés pendant 24 à 48 heures à $35-37^{\circ}\text{C}$.

✓ **Identification biochimique**

Les colonies suspectées ayant une coloration transparente qui sont considérées des Salmonelles, sont repiquées et purifiées sur la gélose Kligler pré-coulé en tube inclinée en ensemençant le culot par piqûre centrale et les pentes par stries, puis les incubés pendant 24 à 48 heures à $35-37^{\circ}\text{C}$.

Différents tests biochimiques ont été réalisés pour caractériser les Salmonelles. Parmi ces tests on cite : Réaction au rouge de méthyle, Voges-Proskauer et production d'indole à partir d'une culture de 24h sur TSA Agar. Les colonies présentant les caractéristiques des salmonelles vont subir une identification sur Galerie API 20E (Annexe 3).

Partie III : Résultats et discussion

I. Analyses physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques des 18 échantillons d'agar-agar a porté sur 11 paramètres, 9 agar bact (1, 2,...9) et 9 agar food (A, B,...I) : le test de sédimentations, l'humidité, les cendres totales, traces de javel, la teneur en métaux lourds et en ions, le pH, la viscosité, la turbidité, le point de gélification et de fusion et la force du gel. Les résultats obtenus des différentes analyses sont présentés dans les tableaux et les graphes suivants, selon le type de la poudre d'agar (Agar bact et Agar Food) :

1. Test de sédimentation

Le tableau 2 présente les résultats du test de sédimentation pour les deux types d'agar.

Tableau 2 : Test de sédimentation de l'agar food.

Agar	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Food	P	P	P	P+	P	P+	P+	P	P+

Tableau 3 : Test de sédimentation de l'agar bact.

Agar	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bact	P ⁺	P+							

Tous les échantillons de l'agar bact. ont été contaminés par une quantité faible de corps étrangers (> 0,75mm) mais ils ne dépassent pas la norme interne fixée par la Société (<P³⁺). , alors que l'agar Food, seulement quatre échantillons D, F, G et I sur neufs présentent une petite quantité des corps étrangers. Bien que ce test ne puisse se substituer à des analyses plus poussées en laboratoire, il permet d'avoir une idée indicative sur la texture de l'agar.

2. Taux d'humidité

La figure 21 présente le taux d'humidité des échantillons de l'agar analysés.

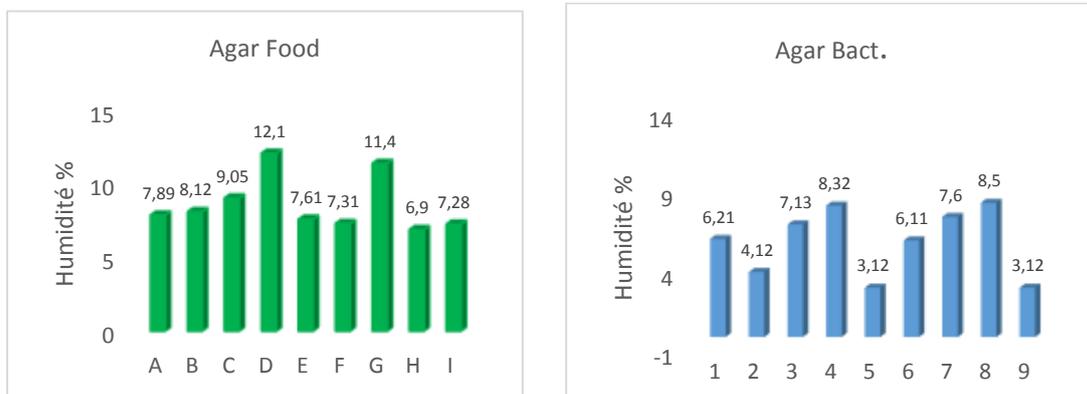


Figure 21 : Taux de l'humidité dans des échantillons d'agar.

Les résultats obtenus montrent que la teneur en eau des échantillons de l'agar Food est élevée par rapport aux à celle des échantillons de l'agar bact. Le taux d'humidité des échantillons d'agar Food varie entre 6,9% pour l'échantillons H et 12,1% pour l'échantillon D. alors le taux d'humidité enregistré dans les échantillons de l'agar bact. est compris entre 3,12% pour l'échantillon 5 et 9 et 8,5% pour l'échantillon 8. Généralement le taux d'humidité des deux types d'agar étudiés ne dépasse pas 13%, la norme exigée par la valeur interne de la société.

3. Cendres totales

Généralement, le taux de la matière minérale présente dans les échantillons d'agar étudiés varie entre 3,11 et 3,66% et reste toujours dans les voisinages de 3-4% exigés par la norme interne de la société (Figure 22).

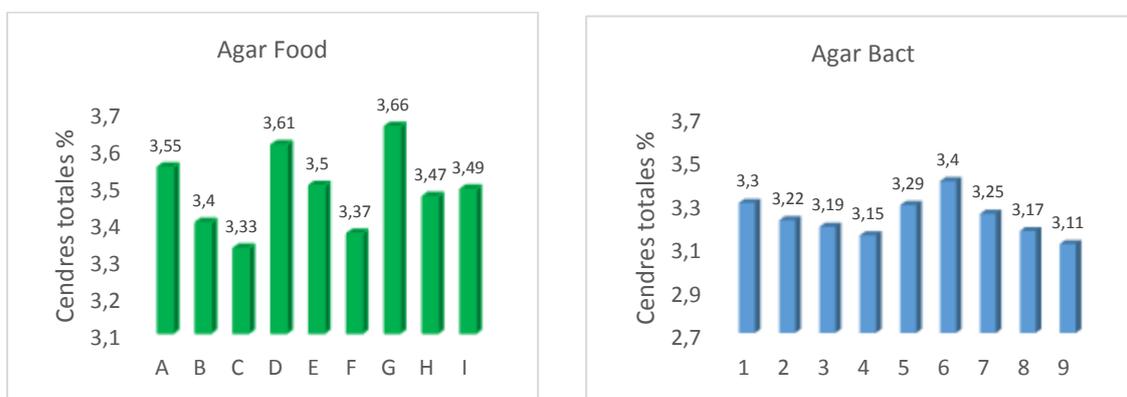


Figure 22 : Taux de la matière minérale dans les échantillons d'agar.

4. Trace de Javel

La recherche de trace d'eau de javel (Figure 23), montre la présence de très faible proportion en monoxyde de chlore dans les échantillons de l'agar Food, variant entre 0,012 et 0,042%. Ceci peut être expliqué par l'utilisation de l'eau de javel lors de rinçage des algues destiné à l'alimentation pour éliminer les microorganismes. Pour les échantillons de l'agar bact., des valeurs nulles en monoxyde de chlore ont été enregistrées.

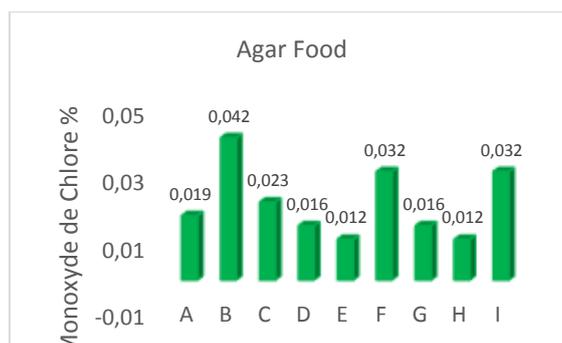


Figure 23 : Teneur de l'agar Food en Monoxyde de Chlore

5. Technique d'ICP

5.1. Taux de métaux lourds

Les mesures qualitatives de la présence de trace de Plomb, d'Arsenic et de Mercure dans la poudre d'agar Food étudiés (Tableau 4), étaient conformes aux normes régulant les concentrations de ces substances dans les additifs alimentaires destinées à l'alimentation humaine (<10 ppm).

Tableau 4 : Taux des métaux lourds dans les échantillons d'agar food.

Food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Pb	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
As	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Hg	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

5.2. Dureté totale

La dureté totale est la concentration totale en ions de calcium et de magnésium dans les échantillons d'agar bact. étudiés. Les concentrations en ions de Ca^{2+} varie entre 302 et 589 ppm, alors que celle de Mg^{2+} sont de l'ordre de 76 et 147 ppm. Les résultats obtenus (Figure 24) montrent une conformité aux normes régulant les concentrations de ces substances dans l'agar bactériologique et dont la somme des concentrations en Ca^{2+} et en Mg^{2+} ne doit pas dépasser 900 ppm.

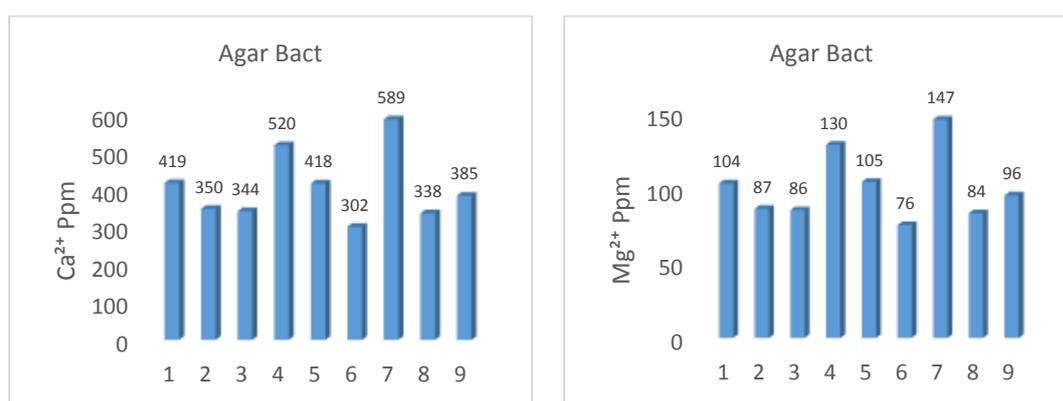


Figure 24 : Concentration totale en ions de Ca^{2+} et de Mg^{2+} dans les échantillons d'agar bact.

6. PH

L'examen des résultats d'analyse (Figure 25), montre que le pH des échantillons étudiés d'agar Food varie entre 6,31 et 7,28 et reste plus ou moins supérieur à celui de l'agar bact. qui varie entre 6,32 et 7,26.

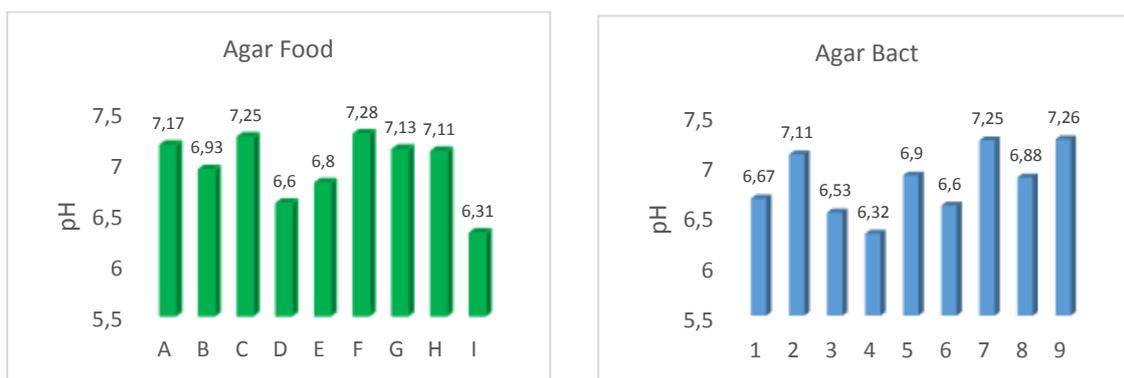


Figure 25 : pH des échantillons d'agar food et bact.

7. Viscosité

Les résultats du test de viscosité (Figure 26), montrent des valeurs variantes entre 6,5 et 9 Cps. Ces valeurs répondent aux normes interne de viscosité qui ne doit pas dépasser 9 Cps. La mesure de la viscosité est influencée par la température, plus la température est élevée plus le matériau s'écoule facilement.

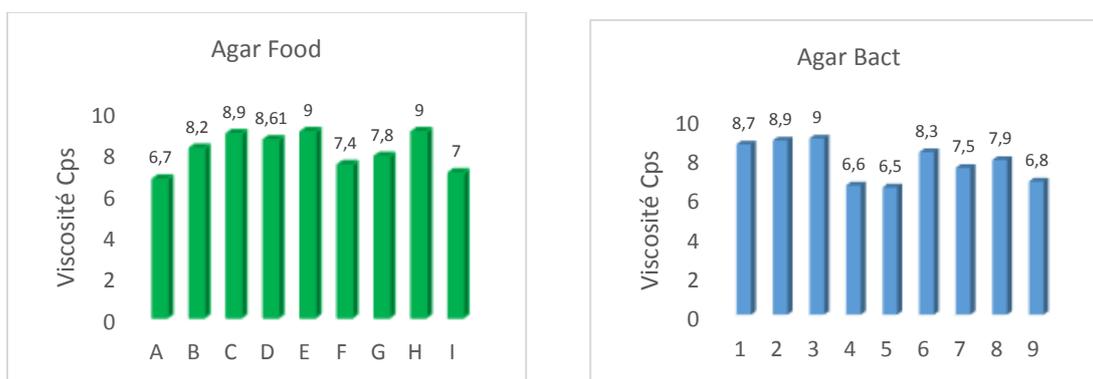


Figure 26 : Viscosité des échantillons d'agar.

8. Turbidité

Les valeurs de la turbidité des échantillons d'agar étudiés (Figure 27), varient entre 8,58 et 33,7 NTU, ces valeurs sont inférieures à 50 NTU ; la valeur fixée par la norme interne de la Société.

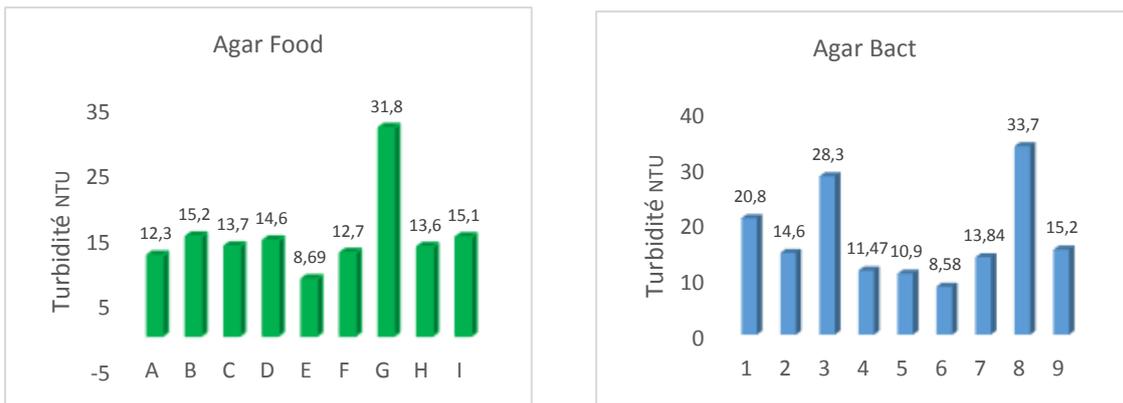


Figure 27 : Turbidité des échantillons d'agar.

9. Point de gélification

Le point de gélification de la solution d'agar 1,5% (Figure 28), reste presque stagnant entre 35-36°C chez les échantillons d'agar bact, et 36-37°C pour les échantillons d'agar food. Ces valeurs répondent à la norme qui est comprise entre 30 et 40°C.

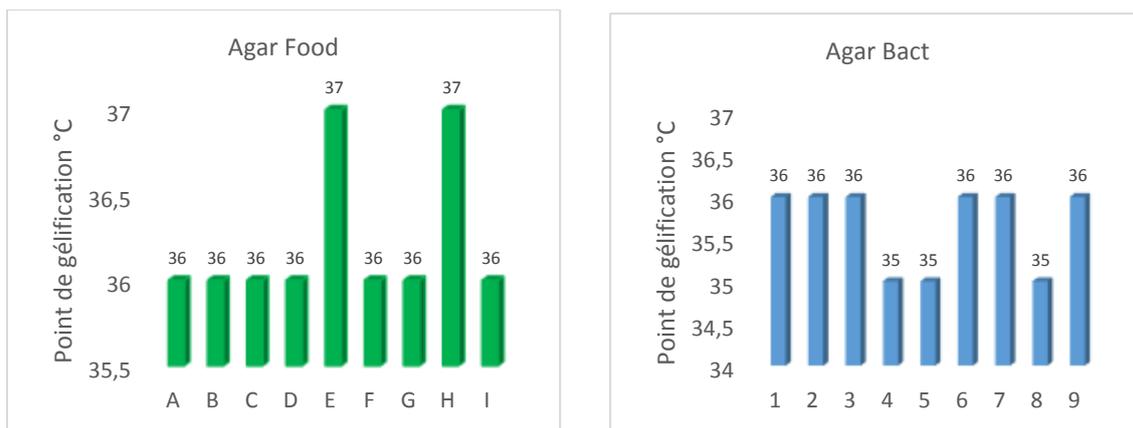


Figure 28 : Point de gélification des échantillons d'agar.

10. Point de fusion

Le point de fusion du gel des échantillons d'agar étudiés correspondant à la température de fusion varie entre 89 à 95°C pour l'agar Food et de 88 à 93°C pour l'agar bact (Figure 29). Ces valeurs se situent entre 85 et 95°C fixée par la norme interne de la Société. Cette propriété est intéressante car elle donne une idée sur la pureté du gel, plus la température de fusion est élevée plus le gel est pur.

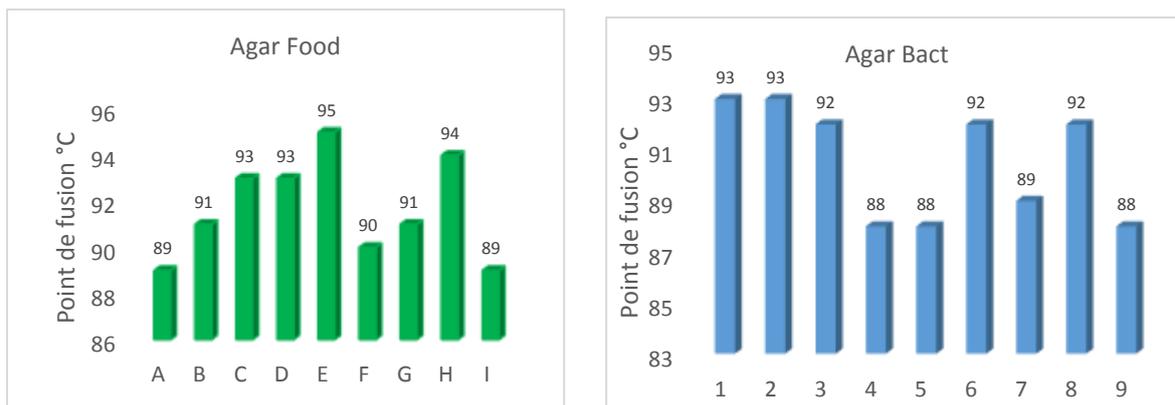


Figure 29 : Point de fusion des échantillons d'agar.

11. Force de gel

Les résultats obtenus (Figure 30), montrent que la force du gel des échantillons d'agar food varie entre 620 et 1120 g/cm². La force de gélification des échantillons E, H et C de l'agar food sont respectivement 1120, 1010 et 960g/cm², et dépassent la valeur fixée par la norme qui est 900g/cm². Cependant, les valeurs de la force de gélification enregistrées dans les échantillons d'agar bact sont toutes comprises entre 500 et 890g/cm² et répondent à la norme.

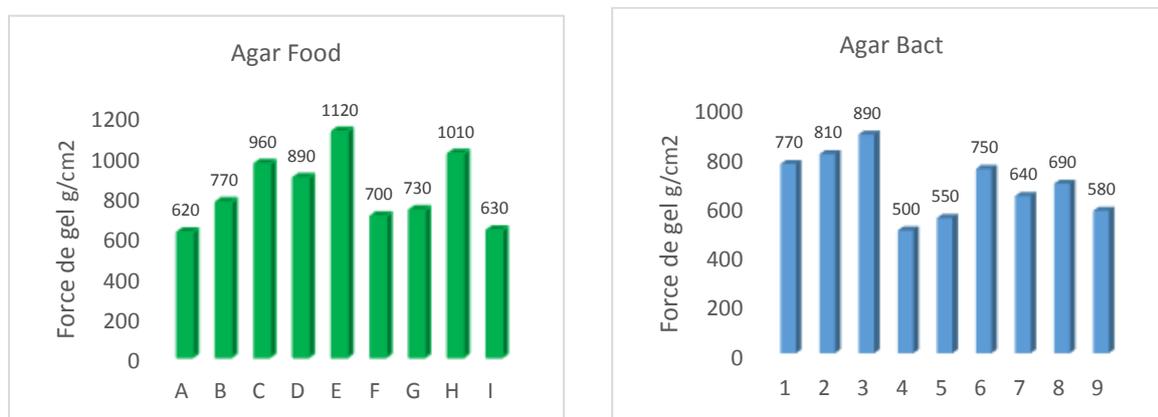


Figure 30 : Force de gélification des échantillons d'agar.

D'après les résultats obtenus, nous avons souligné que plus la viscosité est élevée, plus que la force du gel est élevée ainsi que le point de fusion. Ces propriétés mécaniques et physiques sont importantes et sont en considération dans la fabrication de produits alimentaires, pharmaceutiques, médicaux et cosmétiques. Les gels sont évalués en mesurant leur résistance mécanique aux contraintes.

I. Analyses bactériologiques

1. Dénombrement de FMAT

Au terme des incubations, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300 colonies sont prises en compte et font l'objet d'un dénombrement.

Les tableaux 5 et 6 exposent les résultats obtenus pour les échantillons d'agar bact. et d'agar food.

Tableau 5 : Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale des échantillons d'agar bact

Agar bact	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de colonies par boîtes	60 56	141 138	190 164	228 118	186 201	134 121	76 67	114 100	146 164
Nombre d'UFC/g	1160	2790	3540	3460	3870	2550	920	2140	3400
Norme	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000
Interprétation	C	C	NC	NC	NC	C	C	C	NC

Tableau 6 : Dénombrement de la Flore Mésophile Aérobie Totale des échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Nombre de colonies par boîtes	64 90	135 179	40 32	53 69	160 160	9 4	27 39	90 87	6 3
Nombre d'UFC/g	1540	3140	720	1220	3200	130	660	1770	90
Norme	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000	<3000
Interprétation	C	NC	C	C	NC	C	C	C	C

Le nombre de colonies de la flore mésophile aérobie totale enregistré dans les échantillons 3, 4, 5 et 9 de l'agar bact. est respectivement 3540, 3460, 3870 et 3400 UFC/g et celui de l'échantillon B et E de l'agar Food, 3140 et 3200 UFC/g. Ces valeurs dépassent la valeur de 3000 UFC/g exigée par la norme de la société avec un pourcentage de non-conformité de

33,34%. Les colonies observées sur la surface des milieux des échantillons cités peuvent être attribuées à une contamination microbienne.

2. Dénombrement des coliformes

Les résultats de dénombrement de coliformes sont présentés dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Dénombrement des coliformes totaux dans les échantillons d'agar bact

Agar bact	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de colonies par boîtes	0 0	3 4	0 1	0 0	0 0	0 0	3 0	0 0	0 0
Nombre d'UFC/g	0	70	10	0	0	0	30	0	0
Normes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	C	NC	NC	C	C	C	NC	C	C

Tableau 8 : Dénombrement des coliformes totaux dans les échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Nombre de colonies par boîtes	0 0	0 0	0 0	0 0	4 1	0 0	0 0	0 0	1 0
Nombre d'UFC/g	0	0	0	0	50	0	0	0	10
Normes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Interprétation	C	C	C	C	NC	C	C	C	NC

Nous avons observé des colonies de coliformes dans les échantillons 2, 3, 7 de l'agar bact et E et I de l'agar Food. Ceci témoigne d'une contamination de ces échantillons lors de la manipulation ou de l'incubation avec un pourcentage de non-conformité den 27,78%.

3. Dénombrement des germes totaux

Le tableau 9 montre l'absence des germes totaux dans les échantillons de l'agar bact analysés. Ces derniers répondent à la norme fixée par la société.

Tableau 9 : Dénombrement des germes totaux dans les échantillons d'agar bact

Agar bact	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Nombre de colonies mésophiles par boîtes	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 1 0	0 1 1	0 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0
Nombre d'UFC/g	0	0	0	0	<1	<1	0	0	0	
Nombre de colonies thermophiles par boîtes	0 0 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	1 1 0	1 0 0	0 0 0	
Nombre d'UFC/g	0	<1	0	0	0	0	1	<1	0	
Normes	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	
Interprétation	C	C	C	C	C	C	C	C	C	

4. Dénombrement des levures et moisissures

Les résultats obtenus dans les deux tableaux (tableau 8 et 9) montrent que les échantillons 3, 6, 7 de l'agar bact. et E et H de l'agar Food, présentent des colonies de levures et de moisissures. Cependant le nombre de UFC/g ne dépasse pas la norme (<100 UFC/g)

Tableau 8 : Dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons d'agar bact

Agar bact	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nombre de colonies par boîtes	0 0	0 0	0 1	0 0	0 0	2 1	2 0	0 0	0 0
Nombre d'UFC/g	0	0	10	0	0	30	20	0	0
Norme	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Interprétation	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Tableau 9 : Dénombrement des levures et moisissures dans les échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Nombre de colonies par boîtes	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	0 0	0 0	0 1	0 0
Nombre d'UFC/g	0	0	0	0	10	0	0	10	0
Norme	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Interprétation	C	C	C	C	C	C	C	C	C

5. Recherche de *Escherichia Coli*

Quatre échantillons sur neuf de l'agar food analysés ont développés des colonies suspectes sur les deux géloses sélectives solides EMB (Colonies verdâtres à éclat métallique) et TBX (Colonies bleu à bleu vert) (Tableau 12). Ceci indique la présence probable d'*E. Coli*. Le repiquage sur milieu TBX a confirmé la présence d'*E. Coli* dans les trois échantillons E, G et I.

Tableau 12 : Recherche de *Escherichia Coli* dans les échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
EMB	–	PCS	PCS	–	Présence	Présence	Présence	–	Présence
TBX	–	–	PCS	–	Présence	–	Présence	–	Présence
Repiquage sur TBX	–	–	–	–	Présence	Absence	Présence	–	Présence

L'identification biochimique par le test indole a confirmé la présence d'*E. Coli* dans les trois échantillons E, G et I (Tableau 13). L'analyse par Galerie classique réalisée en parallèle en repiquant les colonies suspectées sur milieu Kligler, a révélé la présence d'*E. Coli* dans les trois échantillons. Alors que le repiquage sur le milieu Citrate de Simmons a indiqué sa présence dans les deux échantillons E et G et son absence dans l'échantillon I. Le repiquage des colonies

développées sur les échantillons E et G sur milieu MR_VP a révélé l'absence d'*E. Coli* dans ces deux échantillons. (Tableau 13).

Tableau 13 : Identification biochimique d'*Escherichia Coli* dans les échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Test d'Indole	–	–	–	–	Présence	–	Présence	–	Présence
Milieu Kligler					Présence		Présence		Présence
Milieu Citrate de Simmons	–	–	–	–	Présence	–	Présence	–	Absence
Milieu MR-VP	–	–	–	–	Absence	–	Absence	–	–
<i>E. Coli</i> / 5g	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant
Normes	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Interprétation	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Ces résultats de la recherche d'*Escherichia Coli* montrent que tous les échantillons présentent une conformité aux normes réglementées.

6. Recherche des salmonelles

Après incubation des milieux gélosés SS et XLD, la lecture montre qu'il y a des colonies transparentes apparues sur milieu SS et des colonies rouges bien développées sur milieu XLD dans les échantillons B et C d'agar Food analysés. Le repiquage de ces colonies sur milieu TSA révèle l'absence de colonie suspectes, donc nous pouvons suggérer l'absence des salmonelles dans nos échantillons (tableau 14).

Tableau 14 : Recherche des Salmonelles dans les échantillons d'agar food

Agar food	A	B	C	D	E	F	G	H	I
SS	PCS	Présence	Présence	–	–	PCS	PCS	–	–
XLD	–	Présence	–	–	–	PCS	–	–	–

Repiquage sur TSA	–	Absence	Absence	–	–	–	–	–	–
Salmonelle/5g	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant
Normes	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
Interprétation	C	C	C	C	C	C	C	C	C

7. Traitement de la non-conformité

La qualité physicochimique des échantillons d'agar étudiés à montrer une conformité avec les normes internes de la société à l'exception du taux de monoxyde de chlore et la force du gel dont les valeurs enregistrées dépasse celle exigés.

Le dénombrement de FMAT a montré que, sur les 18 échantillons de l'agar-agar analysés, six ont été non-conformes, soit un pourcentage de non-conformité de l'ordre de 33,34% contre 66,67%. Alors que les résultats de dénombrement de coliformes, révèlent un taux de contamination de 27,78%. Par contre, 72,22% sont révélés conformes aux normes fixées par SETEXAM et dévoilent une bonne efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection et un respect des conditions d'hygiène.

L'examen bactériologique pour la recherche d'*E. Coli* et des salmonelles a révélé une absence totale de ces microorganismes dans les échantillons d'agar étudiés avec un pourcentage de conformité de 100% (0% de non-conformité). D'après le rapport de la Société (2017-2020), la présence d'*E. Coli* a été confirmée avec un pourcentage de non-conformité variant d'une valeur maximale de 99,9% pour l'année 2017, 81,8% pour l'année 2018 et une valeur minimale de 50% pour l'année 2019. De même, la recherche de salmonelles 'selon le même rapport' a été indiquée avec un taux de 23,16% et 8,93% pour l'année 2017 et 2018 respectivement. En 2019 et 2020, aucun cas de contamination par la salmonelle n'a été enregistré.

D'après ces résultats, nous pourrions suggérer une amélioration de l'état de la situation des contaminations de l'agar-agar food par *E. Coli* et Salmonelles durant les dernières années, qui se traduit par une amélioration de la qualité d'hygiène de la société. Ceci peut être expliqué par le respect de la réglementation, une production sécurisée, mais également une bonne hygiène des locaux, des matériaux et des appareils, ainsi que l'hygiène du personnel est satisfaisante.

Les micro-organismes impliqués dans l'altération et la contamination d'agar-agar, ont deux origines possibles ; Ils peuvent préexister dans la matière brute avant toute manipulation ou transformation. Dans ce cas, ils peuvent soit faire partie de la flore microbienne de leur hôte, soit être pathogènes. Certains champignons d'altération peuvent produire des mycotoxines dangereuses pour l'Homme, qui s'attaquent généralement au système nerveux ou aux muscles. Ils peuvent être apportés accidentellement lors des manipulations ultérieures du produit. Cet apport peut venir soit d'une mauvaise stérilisation des instruments, soit des manipulateurs par l'intermédiaire de la peau, de la bouche et des vêtements, soit des poussières de l'air (**Audrey, 1999**).

La décontamination des algues et la désinfection de matériel avec des agents chimiques, semblent aider les pathogènes à s'adapter à ce milieu (Annexe 5). En effet, de nombreuses bactéries comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, semblent aisément survivre à ce procédé. Les micro-organismes possèdent déjà des facultés naturelles d'adaptation à certains milieux, la frontière entre ces facultés et le développement de résistance est souvent floue. De plus, entre espèces voisines, il n'est pas rare que les facultés de résistance se transmettent, ce qui a pour conséquence d'augmenter un peu plus le potentiel de chaque espèce. Plusieurs recherches effectuées afin de trouver des composants chimiques supplémentaires pour lutter contre les contaminations microbiennes laissent finalement entendre qu'il y aura toujours des résistances développées à n'importe quel composé, ce qui pose de graves problèmes d'hygiène et économiques. Au contraire, comme cela se produit avec les antibiotiques, plus il y aura de nouveaux produits, plus il y aura de micro-organismes capables de leur résister (**Audrey, 1999**).

Certains micro-organismes, dont la croissance peut se faire dans des conditions physico-chimiques particulières ou extrêmes, résistent aux processus de désinfection et de stérilisation. Parmi les facteurs qui affectent le développement des micro-organismes sur un produit est la disponibilité de l'eau dans l'agar qui peut se traduire par un mauvais séchage de la poudre d'agar lors de la production. Un seuil minimum d'humidité est donc nécessaire à leur croissance. Tous les microbes ont un pH optimal de développement. Les levures et les moisissures sont plutôt acidophiles, ils poussent à des pH de 3 à 6.

Dans le cas de détection d'une non-conformité, les produits non conformes sont isolés pour refaire les analyses et décider le type de traitement (reprocess, retraitement, déclassement ou décontraction) pour les lots déclarés non conformes suivant le degré de gravité de la non-conformité. Une vérification régulière est effectuée par les responsables et la direction de qualité de l'efficacité du traitement par rapport aux exigences et des actions de correction mise

en œuvre. Les bilans du produit non conforme, ainsi que les différents types de traitement, l'analyse des causes et des actions correctives est discutés au cours des revues de direction.

Conclusion générale

Les algues marines sont utilisées pour de nombreuses applications en fonction de l'espèce considérée. L'agar-agar est un extrait cellulaire d'algues rouges, l'espèce *Gelidium sesquipedale* est une source importante de substances gélifiantes végétales.

Les résultats expérimentaux obtenus des analyses physico-chimiques et bactériologiques montrent que les cas de conformités sont plus élevés que celles de non-conformités, résultats attendus vu le passage parcouru par le produit tout le long du processus de la fabrication, au cours duquel il est soumis à un traitement thermique voisinant les 120°C ce qui exclut la persistance ou le développement des microorganismes. A cela, s'ajoute l'automatisation du processus réduisant ainsi le contact de la main d'œuvre avec le produit et l'application des règles d'hygiène. On peut conclure donc que les règles d'hygiène pendant la production et la manipulation sont plus ou moins respectées. Cependant, la détection de trace de monoxyde de chlore en quantités très faibles varie entre 0,012 et 0,042% dans les échantillons d'agar alimentaire indique l'utilisation de l'eau de Javel lors de la fabrication de l'agar, alors que les métaux lourds, tel que le Plomb, l'Arsenic et le Mercure, sont faiblement présents dans l'agar alimentaire. Les analyses de ces paramètres permettent donc de vérifier que les produits sont conformes aux critères légaux et réglementaires.

Par ailleurs, la présence des coliformes dans les échantillons analysés 2, 3, 7, E et I témoigne d'une mauvaise condition d'hygiène lors de la production, de manipulation ou de l'incubation, Le traitement effectué à la réception est inadéquat ou bien certaines souches de coliformes présentent une résistance au traitement. Dans ce cadre, les études bactériologiques mènent à conclure que les analyses effectuées ne sont pas tout à fait compatibles à la norme interne fixée par la Société.

L'intérêt de cette étude est de proposer une démarche cohérente, reconnu au niveau international pour appréhender les problèmes microbiologiques, mais aussi les contaminations chimiques et les altérations physiques associées aux produits. Dans cette perspective, SETEXAM doit chercher à développer des pratiques et améliorer la qualité de ses produits pour se conformer aux exigences légales et réglementaires. Aussi qu'elle doit maîtriser les risques liés à cette activité et mettre en œuvre une démarche préventive pour lutter contre la pollution et réduire l'impact de cette activité sur l'environnement

Références bibliographiques

AFSSA, 2008. AGENCE FRANÇAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS. Ligne directrice pour l'évaluation des eaux minérales naturelles au regard de la sécurité sanitaire. Page 1-92).

ANDA, 2017. Agence Nationale pour le Développement de l'Aquaculture. Guide de l'investissement en aquaculture au Maroc Tome 1 : Aspects techniques et économiques de l'activité aquacole.

Anning Toulement, Claude Rives, (1982). Sous la mer (faune et flore) Hatier. Paris, 29- 37.

Armisen R., 1997. Agar 1-21p. *In*: Imerson A., thickening and gelling agents for food.

Armisen R., Galatas F. & Hispanagar S. A., 2000. Agar 21-39p. *In*: Phillips G.O. & Williams P.A. Handbook of hydrocolloids. Woodhead Publishing, 450p.

Audrey B., 1999, Influence des paramètres d'action sur la croissance des micro-organismes en entreprise agro-alimentaire : Résistance des micro-organismes implique dans les accidents de fabrication ou les toxi-infections alimentaires. Université Cloude Bernard, Laboratoire de Microbiologie Industrielle et Appliquée.

Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Montiel H, (1992). Bactériologie clinique, 2ème édition Paris. P 168-171.

Baker A.J.M.R.D., Reeves, and Hajar A.M., 1994, Heavy Metal Accumulation and Tolerance in British Population of Metallophyte *Thlapsi caerulescens*, *J. & C. Pres, NewPhutol.* 127,61-68.

Bixler H. J. et Porse H., 2010. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry.

Bouakkaz A. Cachad C. & Gimenez G., 1994. Evaluation de l'agar, matériau solide présentant des caractéristiques acoustiques équivalentes à celles de l'eau. *Journal de physique supplément au Journal de Physique III*, 4.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Technique & Documentation, 1119p.

Carmichael and Falconer IR, (1993). Algal Toxins in Seafood and Drinking Water. London: Academic Press, I 87-209.

Cervantes and Gutierrez-Corona., 1994. Copper Resistance Mechanisms in Bacteria and Fungi, FEMS Microbiol. Rev. 14,121-138.

Ceseau C et Encyclopédie du monde végétal. Lidis 1964. *Chemical Papers*, 63 (1): 26-38.

Craigie J.S., 1990. Cell walls, 221-258p. *In: Biology of the Red Algae*, Cambridge University Press, and 517p.

Delma G., 2010. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives-données de déclaration obligatoire.

Demain A.L., 1981. Industrial microbiology. *Science*, 214, 987-995.

DPM, Département de la Pêche Maritime. Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts La mer en chiffre, 2006.

DPM, Département de la Pêche Maritime. Ministère de l'Agriculture, de la Pêche Maritime, du Développement Rural et des Eaux et Forêts La mer en chiffre, 2010.

EIMtili N., F.Z. Fakihi Kachkach et M. El Harchi Laboratoire de Biologie et Santé, Faculté des Sciences, Université Abdelmalek Essaadi, Tétouan. Les algues marines: nouvelle potentialité économique pour le Maroc. Quelle stratégie biotechnologique? *Cahiers UAE*, 8-9, (2013): 1-7.

FAO, 2012. FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2012.

FAO, 2016. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016.

Fischer W., Schneider M. & Bauchot M.L., 1987. Guide Fao d'Identification des Espèces pour les Besoins de la Pêche, Méditerranée et Mer Noire - Zone de Pêche 37, Volume 1: Végétaux et Invertébrés.

Garon-Lardiere S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata*, thèse doctorat en Chimie, université de Bretagne occidentale. Ecole doctorale des sciences de la matière, de l'information et du vivant.

GIVERNAUD T., A. MOURADI, L.M. HASSANI, R. AKALLAL and J. RIYAH. "Design of a new technique for reseeded of over harvested bed of *Gelidium sesquipedale* (Turn.) Thuret (Rhodophyta, Gelidiales) in Morocco". Proceeding of the 17th international seaweed

symposium Cap town, A. R. O. Chapman, R. J. Anderson, V. Vreeland and T. R. Davison (eds), Oxford University press (2003).123-130.

GIVERNAUD Th., SQALI N., BARBAROUX O., ORBI A., SEMMAOUI Y., REZZOUM N., MOURADIAND N. and KAAS R. “Mapping and biomass estimation for a harvested population of *Gelidium sesquipedale* (Turn.) Thuret (Rhodophyta, Gelidiales) along the Atlantic coast of Morocco”. *Phycologia*. 44 (1), (2005). 66-71.

Guiry M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M., 2011. *AlgaeBase*. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

HANIF N., CHAIR M., IDRISSE M.C. et NAOKI T. Thierry “L'exploitation des algues rouges *Gelidium* dans la région d'El-Jadida : aspects socio-économiques et perspectives” *Afrique Science* 10/1 (2014) 103-126.

IFREMER, INRH, SETEXAM, UNIVERSITE KENITRA, 2006. Cartographie et estimation de la biomasse d'une population récoltée de *Gelidium sesquipedale* le long de la côte atlantique du Maroc, (2006). 12-13.

Imerson A., 2011. Food stabilisers, thickning and gelling agents, Wiley Blackwell & Sons. 368 p.

Jean-Paul Alayse et Yann Le Nozer'h, Les algues,1997, pp.32. *Journal of Applied Phycology*, 23:321-335.

Kabbaj I., 1994. Biologie de *Gelidium sesquipedale* des côtes marocaines : Etudes des peuplements, écophysiologie, cytologie et morphogénèse. Thèse de Doctorat d'Université, Univ. De Caen, France.126p.

Kohajdová Z., & Karovičová J., 2009. Application of hydrocolloids as baking improvers. *Chemical Papers*, 63 (1): 26-38.

Lahaye M., 2001. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology*, **13** : 173-184.

Lepoutre A., Salomon J., Charley C. & Le Querrec F. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1994. *Bull. épidémiol. hebd.* , 21, 93-9. 1996.

Liu M-Y., Mei J-f, Yi Y., Chen J-S. & Ying G-Q., 2008. Advances in Study on Biological Activities of Agaro-Oligosaccharide. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6.

McHugh D.J., 2003. A guide to the seaweed industry, F.A.O. Fisheries Technical Paper No.441.

Mortensen, Alicja; Aguilar, Fernando; Crebelli, Riccardo; Di Domenico, Alessandro; Frutos, Maria Jose; Galtier, Pierre; Gott, David; Gundert- Remy, Ursula; Lambré, Claude; Leblanc, Jean- Charles; Lindtner, Oliver; Moldeus, Peter; Mosesso, Pasquale; Oskarsson, Agneta; Parent- Massin, Dominique; Stankovic, Ivan; Waalkens- Berendsen, Ine; Woutersen, Rudolf Antonius; Wright, Matthew; Younes, Maged; Brimer, Leon; Peters, Paul; Wiesner, Jacqueline; Christodoulidou, Anna; Lodi, Federica; Tard, Alexandra; Dusemund, Birgit (2016). *Re-evaluation of agar (E 406) as a food additive. EFSA Journal, 14(12)*, – . doi:10.2903/j.efsa.2016.4645.

Mouradi A., Benharbit O., Hassani M., Mouradi Y., Bennis M. & Givernaud T., 2007. Analyse de la croissance et des variations morphologiques saisonnières de *Gelidium sesquipedale* (Turner) Thuret (Rhodophyceae, Gélidiales) de la côte atlantique marocaine. *Afrique SCIENCE*, 03(3): 434 – 460.

Mouradi A., Meryem C., Mohammed F., Rachida A., Amina G et Thierry G., 2006. Variabilité interspécifique de trois algues rouges : *Hypnea musciformis*, *Gracilaria multipartita* et *Gelidium sesquipedale* (Rhodophycées) de la côte atlantique marocaine. *Afrique SCIENCE*, 02(3): 365 – 389.

Mouradi G.A., T. Givernaud, H. Morvan and J. Cosson. “Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gélidiales): Biochemical composition and seasonal variations”. *Bot. Mar.* 35 (1992) 153-159.

Mouradi -givernaud a.recherche biologique et biochimique pour la production d'agrose chez *gelidium*,1992.

Murano E., Jellůš V., Piras A. & Toffanin R., 1998. Cell wall polysaccharides from *Gelidium* species: physico-chemical studies using MRI techniques. *Journal of Applied Phycology*, 10 (3): 315-322.

Nussinovitch A., 1997. *Hydrocolloid applications: gum technology in the food and other industries*. New York, NY: *Blackie Academic & Professional*, 354 p.

Nussinovitch A., 2010. *Polymer Macro- And Micro-Gel Beads: Fundamentals and Applications*. Springer, 303p.

ONEM., 1998. Etude nationale sur la biodiversité des algues marines (Royaume du Maroc). Rapport de synthèse. Réédition 2001. 160 pages.

Ouhssine K., Ouhssine M. & Mohammed El yachioui M., 2006. Caractérisation chimique et microbiologique des déchets de *Gelidium sesquipedale* avant et après fermentation. *Société de Pharmacie de Bordeaux*, 145: 31-40.

Perèz R., 2009. Ces algues qui nous entourent : Conception actuelle, rôle dans la biosphère, utilisation, culture. Quae, 131p.

Perèz., 1997. Ces algues qui nous entourent. In : Arbault, S., Barbaroux, O., Phliponeau, P., Rouxel, C. (Eds.). France, Plouzané, Editions IFREMER, pp : 272.

PITT J.I., **BASILICO J.C.**, **ABARCA M.L ET LOPEZ C.** (2000). - Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 41–46. Purchase.

Prèz R., Kaas R., Campello F, Arbault S. et Barbaroux O. (1992). La culture des algues marines dans le monde. Ifremer, 614 pages.

Raven P. H., Evert R.F. et Eichhorn S.E., 2003. Biologie végétale, De Boeck Supérieur, 968p.

Riadi H., 1998. *Etude nationale sur la biodiversité. Algues marines*, Direction de l'observation des études et de coordination, 98 p.

Rochas c.lahaye m, solide state ¹³c nmr spectroscopy of seaweeds, agar and carrageenan carbohydrate, polymers 1989, 10:65-72.

Ruiz, 2005. Extraction, Détermination Structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'Algue rouge, thèse de doctorat en Chimie appliquée-Chimie des Substances Naturelles, université de Limoges, Ecole Doctorale Sciences- Technologie-Santé.

Seki H.I., Suzuki A., and Mitsueda S. 1998. Biosorption of Heavy Metal on Rhodobacter sphaeroides and Alcaligenes eutrophus H16, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1985 Springer, 320 p.

Stewart G.F., 1963. *Advances in Food Research*, Volumes 1. Academic Press, 433p.

Steyn PS, 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Méd Vét*, 149, 6: 469-478.

Tap.J. Caractérisation moléculaire des Escherichia coli O111 et diversité des souches isolées en France. Unité Biodiversité Bactéries Pathogènes Emergentes. Centre nationale de références des Escherichia coli et Shigella, 2004.

Van Buren G., Rashid A., Yang A.D., Abdalla E.K., Gray M.J., Liu W., Somcio R., Fan F., Camp E.R., Yao J. C., Ellis L.M., 2007. The Development and Characterization of a Human Midgut Carcinoid Cell Line. *Clinical Cancer Research*, 13 (16): 4704-4712.

Wickens G.E., 2004. Economic Botany: Principles and Practices. Springer, 556p.

Willam K., Gordon H. et Craig Heller H. Le monde vivant, traité de Biologie. Flammarion 1994.

Zidane H., A. Orbi, N. Sqalli , F. Zidane , M. Talbaoui , M. Hasnaoui & M. Fakhaoui (2006) Survey of the Cycle of Reproduction of Red Algae *Gelidium sesquipedale* (Turner) Thuret (Case of the Maritime Zone of El JadidaJarf Lasfer of Morocco), *Environmental Technology*, 27:8, 933-943.

Webographie

AFP., 2015 <https://lematin.ma/journal/2016/au-maroc-les-algues-peuvent-etre-une-source--de-developpement-local/244680.html> (consulté le 25/03/22)

Brevet. Procédés d'insertion des produits super-absorbants dans une structure fibreuse [en ligne]. Disponible sur : <https://www.google.com/patents/EP0022792B1?cl=fr> (consulté le 30/03/22)

CHIRAZ. Les polysaccharides d'algues : les alginates [en ligne]. Disponible sur : <http://sciences.savoir.fr/les-polysaccharides-d-algues-les-alginates/> consulté le 15/04/22

FAO, 1990. Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China, Disponible sur: <https://www.fao.org/3/AB730E/AB730E03.htm#chIII.1.1.A> (consulté le 17/03/22)

OMS., 2018 : Organisation mondiale de la Santé Salmonella (infections à, non typhiques) [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) (consulté le 23/04/22)

Sabour. B., 2011. L'algue rouge agarophyte *Gelidium sesquipedale* ou 'rbiâa' de la côte des Doukkala : Pr Brahim Sabour Algologie _ Toxicologie Aquatique Faculté des Sciences El Jadida. <https://www.rusibis.com/spip.php?article6>. (Consulté le 14/03/22)

Annexes

Annexe 1 : Matériel utilisé

La liste suivante représente l'ensemble des matériels utilisés le long des étapes de la recherche des micro-organismes et de leurs purifications :

- Matériels de stérilisation en chaleur humide (Autoclave $T^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ [± 1]).
- Flacons Schott stériles capacité (250 ml, 500 ml, 1 l),
- Pipette stérile capacité (1 ml, 10 ml),
- Boîtes de Pétri stérile de diamètre 90 mm stériles,
- Etuve réglable de 37°C , 45°C , 55°C , 140°C (+ou — 2),
- Bain marie régler à $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- Compteur de colonies,
- Balance de précision,
- Spatules stériles,
- Epruvettes graduées de capacité 100 ml,
- Plaque chauffante avec agitation magnétique,
- Barreau magnétique,
- Bec Bunsen,
- Homogénéisateur type Stomacher ou équivalent,
- Tubes à essai,
- Vortex,
- Anses calibrées,
- Autre matériel courant du laboratoire.

➤ Stérilisation du matériel

Les pipettes et les spatules sont enveloppées dans du papier Kraft et stérilisées à l'étuve à 140°C pendant au moins 4 heures. Les flacons Schott sont stérilisés par vapeur fluente à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Les anses et les boîtes de pétri utilisés sont commercialisés en emballages stérile à usage unique.

Annexe 2 : Fiche technique des milieux de culture

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau déminéralisée.

➤ Milieux de culture liquide

Diluant tryptone sel

- **Principe :** Le milieu tryptone sel est un diluant isotonique faiblement peptoné utilisé pour les dilutions dans les analyses de denrées alimentaires ou cosmétiques. (Ou un autre liquide qui n'exerce aucune activité microbienne ; tampon pharmacopée.)
- **Formule :**
 - Tryptone : 1g
 - Chlorure de sodium : 8,5g
- **Préparation :** Mettre en solution dans 1000 ml d'eau déminéralisée le milieu déshydraté, agiter lentement jusqu'à complète dissolution puis ajuster le pH à $7 \pm 0,2$ si nécessaire et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon Nutritif

- **Principe :** Le bouillon nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.
- **Formulation :**
 - Peptone : 5g
 - Extrait de viande : 3g
- **Préparation :** Mettre en solution le milieu déshydraté dans l'eau déminéralisée, ajuster le pH à $6,8 \pm 0,2$ si nécessaire autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon TSB : Trypticase Soja

- **Principe :** Le bouillon Tryptone-Soja est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance d'une grande variété de micro-organismes. Il est recommandé par la Pharmacopée Européenne et Américaine.
- **Formulation :**
 - Peptone pancréatique de caseine : 17g
 - Peptone de soja : 3g
 - Chlorure de sodium : 5g
 - Phosphate dipotassique : 2,5g
 - Glucose monohydraté : 2,5g
- **Préparation :** Mettre en solution le milieu déshydraté dans 1l d'eau déminéralisée, ajuster le pH à $7,3 \pm 0,2$, puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon de MacConkey

- **Principe :** Le milieu répond à la formule décrite dans la Pharmacopée européenne pour la recherche spécifique d'*Escherichia coli*. La fermentation du lactose est mise en évidence par l'acidification du milieu qui provoque le virage au jaune de l'indicateur pH (pourpre de bromocrésol). La présence de bile purifiée inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif.
- **Formulation :**
 - Tryptone : 20g
 - Lactose : 10g
 - Bile de bœuf bactériologique : 5g
 - Pourpre de bromocrésol : 0,01g
- **Préparation :** Mettre en solution dans l'eau déminéralisée le milieu déshydraté, agiter lentement jusqu'à complète dissolution, ajuster le pH est à $7,3 \pm 0,2$ si nécessaire et répartir en tubes à raison de 10ml et autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja

- **Principe :** Le bouillon de Rappaport-Vassiliadis Soja est utilisé pour l'enrichissement sélectif de *Salmonella* dans les denrées alimentaires ou les produits pharmaceutiques.
- **Formulation :**
 - Tryptone : 4,5g
 - Chlorure de sodium : 7,2g
 - Phosphate monopotassique : 1,44g
 - Chlorure de Magnésium anhydre : 13,4g
 - Oxalate vert de malachite : 0,036g
- **Préparation :** Mettre en solution dans l'eau déminéralisée, agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Bouillon RM-VP : Voges-Proskauer au rouge de méthyle

- **Principe :** Le bouillon RM-VP est utilisé pour différencier les micro-organismes de la famille des *Enterobactéries*, sur la base des tests du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer.
- **Formulation :**
 - Tryptone : 7g
 - Phosphate dipotassique : 5g
 - Glucose : 5g
- **Préparation :** Mettre en suspension le milieu déshydraté dans 1l d'eau déminéralisé. Chauffer si nécessaire pour dissoudre complètement le milieu. Distribuer dans des tubes à essai stériles en quantités de 10ml et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

➤ Milieux de culture semi-solide

Milieu Kligler

- **Principe :** La gélose Kligler-Hajna est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S. Son utilisation est recommandée pour la recherche d'E. Coli et de Salmonella dans les aliments et les produits laitiers.
- **Formulation :**
 - Tryptone : 15g
 - Sulfate ferreux : 0,2g
 - Extrait de viande : 3g
 - Chlorure de sodium : 5g
 - Extrait de levure : 3g
 - Thiosulfate de sodium : 0,3g
 - Lactose : 10g
 - Rouge de phénol : 0,024g
 - Glucose monohydraté : 1g
 - Agar- agar bactériologique : 7,5g
- **Préparation :** Dissoudre le milieu déshydraté dans l'eau déminéralisé, chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Répartir en raison de 10ml par tubes et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15min, puis laisser refroidir en position inclinée.

Milieu Citrate de Simmons

- **Principe :** Le milieu utilisé pour la différenciation des Bacilles Gram négatifs, il repose sur l'aptitude de certains microorganismes à pouvoir de développer avec le citrate comme seule source de carbone et d'énergie.
- **Formulation :**
 - Sulfate de magnésium : 0,2g
 - Phosphate monoammonique : 1g
 - Phosphate bipotassique : 1g
 - Chlorure de sodium : 5g
 - Citrate de sodium 2g
 - Bleu de bromothymol : 0,08g
 - Agar : 7,5g
- **Préparation :** Dissoudre le milieu déshydraté dans l'eau déminéralisé, chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Distribuer dans des tubes à essai stériles en quantités de 10ml et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15min, puis laisser refroidir en position inclinée.

➤ Milieux de cultures solides

Gélose PCA : Plate Count Agar :

- **Principe :** La gélose PCA est un milieu recommandé pour le dénombrement standardisé des bactéries dans l'eau, les produits laitiers et les aliments, les produits cosmétiques ou pharmaceutiques.
- **Formulation :**
 - Tryptone : 5g
 - Extrait de levure : 2,5g
 - Glucose : 1g
 - Agar-agar bactériologique : 12g
- **Préparation :** Mettre le milieu déshydraté en solution dans 1l d'eau déminéralisée, faire bouillir jusqu'à complète dissolution, et ajuster le pH si nécessaire à $7\pm 0,2$ à 25°C. Couler en bouteille selon la capacité désirée, stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes puis maintenir en surfusion à 45-50°C et garder à cette température pas plus de 4 heures.

Gélose VRBL : Violet Red Bile Lactose Agar

- **Principe :** La gélose VRBL est recommandée pour la recherche des coliformes dans les aliments et les produits laitiers.
- **Formulation :**
 - Peptone pepsique de viande : 7g
 - Extrait autolytique de levure : 3g
 - Lactose : 10g
 - Sels biliaire : 1,5g
 - Chlorure de sodium : 5g
 - Rouge neutre : 0,03g
 - Cristal violet : 0,002g
 - Agar-agar bactériologique : 15g
- **Préparation :** Mettre en suspension le milieu déshydrater dans l'eau déminéralisée, porter à ébullition en agitant jusqu'à complète dissolution, ne pas autoclaver. Refroidir à 45-50°C et garder à cette température pas plus de 4 heures.

Gélose SDA : Sabouraud Dextrose Agar

- **Principe :** SDA est un milieu d'isolement non sélectif utilisé pour la croissance et le maintien de champignons non pathogènes, il est également utilisé pour la récupération et le dénombrement total des levures et moisissures dans la surveillance de l'environnement.
- **Formulation :**
 - Dextrose : 40g
 - Digestat pancréatique de tissus animaux : 5g
 - Digestat pancréatique de caséine : 5g
 - Agar-agar bactériologique : 15g

- **Préparation :** Mettre le milieu déshydraté en solution dans l'eau déminéralisée, agiter jusqu'à complète dissolution, puis stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes et garder à cette température pas plus de 4 heures.

Gélose EMB : Eosine-Bleu de Méthylène

- **Principe :** La gélose à l'éosine et au bleu de méthylène est un milieu légèrement sélectif servant à l'isolement et à la différenciation de bacilles entériques à Gram négatif, conforme aux spécifications de la Pharmacopée des Etats-Unis (USP). Elle est utilisée pour tester les matériaux cliniques, les aliments et les produits laitiers pour la détection et la confirmation des *E.Coli*.
- **Formulation :**
 - Peptone pancréatique de gélatine : 10g
 - Lactose : 10g
 - Phosphate dipotassium : 2g
 - Eosine Y jaunâtre : 0,4g
 - Bleu de méthylène : 0,065g
 - Agar-agar bactériologique : 15g
- **Préparation :** Dissoudre dans 1000ml d'eau déminéralisée le milieu déshydraté, porter à ébullition lentement en agitant jusqu'à complète dissolution. Ne pas autoclaver, ramener à environ 47°C, puis couler en boîtes de Pétri stériles.

Gélose TBX : Tryptone bile glucuronique

- **Principe :** TBX est un milieu différentiel pour l'identification immédiate de *E. Coli* dans les produits alimentaires et les échantillons de l'environnement de production. Le milieu contient des sels biliaires qui inhibent la croissance de la majorité des bactéries à Gram positif et de BCIG (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique) qui permet de détecter l'enzyme β-D-glucuronidase, la plupart des souches d'*E. coli* possédant une β-D-glucuronidase agissent par clivage du BCIG, entraînant la coloration des colonies en bleu à bleu vert.
- **Formulation :**
 - Peptone de caseine : 20g
 - Sels biliaires : 1,5g
 - Acide β-D-glucuronique-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl (BCIG) : 144μmol
 - Diméthyl sulfoxyde (DMSO) : 3ml
 - Agar-agar bactériologique : 15g
- **Préparation :** Dissoudre tous les ingrédients dans l'eau et chauffer jusqu'à l'ébullition, ajuster le pH si nécessaire de façon à avoir un pH après stérilisation de $7,2 \pm 0,2$ à 25°C. Stériliser le milieu à l'autoclave à 121°C pendant 15min, refroidir immédiatement dans un bain marie ajusté à 44°C, puis couler en boîtes de Pétri stériles.

Gélose SS : Salmonella-Shigella

- **Principe :** La gélose SS est utilisée pour l'isolement sélectif des *Salmonella* et des *Shigella* dans les prélèvements cliniques et les denrées alimentaires.
- **Formulation :**

- Peptone pancréatique de viande : 5g
- Extrait de viande : 5g
- Lactose 10g
- Sels biliaires 8,5g
- Citrate de sodium : 10g
- Thiosulfate de sodium : 8,5g
- Citrate ferrique ammoniacal : 1g
- Rouge neutre : 0,025g
- Vert brillant : 0,0003g
- Agar-agar bactériologique : 13,5g
- **Préparation :** Mettre en suspension le milieu déshydraté dans l'eau, porter à ébullition lentement jusqu'à complète dissolution, Ne pas autoclaver, ramener à environ 47°C et couler en boîtes de Pétri stériles.

Gélose XLD : Xylose Lysine Désoxycholate

- **Principe :** La gélose XLD est un milieu sélectif des entérobactéries et particulièrement de Salmonella et de Shigella. Elle permet une orientation de l'identification des entérobactéries basée sur 3 critères : fermentation des sucres, décarboxylation de la lysine et production d'hydrogène sulfuré. Son utilisation est recommandée par les pharmacopées européenne et américaine.
- **Formulation :**
 - Extrait autolytique de levure : 3g
 - L-lysine : 5g
 - Lactose : 7,5g
 - Saccharose : 7,5g
 - Xylose : 3,5g
 - Désoxycholate de sodium : 2,5g
 - Chlorure de sodium : 5g
 - Thiosulfate de sodium : 6,8g
 - Citrate ferrique ammoniacal : 0,8g
 - Rouge de phénol : 0,08g
 - Agar-agar bactériologique : 13,5g
- **Préparation :** Mettre en suspension le milieu déshydraté dans l'eau, porter à ébullition lentement jusqu'à complète dissolution, Ne pas autoclaver, ramener à environ 47°C, ajuster le pH si nécessaire à $7,4 \pm 0,2$ et couler en boîtes de Pétri stériles.

Gélose TSA : Trypticase Soja Agar

- **Principe :** La gélose TSA est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de micro-organismes.
- **Formulation :**
 - Trypticase : 15 g
 - Peptone de Soja : 5g
 - Chlorure de sodium : 5g

- Agar-agar bactériologique : 15g
- **Préparation :** Mettre en suspension le milieu déshydraté dans 1l d'eau déminéralisée, chauffer jusqu'à dissolution complète puis ajuster le PH si nécessaire $7,3\pm 0,2$. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes, ramener à environ 47°C et couler en boîtes de pétri stériles.

Annexe 3 : La lecture de certains tests biochimiques

Le test indole

Une goutte du réactif de Kovacs est déposée directement sur les colonies suspectes sur TBX, la lecture est immédiate, la couche de réactif prend une coloration rouge cerise après quelques minutes : Indole+

Lecture et interprétation du milieu Kligler

Pour mettre en évidence les fermentations du glucose et du lactose, des subcultures effectuées à partir de colonies suspectes par piqûre centrale en culot et des stries sur la pente, la lecture est faite après 24 heures d'incubation à 37°C .

- La fermentation du glucose provoque un virage au jaune culot. La production de gaz se traduit par l'apparition de bulles pouvant dans certaines cas provoquer la fragmentation du milieu.
- La fermentation du lactose un virage au jaune de la pente.

Lecture et interprétation du milieu Citrate de Simmos

Effectuer des subcultures à partir de colonies suspectes par ensemencement à la surface du milieu par des stries. La lecture est faite après 24 heures à 37°C .

- La métabolisation du citrate est visualisée par le virage de l'indicateur coloré au bleu foncé.

Lecture et interprétation du milieu RM-VP

Ensemencer le milieu MR-VP avec une culture pure incubée à 37°C pendant 48h

- Réaction au rouge de méthyle

Après incubation, Prélever environ 2ml de milieu et les transvaser dans un autre tube, y verser 1 à 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle.

Le test au rouge de méthyle est basé sur l'utilisation d'un indicateur de pH pour détecter l'acidité lorsqu'un organisme fermente le glucose. C'est la raison d'un développement d'une couleur rouge (pH<4,2) : RM+

- Réaction de voges-Proskauer

Après incubation, prélever 1ml de milieu et ajouter 0,5ml d'une solution d'alpha-naphtol et 0,5ml d'une solution aqueuse de soude. On agite et on attend 15min, Si une coloration rouge en surface pouvant diffuser dans le milieu apparait, la souche est VP+

Les caractéristiques d'*Escherichia Coli*

La souche d'E.Coli doit présenter les caractères suivants :

Utilisation du glucose	Positive
Utilisation Lactose	Positive
Mannitol	Positive
ONPG : Recherche de B-Galactosidase	Positive
TDA	Négative
Oxydase	Négative
Gaz	Positive
H ₂ S	Négative
Utilisation du citrate	Négative
Réaction au rouge de Méthyle	Positive
Réaction de Voges-Proskauer	Négative
Production d'indole	Positive
Uréase	Négative

Les caractéristiques de Salmonelles

La souche de salmonelles doit présenter les caractères suivants :

Utilisation du glucose	Positive
Utilisation Lactose	Positive
Mannitol	Positive
ONPG : Recherche de B-Galactosidase	Positive
TDA	Négative
Oxydase	Négative
Gaz	Positive
H ₂ S	Négative
Utilisation du citrate	Négative
Réaction au rouge de Méthyle	Positive
Réaction de Voges-Proskauer	Négative
Production d'indole	Positive
Uréase	Négative

➤ Identification par Galerie API 20 E

Api 20 E est un système standardisé pour l'identification des Entérobactériacae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie Api 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation (18h à 24h à 37°C) se traduisent par des virages de coloration spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification API LAB ou du catalogue analytique selon les recommandations du fournisseur. La qualité du produit est considérée non conforme si on enregistre la présence d'au moins une bactérie.

Annexe 4 : Références normatives

Codex Alimentarius

Le code alimentaire est un ensemble de normes, de lignes directrices et de codes d'usages adoptés par la Commission du Codex Alimentarius. La Commission a été créée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) afin de protéger la santé des consommateurs et de promouvoir des pratiques loyales en matière de commerce de denrées alimentaires. Elle est l'élément central du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires.

Les normes Codex garantissent la sécurité sanitaire des aliments en vue de leur commercialisation. Les consommateurs peuvent compter sur la qualité et la sécurité sanitaire des produits alimentaires qu'ils achètent et les importateurs sont certains que les aliments qu'ils commandent correspondent bien aux spécifications du Codex.

E406 inscrit dans le codex alimentarius comme un additif alimentaire selon FAO :

Additifs dont l'utilisation est autorisée, dans des conditions spécifiées, conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)



No. de SIN	Additif	Catégories fonctionnelles	Étape	Année	Acceptable dans les aliments relevant des normes de produits suivantes
260	Acide acétique, glacial	Régulateur de l'acidité, Conservateur	Adoptée	1999	
472a	Esters glyceroliques de l'acide acétique et d'acides gras	Émulsifiant, Séquestrant, Stabilisant	Adoptée	1999	
1422	Adipate de diamidon acétylé	Émulsifiant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	1999	
1414	Phosphate de diamidon acétylé	Émulsifiant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	1999	
1451	Amidon oxydé acétylé	Émulsifiant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	2005	
1401	Amidon traité à l'acide	Émulsifiant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	1999	
406	Agar-agar	Agent de charge, Support, Émulsifiant, Gélifiant, Agent d'enrobage, Humectant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	1999	CS 96-1981, CS 97-1981
400	Acide alginique	Agent de charge, Support, Émulsifiant, Agent moussant, Gélifiant, Agent d'enrobage, Humectant, Séquestrant, Stabilisant, Épaississant	Adoptée	1999	

Figure 31 : Norme générale codex pour les additifs alimentaires

Pharmacopée européenne

La pharmacopée définit l'ensemble des matières premières utilisées en pharmacologie. Elle inclut ainsi les composants d'origine minérale, végétale, animale, et même les substances chimiques destinées à la fabrication de médicaments à « usage humain ou vétérinaire ». Elle contrôle aussi la qualité des contenants des médicaments. De plus, elle définit et fixe les méthodes d'analyse servant à assurer ce contrôle.

La pharmacopée européenne est assurée par la DEQM -Direction Européenne de la Qualité du Médicament et Soins de Santé. Elle s'applique aux 35 états de la communauté européenne. Elle définit les critères de pureté des matières premières entrant dans la fabrication de médicaments à usage humain ou animal, ainsi que les méthodes d'analyse à pratiquer pour en assurer le contrôle. E406 est inscrit sous le nom ‘‘agar-agar’’ à la Pharmacopée Européenne (monographie 08/2019, 0310 corrigé 10.0).

Normes applicables par Setexam

Setexam
Service Qualité

Mise à jour le : 08/02/21

Tableau de suivi des exigences applicables par SETEXAM

Article	Texte	Applicabilité	Conformité	Action	Responsable de l'action	Date de réalisation	Bilan
V - ADDITIFS ALIMENTAIRES							
Arrêté conjoint du ministre de l'Agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la Santé n° 1795-14 du 14 réieb.1435 (14 mai 2014) fixant la liste et les limites des additifs alimentaires autorisés à être utilisés dans les produits primaires et I		Non	oui	La limite maximal des résidus des pesticides ne s'applique pas aux algues au niveau de cette réglementation.			
Règlement EC 231/2012 de l'établissement des spécifications des additifs alimentaires		oui	oui				
Euro chemical codex		oui	oui				
Pharmacopée européen Version 10		oui	oui				
Circulaire conjointe relative aux additifs alimentaires, version 2009		oui	oui				
Recommandation 2012/464 concernant la surveillance des métaux et l'iode dans les algues marines, les halophytes et les produits à base d'algues marines		oui	oui	Contrôle de l'analyse de l'iode par la méthode ICP	Responsable labo	sept-20	Action réussie pour les agrs bio
Le règlementation chinoise GB 1866-239-2016		oui	oui				
II - ETIQUETAGE							
Décret n° 2-12-389 du 11 jourmada II 1434 (22 avril 2013) fixant les conditions et les modalités d'étiquetage des produits alimentaires		oui	oui				
Décret n° 2-15-218 du 30 réieb. 1436 (19 mai 2015) modifiant et complétant le décret n° 2-12-389 du 11 jourmada II 1434 (22 avril 2013) fixant les conditions et les modalités d'étiquetage des produits alimentaires		oui	oui				
Arrêté du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime n° 1329-10 du 29 chaabane 1431 (11 août 2010) relatif aux produits dispensés de certaines mentions obligatoires au niveau de leur étiquetage		oui	oui				
Directive 2007/68/CE de la commission du 27 Nov 2007 modifiant l'annexe 3 de la directive 2000/13/CE		oui	oui				
Information du consommateur sur l'étiquetage des denrées alimentaires modifiant le CE 2024/2006 et CE 1935-2006 (UE 1169/2011)		oui	oui				
III- Emballage							
Matériaux et objet en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires EC /10/2011		oui	oui				
Matériaux et objet en matière plastique destinés à entrer en contact avec les denrées alimentaires CC 1935/2004		oui	oui				

Figure 32 : Tableau de suivi des exigences applicables par Setexam

Norme ISO 6887-1. 2017.

ISO 6887 définit des règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

Règlement de l'Union européenne

un règlement est un acte juridique de l'Union européenne, vise à garantir l'application uniforme du droit de l'UE. Pour exercer les compétences de l'Union, les institutions adoptent des règlements, des directives, des décisions, des recommandations et des avis. Le règlement a une portée générale. Il est obligatoire dans tous ses éléments et il est directement applicable dans tout État membre.

E406 est autorisée en tant qu'additif alimentaire dans l'Union européenne (UE) conformément à l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 sur les additifs alimentaires autorisés dans les denrées alimentaires et conditions d'utilisation

Annexe 5 : Processus de désinfection et de stérilisation

Il existe un vocabulaire normalisé permettant de bien distinguer les différents termes utilisés :

Stérilisation : Opération qui a pour objet de tuer tous les micro-organismes contenus dans une préparation. Le matériel traité est dit stérile, c'est-à-dire qu'aucun micro-organisme ne peut s'y développer.

Désinfection : Opération au résultat permettant de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par le milieu inerte contaminé.

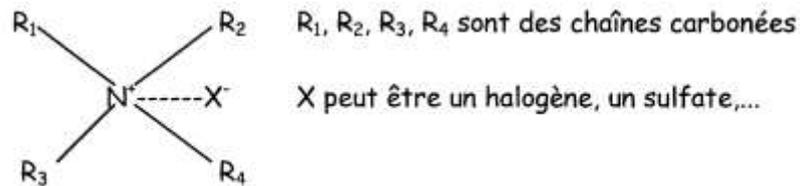
Décontamination : Opération au résultat permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables. Cela peut s'appliquer à des tissus vivants, et n'implique pas forcément l'élimination des micro-organismes : dans certains cas, seule leur croissance est inhibée.

AGENTS CHIMIQUES

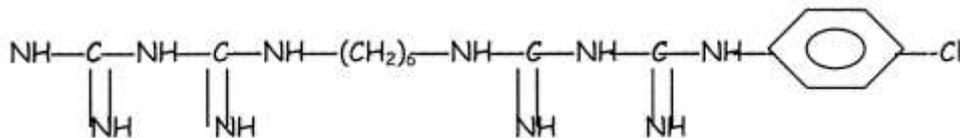
Les désinfectants sont les produits utilisés pour les matériels. Ils agissent globalement sur les structures cellulaires par des mécanismes physico-chimiques non spécifiques.

Principaux désinfectants utilisés dans l'industrie agro-alimentaire :

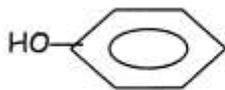
- **Ammoniums quaternaires** : Ce sont des composés bipolaires hydrosolubles.



- **Chlorhexidine** : Elle se comporte comme un composé cationique, il faut donc l'utiliser à pH neutre ou peu alcalin.



- **Composés phénoliques** : Ce sont des produits basés sur l'halogénéation d'un ou plusieurs groupements phénoliques. Plus ils sont halogènes, plus ils sont efficaces.



Fonction phénol de base : Plusieurs types de groupements peuvent être ajoutés.

- **Oxydants**:

* Composés halogènes : Seuls le chlore (ClO_2) et l'iode (I^-) sont utilisés. L'eau de Javel fait partie de cette famille.

* Oxydants proprement dits : Par exemple, Pozone.

- **Acides** : Ils sont utilisés dans les procédés de conservation des aliments

Efficacité de quelques désinfectants :

	Gram+	Gram-	Mycobactéries	Spores	Champignons	Virus
Ammoniums IVres	+++	+*	0	0	+	+
Chlorhexidine	+++	++	0	0	+	0
Phénoliques	v	v	v	v	v	v
Chlore	+++	+++	++	++	++	++
Iode	+++	+++	++	++	++	++

v : variable selon les composés

* : inactif sur les *Pseudomonas*