

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE D'ALGER

THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat Es Sciences

Filière : Sciences Vétérinaires

Option : Hygiène et Sécurité Alimentaires

THEME

Etude des effets d'extraits de plantes sur la formation de biofilms
au niveau des surfaces et équipements de la halle à marée
de la Wilaya de Boumerdes ainsi que sur les paramètres de qualité
des anchois méditerranéens (*Engraulis encrasicolus*)

Présentée par : **BENSID Abdelkader**

Directeur de thèse : **Pr/ BENDEDDOUCHE Badis**

Devant les membres du jury :

Présidente : Pr/ BOUKHORS K.T

Ecole Nationale supérieure vétérinaire d'Alger

Examineur : Pr/ HAMDI T.M

Ecole Nationale supérieure vétérinaire d'Alger

Examineur : Pr/ OUMOUNA M

Département de Biologie, Université de Médéa

Examineur : Dr/ ZOUAKH D.E

Ecole préparatoire en sciences de la nature
et de la vie-Alger

Année universitaire : 2013/2014

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et à remercier très chaleureusement le Professeur BENDEDDOUCHE Badis, mon directeur de thèse, pour son humanité, sa grande implication dans ce projet et son enthousiasme de chaque instant. Auprès de Monsieur Bendeddouche et grâce à son encadrement consciencieux et à sa rigueur scientifique, j'ai pu progresser et apprendre ce qu'est le métier de chercheur. Merci à lui pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils pertinents et ses encouragements tout au long de ces années d'études.

Je souhaiterais ensuite remercier sincèrement le Professeur BOUKHORS Karima Tamina, le Professeur HAMDI Taha Mossadak, le Professeur OUMOUNA Mustapha et le Docteur ZOUAKH Djamel-Eddine pour avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche et de discuter des résultats et des interprétations exposés.

Un grand merci également à HOUICHER Abderrahmane, pour son dynamisme, sa motivation au quotidien, ses encouragements, sa bonne humeur communicative et pour avoir initié une collaboration avec le laboratoire du département de technologie des industries des produits de la mer (Turquie), ce qui fut pour moi une expérience très riche.

Cette étude n'aurait pas été possible sans la collaboration mise en place avec l'équipe du laboratoire du département de technologie des industries des produits de la mer (Turquie). Je tiens donc à remercier très sincèrement le Professeur OZOGUL Fatih pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et fait bénéficier de ses compétences scientifiques. Je remercie également Yesim Ozogul, Yilmaz Uçar, Mustafa Durmus, Saadet Gokdogan et Esra Balıkçı pour leur aide et leurs conseils avisés.

Je tiens à remercier encore mes collègues et amis pour leur admirable soutien, leur enthousiasme et leurs encouragements : MOKRANI Djamel, BOUDJELLABA Sofiane, MERDJA Salah Eddine, BENBELKACEM Idir, HAMZA Khaled, KERDID Khalil et BOUSRI Belkacem.

Je souhaiterais d'une façon générale adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Enfin, à mes parents, mes beaux-parents et ma femme, qui me font l'honneur d'être tous présents. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, pour être toujours là quand j'ai besoin de vous. Sans votre soutien rien n'aurait été possible. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon amour. Ce travail vous est légitimement dédié, j'espère que vous en serez fiers.

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1. Composition chimique comparative de muscle de poissons gras, semi-gras et maigres.....	30
Tableau 2. Durée de conservation en jours et vitesse relative d'altération (VRA) de produits de la mer stockés à différentes températures.....	44
Tableau 3. Concentrations moyennes et écarts-types (log UFC/ml) en flore totale à 30°C aux différents points de prélèvement de surface.....	70
Tableau 4. Inhibition de la formation et de l'accumulation de biofilm sur les surfaces de polyéthylène à haute densité, sous différentes conditions de glaçage des anchois.....	87
Tableau 5. Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements de surfaces des coupons (PEHD) en contact avec l'anchois durant toute sa période de conservation dans les différentes conditions de glaçage.....	91
Tableau 6. Analyse nutritionnelle moyenne pour 100 g d'anchois cru (partie consommable).....	96
Tableau 7. Méthode de l'index de qualité pour les anchois crus.....	98
Tableau 8. Score d'évaluation sensorielle pour les anchois cuits.....	100
Tableau 9. Variations du pH et évolution de l'azote basique volatil total (mg/100g d'échantillon) sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois sous froid.....	107
Tableau 10. Evolution de l'indice de peroxyde (meq/kg de graisses) et l'acide thiobarbiturique (mg malondialdehyde/kg d'échantillon), sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois sous froid.....	110
Tableau 11. Evolution des acides gras libres (acide oléique %), sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois sous froid.....	114
Tableau 12. Evolution des bactéries aérobies mésophiles et des bactéries psychrotrophes, sous différentes conditions de glaçage, au cours de la conservation des anchois sous froid.....	115

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Représentation schématique de la formation du biofilm.....	08
Figure 2. Logigramme présentant les différentes étapes de l'étude expérimentale.....	65
Figure 3. Concentrations en flore totale (en log UFC/cm ²) aux différents points de prélèvement de surface.....	71
Figure 4. Vue générale en perspective du dispositif.....	75
Figure 5. Vue éclatée en perspective de l'élément composé du dispositif.....	75
Figure 6. Vue en perspective de l'élément fixateur du dispositif.....	75
Figure 7. Vue schématique en coupe partielle de l'élément composé du dispositif.....	76
Figure 8. Vue schématique en coupe partielle du dispositif.....	76
Figure 9. Figure 8 : Mode de fonctionnement du dispositif.....	79
Figure 10. Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin Ciocalteu.....	86
Figure 11. Volume des liquides recueillis à partir de glaces traités au cours de la période de fusion.....	94
Figure 12. Evaluation sensorielle des anchois crus conservés sous différentes conditions de glaçage.....	105
Figure 13. Evaluation sensorielle des anchois cuits conservés sous différentes conditions de glaçage.....	106
Figure 14. Effet de différentes conditions de glaçage sur la teneur en azote basique volatil total dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.....	109
Figure 15. Effet de différentes conditions de glaçage sur l'indice de peroxyde dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.....	111
Figure 16. Effet de différentes conditions de glaçage sur la teneur en acide thiobarbiturique dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.....	113
Figure 17. Effet de différentes conditions de glaçage sur la formation d'acides gras libres dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.....	114

LISTE DES ABREVIATIONS

ABVT : Azote basique volatil total
ADP : Adénosine diphosphate
AG : Acide gallique
AGL : Acides gras libres
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AMP : Adénosine monophosphate
ANP : Azote Non Protéique
ATB : Acide thiobarbiturique
ATP : Adénosine triphosphate
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
cm : centimètre
DHA : Docosahexaénoïque
DMA : Diméthylamine
EPA : Eicosapentaénoïque
EPS : Extra-Polymeric-Substances
g : gramme
h : heure
HCl : Acide chlorhydrique
Hx : Hypoxanthine
IMP : Inosine monophosphate
IP : Indice de peroxyde
kDa: Kilo-Dalton
L : Litre
m : mètre
MDA : malondialdéhyde
MEB : microscopie électronique à balayage
mEq : milliéquivalents
mg : milligramme
ml : millilitre
mm : millimètre
N : mol/L
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide hydride
NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OTMA : Oxyde de triméthylamine
SR-ATB : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TMA : Triméthylamine
UFC : Unités Formant Colonies
µm : micromètre

RESUME

L'objectif fondamental de ce travail de thèse est la prévention de la formation et de l'accumulation des microorganismes sur les surfaces en contact avec les produits de la mer, ainsi que l'amélioration de la durée de vie des anchois méditerranéens (*Engraulis encrasicolus*) par l'utilisation d'un système de conservation à partir de la glace contenant des extraits bruts de thym (0,04 % p/v), d'origan (0,03 % p/v) et de clous de girofle (0,02 % p/v).

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'évaluation de l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer à bord des navires de pêche et dans la halle à marée du port de Zemmouri (W. de Boumerdes). Les résultats obtenus ont permis de constater que les conditions d'utilisation des produits détergents et désinfectants (temps de contact et fréquence d'utilisation) n'étaient pas appropriées pour éliminer les microorganismes des surfaces contrôlées, en particulier, les biofilms.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de la glace contenant des extraits de plantes agissant sur la formation et l'accumulation du biofilm sur le polyéthylène haute densité (PEHD) au cours de la conservation des anchois sous froid. Les résultats ont montré qu'un effet réduit ($p < 0,05$) de la glace préparée avec ces extraits a été observé sur le développement et l'accumulation du biofilm préformé par rapport à la glace préparée avec de l'eau distillée, où une réduction de (0,4 à 1,7 log UFC/coupon) de cellules de biofilm (les bactéries aérobies mésophiles et les *Pseudomonas* spp.) a été obtenue durant toute la période de conservation.

Dans une troisième partie, l'effet de la glace contenant les extraits de plantes agissant sur les paramètres de qualité des anchois (*Engraulis encrasicolus*) a été évalué. Selon les analyses sensorielles, les anchois conservés dans la glace préparée avec les extraits de plantes ont une durée de vie de 12 jours, tandis que ceux qui sont conservés dans la glace préparée avec de l'eau distillée ont une durée de vie de 9 jours. Un effet conservateur marqué ($p < 0,05$) a été détecté chez les anchois conservés dans le système de glaçage utilisant des extraits de plantes, selon l'indice de peroxyde (IP) et les teneurs en acide thiobarbiturique (ATB), en azote basique volatil total (ABVT) et en acides gras libres (AGL). Ce travail a démontré que l'utilisation de la glace préparée avec des extraits de plantes pour la conservation des anchois étêtés et éviscérés peut être recommandée pour améliorer leur qualité et prolonger leur durée de vie.

Mots-clés : Conservation ; Anchois (*Engraulis encrasicolus*) ; Glace ; Extraits de plantes ; Biofilm

Abstract

The fundamental objective of this thesis is to prevent the formation and accumulation of microorganisms on the fish contact surfaces, as well as improving the shelf life of Mediterranean anchovy (*Engraulis encrasicolus*) by the use of a preservative system from ice containing crude extracts of thyme (0,04 % w/v) , oregano (0,03 % w/v) and clove (0,02 % w/v).

In this study, we focused initially on the evaluation of the hygiene of the fish contact surfaces aboard the fishing vessels and in the fish market of the port of Zemmouri (Town of Boumerdes). The results revealed that the conditions for use of detergents and disinfectants (contact time and frequency of use) were not appropriate to eliminate microorganisms of controlled surfaces, in particular biofilms.

In a second step, the effect of ice containing thyme (0,04% w/v), oregano (0,03% w/v) and clove (0,02% w/v) extracts on formation and accumulation of biofilm on high density polyethylene coupons during chilling storage of anchovy was investigated. A lower biofilm inhibition ($P < 0,05$) was observed in the presence of plant extracts in ice compared to biofilm control throughout the storage, when a (0,4 to 1,7 log CFU/coupon) biofilm-reduction in adherent cell number was obtained for both microorganism indicators (mesophilic aerobic bacteria and *Pseudomonas* spp.).

In a third part, the effect of ice containing plant extracts on the quality parameters of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) was assessed. According to sensory analyses, anchovy stored in ice prepared with each plant extracts had a shelf life of 12 days, while batch stored in traditional ice had a shelf life of 9 days. A marked antioxidant effect ($P < 0,05$) could be detected with fish kept under plant extract icing systems, according to peroxide (PV) and thiobarbituric acid (TBA) values. Moreover, the employment of such icing systems led to lower ($P < 0,05$) total volatile base-nitrogen (TVB-N) value and free fatty acid (FFA) formation.

This work demonstrates that the use of ice with plant extracts for the storage of gutted and beheaded anchovy can be recommended to improve the quality and extend the shelf life.

Keywords: Preservation ; Anchovy (*Engraulis encrasicolus*) ; Ice ; Plant extracts ; Biofilm.

المُلخَص

الهدف الأساسي من هذه الرسالة هو منع تكوين و تراكم الكائنات الحية الدقيقة على الأسطح التي هي في اتصال مباشر مع الأسماك البحرية ، فضلا عن تحسين مدة تخزين سمك الأنشوجة المتوسطية (*Engraulis encrasicolus*) عن طريق استخدام نظام تخزين مُستعملًا فيه الماء المُثلج ، يتضمن هذا الماء المُثلج مُستخلصات الزعيترة (0,04 % ث/ح) ، الزعتر (0,03 % ث/ح) والقرنفل (0,02 % ث/ح).

في هذه الدراسة ، ركزنا في البداية على تقييم نظافة الأسطح التي هي في اتصال مع الأسماك البحرية على متن سفن الصيد و سوق السمك المُتواجد في ميناء زموري (ولاية بومرداس) . كشفت النتائج أن شروط استخدام المنظفات و المطهرات (مدة اتصال هذه المواد مع الأسطح وتواتر الاستخدام) لم تكن مناسبة للقضاء على الكائنات الحية الدقيقة المُتواجدة على الأسطح ، و على وجه الخصوص ، الأغشية الحيوية (biofilm).

قمنا في الخطوة الثانية بدراسة تأثير الماء المُثلج المُحتوي على المُستخلصات النباتية المُختارة على تكوين و تراكم الأغشية الحيوية (biofilm) على متعدد الايثيلين عالي الكثافة (HDPE) أثناء تخزين سمك الأنشوجة تحت درجة حرارة منخفضة . أظهرت النتائج سوى تأثير ضئيل (ع > 0,05) لهذا الماء المُثلج المُحتوي على المُستخلصات على تنامي و تراكم الأغشية الحيوية (biofilm) مقارنة بالماء المُثلج المُعد بالماء المقطر، حيث انخفض (1,7- 0,4 log UFC/ coupon) من خلايا الأغشية الحيوية (Bactéries aérobies mésophiles et les *Pseudomonas* spp.) خلال فترة التخزين.

في الخطوة الثالثة من هذا العمل ، تم تقييم تأثير الماء المُثلج المُحتوي على المُستخلصات النباتية على معايير جودة سمك الأنشوجة المتوسطية (*Engraulis encrasicolus*) أثناء التخزين . وفقا للتحليل الحسية ، دام حفظ الأنشوجة في الماء المُثلج المُعد بالمُستخلصات النباتية مدة 12 يوما ، في حين أن تلك التي خُزنت في الماء المُثلج المُعد بالماء المقطر، مُدة حفظها لم تتجاوز 9 أيام . تم الكشف في هذا العمل عن تأثير المُستخلصات النباتية (ع > 0,05) في نظام حفظ الأنشوجة المتوسطية ، من خلال مؤشر البيروكسيد (IP : Indice de peroxide) و معيار حمض التيوباربيتوريك : (Acide thiobarbituric) (ATB) ومجموع النيتروجين الحيوية المتطايرة (ABVT : Azote basique volatil total) وكذا الاحماض الدهنية الحرة (AGL : Acides gras libres) . قد أثبت هذا العمل أن استخدام الماء المُثلج المُحتوي على المُستخلصات النباتية لحفظ الأنشوجة المتوسطية يمكن أن يُوصى به في تحسين جودتها و تمديد مدة حفظها.

الكلمات المفتاحية : الحفظ ؛ الأنشوجة (*Engraulis encrasicolus*) ؛ الماء المُثلج ؛ المُستخلصات النباتية ؛ الأغشية الحيوية .

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumés	
Introduction	1
 Etude bibliographique	
 Chapitre 1. Les biofilms	 04
1.1. Historique.....	04
1.2. Généralités.....	05
1.3. Composition et structure du biofilm.....	06
1.4. Mécanisme de formation des biofilms bactériens.....	07
1.4.1. Etapes de formation du biofilm.....	08
1.4.2. Quelques facteurs susceptibles de modifier l'adhésion bactérienne en laboratoire..	16
1.4.3. Régulation de la formation du biofilm.....	17
1.5. Protection mécanique et résistance aux stress extérieurs.....	18
1.6. Méthodes d'étude des biofilms.....	20
1.6.1. Standardisation des méthodes d'étude des biofilms.....	21
1.6.2. Méthodes d'obtention des biofilms.....	22
1.6.3. Méthodes de détection et de quantification des biofilms.....	23
1.7. Préventions et moyens de lutte contre les biofilms.....	25
1.7.1. Contrôle de la formation des biofilms	25
1.7.2. Elimination des biofilms déjà formés.....	26
 Chapitre 2. Evolution de la qualité du poisson	 30
2.1. Composition de la chair du poisson.....	30
2.1.1. Protéines et acides aminés libres.....	30
2.1.2. Lipides.....	31
2.1.3. Extraits azotés non protéiques.....	32

2.1.4. Glucides.....	32
2.1.5. Vitamines et sels minéraux.....	32
2.2. Les altérations post mortem du poisson influençant la qualité.....	33
2.2.1. Altérations organoleptiques.....	33
2.2.2. Altérations autolytiques.....	34
2.2.3. Changements microbiologiques.....	36
2.2.4. Changements au niveau des lipides.....	38
2.3. Facteurs influençant la qualité et la durée de conservation du poisson réfrigéré.....	43
2.3.1. Effet de la température de conservation.....	43
2.3.2. Influence de l'hygiène pendant la manutention.....	44
2.3.3. Effet de l'éviscération.....	45
2.3.4. Influence de l'espèce de poisson, de la manutention et des propriétés de la peau...	46
2.4. Evaluation de la qualité d'un poisson.....	46
2.4.1. Les méthodes sensorielles.....	46
2.4.2. Les méthodes physiques.....	47
2.4.3. Les méthodes microbiologiques.....	49
2.4.4. Les méthodes chimiques et biochimiques.....	49
Chapitre 3. La conservation du poisson.....	53
3.1. Les techniques de conservation du poisson.....	53
3.1.1. Les agents physiques.....	53
3.1.2. Les agents conservateurs.....	55
3.2. Activités anti-oxydante et antimicrobienne des composés phénoliques de plantes....	58
3.2.1. Effets antioxydants des composés phénoliques.....	58
3.2.2. Effets antimicrobiens des composés phénoliques.....	59
3.3. Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de plantes sélectionnées.....	61
3.4. L'extraction des composés phénoliques de plantes.....	61

Etude expérimentale

Problématique.....	64
Partie 1. Evaluation de l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer et proposition d'un dispositif de prélèvement par écouvillonnage.....	66
<u>1.1. Evaluation de l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer...</u>	66
1.1.1. Objectifs.....	66
1.1.2. Matériel et méthodes.....	67
1.1.2.1. Site d'étude.....	67
1.1.2.2. Sites et méthode de prélèvement.....	68
1.1.2.3. Préparation des échantillons et technique de dénombrement.....	69
1.1.2.4. Analyse statistique.....	70
1.1.3. Résultats et discussion.....	70
<u>1.2. Proposition d'un dispositif d'écouvillonnage des surfaces planes.....</u>	73
1.2.1. Objectifs.....	74
1.2.2. Présentation de l'invention et son mode de réalisation.....	75
1.2.3. Mode de fonctionnement.....	78
1.2.4. Discussion.....	80
Partie 2. Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation des biofilms sur les surfaces en contact avec les poissons et les paramètres de la qualité des anchois méditerranéens..... ..	81
<u>2.1. Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation des biofilms sur les surfaces en contact avec les poissons.....</u>	81
2.1.1. Objectifs.....	81
2.1.2. Matériel et méthodes.....	82
2.1.2.1. Matériel végétal et préparation des extraits bruts.....	82
2.1.2.2. Préparation de la glace traitée.....	83
2.1.2.3. Préparation des coupons.....	83
2.1.2.4. Matériel animal et conditions d'entreposage.....	83
2.1.2.5. Analyses microbiologiques.....	84
2.1.2.6. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	85

2.1.2.7. Stabilité des glaces traitées.....	86
2.1.2.8. Traitement statistique des données.....	86
2.1.3. Résultats et discussion	87
2.1.3.1. Dénombrement des bactéries aérobies mésophiles et <i>Pseudomonas</i> spp.....	87
2.1.3.2. Isolement et identification des <i>Pseudomonas</i> spp. et <i>Shewanella putrefaciens</i>	90
2.1.3.3. Détermination du rendement d'extraction et teneur en composés phénoliques totaux.....	92
2.1.3.4. Effet des extraits de plantes sur la stabilité de la glace.....	93
<u>2.2. Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur les paramètres de la qualité des anchois méditerranéens conservés sous glace</u>	95
2.2.1. Objectifs.....	95
2.2.2. Matériel et méthodes.....	96
2.2.2.1. Présentation du matériel animal.....	96
2.2.2.2. Conditions d'entreposage.....	97
2.2.2.3. Analyse sensorielle des anchois.....	97
2.2.2.4. Analyses physico-chimiques.....	100
2.2.2.4.1. pH.....	100
2.2.2.4.2. Dosage de l'Azote basique volatil total (ABVT).....	100
2.2.2.4.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-ATB).....	101
2.2.2.4.4. Indice de peroxyde (IP).....	102
2.2.2.4.5. Analyse des acides gras libres (AGL).....	103
2.2.2.5. Analyses microbiologiques.....	103
2.2.2.6. Traitement statistique des données.....	104
2.2.3. Résultats et discussion	104
2.2.3.1. L'analyse sensorielle.....	104
2.2.3.2. Analyses physico-chimiques	107
2.2.3.2.1. Variations du pH et évaluation de la teneur en ABVT.....	107
2.2.3.2.2. Oxydation des lipides.....	110
2.2.3.2.3. Hydrolyse des lipides.....	113
2.2.3.3. Evaluation microbiologique.....	115
Conclusion générale	117
Références bibliographiques	120

Introduction

Il est nécessaire pour garder le poisson frais d'assurer une réfrigération précoce, continue et efficace durant son transport et sa conservation (Himelbloom et al., 1994). Cependant, la réfrigération seule ne suffit pas à inhiber l'altération. Divers chercheurs ont montré que l'élimination des sources de contamination augmente systématiquement la durée de conservation, telle l'éviscération qui réduit la charge bactérienne du poisson et élimine également les enzymes digestives très actives, mais elle expose la paroi abdominale à la contamination par les résidus des viscères écrasés, le mucus et autres souillures (Cakli, 2007). Par ailleurs, les meurtrissures qui écrasent la chair, les blessures qui privent le muscle de sa protection naturelle (la peau), ainsi que les traitements non hygiéniques des poissons, du matériel et des équipements de transport et de conservation, favorisent l'envahissement de la chair par les microorganismes et réduisent la durée de vie des poissons (Huss, 1999 ; Vogel et al., 2001). Il a été démontré que les poissons traités suivant une hygiène rigoureuse et réfrigérés énergiquement à bord de chalutiers demeuraient en bon état pendant 12 jours au lieu de 7 (Shewan, 1951).

La durée de vie des produits de la pêche est sévèrement diminuée si les mesures de prévention pour empêcher la contamination ne sont pas satisfaisantes, surtout si les organismes responsables de l'altération sont prédominants dans le biofilm attaché aux surfaces en contact avec le poisson (Guðbjörnsdóttir et al., 2004). La formation d'un biofilm microbien sur les surfaces augmente le risque d'une contamination croisée des produits de la mer (Kusumaningrum et al., 2003). Par conséquent, des efforts devraient être faits pour réduire le niveau de contamination initial et empêcher la détérioration microbienne rapide des poissons frais (Samelis, 2006). Le nombre initial de bactéries d'altération dans les produits de la pêche est l'un des facteurs les plus importants qui affectent leur durée de vie de conservation.

La durée de vie des produits de la pêche conservés sous glace est relativement courte. Les espèces marines sont très sensibles à la détérioration causée par des réactions chimiques et des modifications post-mortem du pH qui potentialisent la croissance microbienne (Ólafsdóttir et al., 1997). La rancidité due à l'hydrolyse et à l'oxydation dans la chair des poissons s'installe rapidement et limite la durée de conservation du poisson pendant le stockage. La présence de lipides hautement insaturés dans la chair des poissons et sa haute teneur en molécules pro-oxydantes peuvent conduire au rancissement oxydatif (Benzie, 1996). L'hydrolyse enzymatique de graisses, induite par les enzymes dégradant les lipides (lipases et des phospholipases), produit des acides gras libres qui subissent une oxydation supplémentaire pour produire des composés de

faible poids moléculaire, tels que les aldéhydes et les cétones, qui sont responsables de saveurs et d'odeurs anormales et désagréables des poissons (López-Amaya, et Marangoni, 2000a) .

La recherche de nouvelles substances pour la prévention et l'éradication du biofilm sur les surfaces en contact avec les produits de la mer, ainsi pour prolonger la durée de vie de ces produits est donc un domaine d'intérêt très important. L'usage d'agents antimicrobiens et antioxydants naturels a augmenté en raison des changements d'attitude des consommateurs envers l'utilisation de produits chimiques synthétiques qui possèdent des effets néfastes sur l'organisme vivant et l'environnement (Davidson, 1997). Les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sont utilisés normalement comme additifs antioxydants et antimicrobiens pour la conservation des aliments et pour contrôler la croissance de la flore pathogène et d'altération. Ils contiennent de fortes concentrations en composés phénoliques, y compris le carvacrol, le thymol et l'eugénol (Tajkarimi et al., 2010). L'activité antibactérienne est probablement due aux effets combinés de l'adsorption des composés phénoliques au niveau des membranes bactériennes, de la rupture de ces membranes et de la fuite subséquente de contenu cellulaire (Negi, 2012). Des études antérieures ont démontré les propriétés anti-biofilms de plusieurs composés d'origine végétale. L'eugénol, le carvacrol et le thymol ont été connus pour avoir des effets anti-biofilms contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* O157 : H7 (Pérez-Conesa et al., 2006 ; El abed et al., 2011). Par ailleurs, diverses méthodes sont utilisées pour retarder le rancissement indésirable et prolonger la durée de vie du poisson, telles que le stockage à basse température, l'utilisation d'un emballage approprié, l'imbibition d'antioxydants synthétiques ou naturels dans la chair et l'incorporation de divers produits chimiques dans la glace de conservation.

Des études récentes ont rapporté plusieurs effets inhibiteurs significatifs de la glace préparée avec des agents antimicrobiens et antioxydants sur les mécanismes microbiologiques et biochimiques impliqués dans l'altération du poisson, par rapport au glaçage traditionnel. Les méthodes de conservation des produits de la mer utilisant des coulis de glace ozonée (Campos et al., 2005), de la glace d'eau oxydante électrolysée (Phuvasate & Su , 2010) et de la glace contenant des extraits de plantes (Quitral et al., 2009 ; Oral et al., 2008 ; Özyurt et al ., 2011) ont été étudiées . Özyurt et al. (2011) ont étudié l'effet de conservation de la glace contenant de l'extrait de romarin pour prolonger la durée de vie de sardines (*Sardinella aurita*). Les analyses sensorielles, microbiologiques et chimiques ont indiqué que la conservation de la sardine dans la glace préparée avec de l'extrait de romarin a entraîné une augmentation significative de la durée de vie et une faible teneur en amines biogènes, en particulier l'histamine et la putrescine. Une

autre étude menée par Quitral et al. (2009) a constaté que la glace préparée avec des extraits aqueux du romarin (*Rosmarinus officinalis*) et de l'origan (*Origanum vulgare*) a amélioré les modifications chimiques de chinchard du Chili (*Trachurus murphyi*) par rapport à la glace traditionnelle. Oral et al. (2008) ont étudié les changements dans la durée de vie des poissons (*Capoeta Capoeta Capoeta*) conservés dans la glace préparée avec de l'hydrolat du thym sauvage. Les résultats des analyses sensorielles, microbiologiques et chimiques ont montré que la durée de conservation de cette espèce a été prolongée de 15-20 jours par rapport au lot témoin. A l'heure actuelle, l'effet des extraits éthanoliques bruts, incorporés dans la glace, sur la formation et l'accumulation des biofilms sur les surfaces en contact avec les produits de la mer, ainsi que sur les paramètres de qualité des poissons n'est pas clairement identifié. Une analyse microbiologique, sensorielle et biochimique plus précise est par conséquent souhaitée, c'est l'enjeu scientifique principal de cette thèse.

Pour mener à bien ce travail, notre manuscrit est organisé en cinq parties :

Les trois premières parties constituent une synthèse bibliographique. Le premier chapitre fait un état des lieux ciblé des connaissances théoriques sur les biofilms, et plus particulièrement sa composition, sa structure, son mécanisme de formation et sa résistance aux stress extérieurs. Le deuxième chapitre présente l'évolution de la qualité du poisson y compris la composition de la chair du poisson, les altérations post mortem du poisson influençant la qualité, les facteurs influençant la durée de conservation du poisson réfrigéré et enfin les techniques d'évaluation de la qualité d'un poisson. Le troisième chapitre se focalise sur les techniques utilisées pour la conservation des poissons, l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des composés phénoliques de plantes, et enfin les techniques d'extraction des composés phénoliques.

Les deux dernières parties rendent compte de l'étude expérimentale. Chaque partie comporte deux chapitres. Le premier chapitre de la première partie a pour objectif d'évaluer l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer à bord des navires de pêche et dans la halle à marée du port de Zemmouri (W. de Boumerdes). En deuxième chapitre, un dispositif d'écouvillonnage des surfaces planes a été proposé pour standardiser les techniques de prélèvements de surfaces. La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'effet de la glace préparée avec des extraits éthanoliques du thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation du biofilm sur le polyéthylène haute densité au cours de la conservation des anchois méditerranéens sous froid, ainsi que sur les paramètres de la qualité de cette espèce de poisson.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Les biofilms

1.1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, qui a été le premier à examiner des biofilms bactériens sur la surface de ses propres dents avec cet appareil vers 1683 (Donlan, 2002).

Les informations concernant l'adhésion bactérienne conduisant à la formation de biofilms sont longtemps restées anecdotiques, parce que les méthodes d'observation n'étaient pas suffisamment performantes. En 1936, Claude E. Zobell démontra que les surfaces solides sont favorables au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. Il montra vers 1943 que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation d'agrégats bactériens fixés sur les surfaces. Selon lui, le processus de colonisation bactérienne d'une surface suit deux étapes: la première étant l'adhésion réversible et la seconde, l'adhésion irréversible des microorganismes (Costerton, 2004).

Un nouvel engouement dans l'étude des biofilms eut ensuite lieu à partir des années 70, avec notamment les travaux de Characklis puis de Costerton. Les techniques utilisées à cette époque étaient les cultures microbiologiques et la microscopie électronique à balayage. Pour visualiser la matrice d'exopolymères englobant des agrégats cellulaires, ils ont utilisé un colorant spécifique des polysaccharides, le rouge Ruthenium, couplé à un fixateur et le tétr oxyde d'osmium.

En 1973, Characklis démontre que les matrices d'exopolymères des biofilms leur confèrent une résistance remarquable contre l'action des désinfectants à base de chlore (Characklis, 1973). En 1978, Costerton et son équipe proposèrent pour la première fois le terme de « biofilms » et les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont suggéré que le biofilm serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes (Costerton et al., 1978).

Avant les années 1980, les informations concernant la mise en évidence des biofilms sur les surfaces inertes étaient relativement parcellaires. Aujourd'hui, le rôle des biofilms dans la contamination des aliments par les équipements de transformation est avéré. Les dangers microbiologiques dus à la présence des microorganismes dans l'environnement alimentaire incluent : l'accumulation du biofilm sur les surfaces des aliments, la colonisation microbienne

dans les réservoirs de stockage des aliments (lait, jus, etc.), l'encrassement des échangeurs de chaleur et enfin l'adhésion de microorganismes et leurs spores sur les emballages et les surfaces de matériau (Kirtley et McGuire, 1989).

1.2. Généralités

Il est difficile de donner au terme "biofilm" une définition précise ; néanmoins, on peut en donner les principales caractéristiques à la base de toute définition : le biofilm est une association de microorganismes sessiles agrégés en microcolonies, adhérente sur une surface inerte ou biologique, et caractérisée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice de polymères exo-cellulaires ou EPS (extrapolymeric substances). En effet, des agrégats de microorganismes enrobés dans une matrice de polymères exo-cellulaires peuvent se trouver en suspension et sont désignés non pas sous le terme biofilm mais sont définis comme des « flocs ». Les biofilms peuvent se former sur des surfaces d'une grande diversité: tissus vivants, appareillage médical ou agro-industriel, canalisations, surfaces humides ou immergées, etc. (Delille, 2007).

Un biofilm est constitué d'une ou de plusieurs espèces de micro-organismes (bactéries, algues, champignons, protozoaires, etc.) : on parle respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes (Tolker-Nielsen et Molin, 2000). La plupart des biofilms rencontrés dans la nature sont hétérogènes. Les biofilms composés uniquement de bactéries sont surtout des systèmes d'études en laboratoire de microbiologie.

Dans les conditions naturelles, les bactéries se développent sous deux formes : une forme libre ou planctonique, c'est à dire en suspension dans leur environnement aqueux, et une forme sessile ou attachée en biofilm qui est le mode de vie majoritaire des bactéries (Clutterbuck et al., 2007). En effet, en présence d'une surface solide, les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques restées en suspension ; parmi lesquelles la disparition de leurs flagelles (Costerton et al., 1995), un changement au niveau de leur génome, de la structure de leur enveloppe, leur taille et leur forme, la mise en place d'un système de communication chimique ("quorum sensing") (Parsek et Greenberg, 2000), la production d'exopolymères et une augmentation significative de leur résistance aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...) et aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) (Campanac et al., 2002).

1.3. Composition et structure du biofilm

Trois éléments sont le plus souvent présents au sein d'un biofilm : l'eau, les colonies et la matrice de polymères exo-cellulaires.

L'eau constitue une partie importante du biofilm et assure l'hydratation de celui-ci et le maintien de sa porosité (Lewandowski, 2000).

La colonie, qui est l'unité de base du biofilm, correspond à plusieurs couches stratifiées de microorganismes. Il existe une certaine confusion entre les termes de «micro-colonies» et «macro-colonies». Les micro-colonies sont de petits agrégats microbiens formés dans les premières étapes de la formation des biofilms ; tandis que la macrocolonie est une structure beaucoup plus large que l'on retrouve au sein d'un biofilm mature. La masse cellulaire au sein du biofilm ne peut représenter que 2 à 15 % de la composition totale du biofilm, le reste étant occupé par les exo-polymères, les nutriments et l'eau (Sutherland, 2001, Branda et al., 2005).

Les exo-polymères, dans lesquels les bactéries sont enchâssées, sont composés de polymères, majoritairement des exo-polysaccharides (entre 40 et 95% de leur poids sec), mais aussi d'acides nucléiques (1 à 10%), de phospholipides, de protéines (1 à 60%), de glycoprotéines, de lipides (1 à 40%), de substances humiques, d'enzymes, etc. Ils jouent un rôle primordial dans le processus de formation du biofilm, en assurant l'adhésion irréversible des bactéries sur le support solide et de maintenir les micro-colonies cohérentes entre elles, ce qui facilite les interactions et les communications cellule-cellule (Flemming et Wingender, 2010).

Les exo-polysaccharides sont produits par les bactéries ; leur forme, leur quantité, leurs compositions chimiques et leurs propriétés sont déterminées par différents facteurs tels que le type de bactéries, l'âge du biofilm, la concentration et la biodisponibilité des nutriments, la température et les conditions hydrodynamiques (Flemming et al., 2000 ; Ivleva et al., 2010). Les polysaccharides retrouvés le plus souvent dans les biofilms sont la cellulose, l'acide colanique et le poly-N-acetyl-glucosamine (Izano et al., 2008).

Les acides désoxyribonucléiques (ADN) représentent un composant essentiel des EPS. Cependant, différentes études menées sur la matrice des biofilms montrent que l'ADN libérée lors de la mort programmée de certains microorganismes du biofilm aurait un rôle structural dans la stabilité des biofilms (Bury-Moné, 2007). L'ADN permet l'échange d'informations génétiques entre les cellules qui jouent un rôle dans l'adhésion et l'agrégation des micro-colonies, ainsi que le développement du biofilm (Flemming et Wingender, 2010).

Les lipides présentent des caractéristiques hydrophobes, et interviennent dans l'adhésion et la solvation des substances hydrophobes afin de les rendre bio-disponibles (Simões et al., 2010).

Les protéines assurent en partie la communication entre les cellules au sein du biofilm. Les *curlis*, structures protéiques adhésives de surfaces, permettent par exemple l'agrégation de certaines espèces bactériennes (*E. Coli*) (May et Okabe, 2008).

Les enzymes exo-polymériques participent également à la disponibilité en nutriments nécessaires pour le développement du biofilm, en dégradant des macromolécules en molécules assimilables par les bactéries (Flemming et al., 2007).

L'observation microscopique révèle que les biofilms possèdent une structure très aboutie. Les architectures les plus couramment décrites dans la littérature sont des amas formant de simples tours ou des champignons traversés d'une multitude de pores et de canaux permettant des échanges d'information, des flux d'eau, mais aussi des transports de nutriments et de métabolites indésirables ou toxiques (Eberl et al., 2000).

D'un point de vue morphologique, le biofilm est le plus souvent hétérogène et possède néanmoins certaines caractéristiques structurelles communes, il est constitué d'une fine monocouche de microorganismes à sa base, fixés à la surface du support, surmontée de plusieurs couches plus ou moins épaisses de microorganismes enfermés dans une matrice et reliés par des canaux aqueux (Tolker-Nielsen et Molin, 2000).

L'organisation spatiale stratifiée (en couches) des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments et d'ions en son sein. Les nutriments au contact de biofilms diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont faibles. Ces différents degrés de diffusion permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des micro-organismes (Courfort et al., 2007). Les biofilms récemment formés sont le plus souvent monocouches, à l'inverse des biofilms plus anciens qui sont stratifiés (Bury-Moné, 2007).

En outre, l'activité bactérienne au sein du biofilm n'est pas homogène : la couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules à croissance rapide et soumise à une plus grande concentration d'oxygène. Ainsi, les cellules au niveau des couches basales sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente (Costerton, 1999 ; Lewandowski, 2000 ; Donlan, 2002).

1.4. Mécanisme de formation des biofilms bactériens

Le mécanisme de formation des biofilms a été largement décrit dans la littérature par plusieurs chercheurs. Cependant, c'est un schéma qui ne rend pas compte de la spécificité de toutes les

espèces bactériennes. En effet, certaines espèces peuvent adhérer à une surface sans conditionnement préalable ; par contre il existe également d'autres espèces, (le genre *Bacillus* par exemple), qui ne produisent pas de matrice extracellulaire en biofilms (Bridier et al., 2011).

La formation du biofilm peut être décrite par une série d'étapes influencées par différents facteurs (mode d'écoulement, nature de la surface, type et disponibilité des nutriments, pH, température, présence d'agents bactéricides, conditions d'aération, etc.). Elle fait donc intervenir différents processus physicochimiques tels que la diffusion et l'adhésion, ainsi que des processus biologiques (production d'exo-polymères, croissance de microorganismes, formation d'agrégats, etc.) (Andersson, 2009).

1.4.1. Etapes de formation du biofilm

La formation des biofilms se schématise en six étapes séquentielles qui sont détaillées dans cette section (Figure 1).

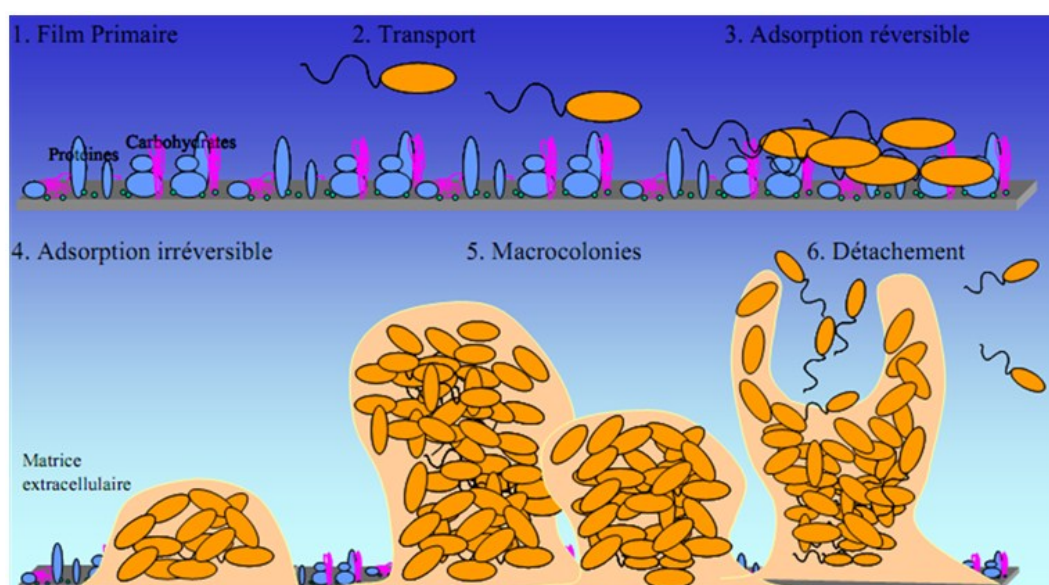


Figure 1 : Représentation schématique de la formation du biofilm.
(d'après Characklis, 1990)

1.4.1.1. Conditionnement de la surface par le milieu

La première étape de formation du biofilm est l'établissement d'un film primaire conditionnant la surface et facilitant l'attachement des bactéries. Ce phénomène est rapide et n'excède pas quelques heures. Kirtley et McGuire (1989) ont suggéré que les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu doivent être formées sur une surface avant que l'adhésion

microbienne ne puisse se produire. Cette accumulation de molécules à l'interface liquide/solide apporte une plus grande concentration en nutriments sur la surface par rapport au milieu liquide ; donc, les nutriments adsorbés sur la surface sont plus accessibles pour les bactéries. L'adsorption de ces molécules influence l'attachement des bactéries à une surface par la modification des propriétés physico-chimiques de la surface (énergie libre de surface, hydrophobicité, charges électrostatiques, etc.) (Schneider et al., 1997). Ce film organique est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries de la surface soit au contraire de créer un microenvironnement favorable à l'adhésion des bactéries. (Wahl, 1989).

Toutefois, il a été démontré que l'adhésion de quelques espèces bactériennes telles que les cellules végétatives de *Streptococcus thermophilus* et les spores de *Bacillus thermophilus* sur l'acier inoxydable se font en l'absence de film de conditionnement (Flint et Brooks, 2001).

L'importance du conditionnement de surface dans l'adhésion bactérienne est encore à ce jour discuté. Il a été montré que l'adsorption de protéines sur une surface permet d'altérer ses propriétés physico-chimiques et par la même d'influencer l'attachement des bactéries du biofilm en favorisant la formation de biofilms (Jeong et Frank, 1994). Cependant, Fletcher (1976) a montré que la présence d'albumine, de gélatine ou de fibrinogène inhibe l'adhésion de certaines espèces bactériennes marines comme les *Pseudomonas*. Plus récemment, il a été démontré par Verran et Whitehead (2006) que des bactéries restent attachées en plus grand nombre à une surface en présence de matière protéique, comme de l'albumine sur une surface inerte lors d'un cycle de nettoyage.

La composition du film primaire ou film conditionnant dépendrait à la fois de la surface et du milieu environnant (salinité, pH, température, etc.). En milieu marin par exemple, le film primaire ou film conditionnant est composé de protéines ou de fragments protéiques (Baier, 1972) ainsi que de lipides, polysaccharides, substances humiques (Taylor et al., 1997), et également des sels minéraux (Compère et al., 2001).

1.4.1.2. Transport et déplacement

La deuxième étape permettant l'établissement d'un biofilm correspond au transport ou au déplacement des microorganismes à proximité de la surface. Cette étape dépend fortement de la nature du milieu dans lequel les bactéries évoluent (force ionique, viscosité) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, sédimentation, etc.). Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en condition statique par exemple), les cellules microbiennes

sont transportées de la phase liquide vers le support conditionné par deux types de mécanismes (Characklis et Cooksey, 1983 ; Characklis et al., 1990a) :

- Le premier est un transport passif et aléatoire, par un mouvement brownien (Brown 1866) permettant aux bactéries d'être projetées sur le support (Banks et Bryers, 1992), ou par des mouvements de convection du milieu amenant physiquement les bactéries vers une surface.
- Le second est un transport actif, par le déplacement des bactéries grâce à des appendices bactériens tels que les pili et les flagelles vers des substances nutritives (chimiotactisme), leur permettant de sonder et donc de choisir la surface (Davies, 2000).

Davies (2000) a montré que les flagelles, les pili de type I et IV et les curli peuvent faciliter l'approche des bactéries des surfaces et jouent un rôle non négligeable dans l'adhésion initiale. Par exemple, les *Escherichia coli* et les *Salmonelles* possèdent des flagelles. Ces derniers peuvent avoir un diamètre compris entre 0,01 et 0,02 μm et une longueur de 10 μm , ils permettent l'attachement des bactéries sans qu'ils n'entrent en contact direct avec le support. Il est possible que le flagelle lui-même puisse former une liaison avec la surface du support (Goller et Romeo, 2008). Cependant, certaines bactéries formant des biofilms ne possèdent pas de flagelle comme *Staphylococcus aureus* et *Salmonella epidermis* (O'Toole et Kolter, 1998). L'absence de flagelle est compensée par l'action adhésive des curli qui permettent l'attachement de la bactérie au support (Beloïn et al., 2008).

De plus, les bactéries planctoniques libèrent des molécules signal et des protons dans leur milieu environnant lors de leur déplacement. Les molécules signal et les protons diffusent de façon radiale depuis la bactérie si aucun support n'est proche, donc la concentration en molécules signal sera plus importante sur le côté de la cellule bactérienne qui se trouve à proximité d'un support. Les bactéries établissent alors un contact avec le support par ces mécanismes de signalisation et expriment par la suite des adhésines à leur surface (Thar et Köhl, 2005). Une fois que les bactéries se sont fixées à la surface, l'expression des gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme, etc.) est diminuée, démontrant ainsi que le rôle essentiel de ces appendices se limite aux premières étapes de l'adhésion (Prigent-Combaret et Lejeune, 1999).

1.4.1.3 . Adhésion réversible

La troisième étape de la formation d'un biofilm est l'adhésion réversible et non-spécifique des bactéries à une surface.

Selon Characklis et Cooksey (1983), les bactéries sont attirées par les surfaces mais restent mobiles grâce au mouvement brownien (non orienté) résultant de trois forces entre les bactéries et la surface : des liaisons électrostatiques, de l'équilibre entre les énergies répulsives et les énergies attractives de Van Der Waals et des forces de tension interfaciales. Ces interactions entre la surface et les bactéries sont faibles et les bactéries peuvent se détacher de la surface et retrouver leur état planctonique sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques ; l'adhésion est donc réversible.

Dans la littérature, il est établi que la rugosité de la surface du matériau et de ses propriétés physico-chimiques peuvent influencer sur le taux d'attachement des bactéries (Coquet et al., 2002). Plus une surface est rugueuse, plus sa colonisation par des micro-colonies est importante (Characklis et al., 1990 b). Les supports possédant une forte rugosité de surface engendrent donc un meilleur attachement qu'un support lisse car les forces répulsives sont moindres, les forces de cisaillement sont diminuées et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités formant des recoins propices aux proliférations bactériennes où ils sont moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques (Donlan, 2002). Kerr et al. (1999) ont observé une augmentation de l'adhésion des bactéries sur le verre et l'acrylique immergés dans l'eau de mer naturelle lorsque la rugosité augmente de 0,25 à 30 μm . En outre, Scheuerman et al. (1998) ont conclu que la présence d'anfractuosités augmentait la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* adhérents sur la silicone. Néanmoins, Boulangé-Peterman et al. (1997) ont montré que l'augmentation de la rugosité d'une surface d'acier inoxydable AISI 304 entre 0,01 et 1 μm n'avait pas d'effet sur l'adhésion de *Staphylococcus thermophilus*.

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence non négligeable sur l'attachement des bactéries aux supports. Les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon, le polyéthylène, le polystyrène ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou le métal (Bendinger et al., 1993). Dans une étude in situ, il a été montré que *Legionella pneumophila* colonisait plus vite et en plus grand nombre le polychlorure de vinyle (PVC) que le cuivre et le laiton. De façon générale, il est admis que les microorganismes hydrophobes adhèrent fortement

sur des surfaces hydrophobes alors que les microorganismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des surfaces hydrophiles (Briandet et al., 2001).

Selon l'approche thermodynamique, les énergies du support, des bactéries, du film primaire et du milieu sont prises en considération (Taylor et al., 1997). L'hydrophobicité de la surface de la bactérie, la présence de flagelles et de fimbriae et la production d'exopolysaccharides influencent le taux d'attachement des bactéries sur une surface. Les bactéries planctoniques ont une paroi bactérienne composée d'une bicouche lipidique hydrophobe. Elles sont protégées par un certain nombre de structures qu'elles produisent et qui restent accrochées à leur surface telles que les protéines et les appendices bactériens de type fimbriae, flagelles ou pili (Beveridge, 2006). Ces structures peuvent posséder des domaines hydrophobes qui participent à l'accrochage. D'ailleurs il a été démontré que les appendices bactériens augmentent fortement l'hydrophobicité de la cellule bactérienne et le taux d'attachement au support (Di Martino et al., 2003). Les structures comme les lipopolysaccharides ou les exopolysaccharides sont plus importantes dans le mécanisme d'attachement à des surfaces hydrophiles (Vasseur et al., 2005). Rönner et al. (1990) ont montré que les spores de *Bacillus cereus*, considérées comme «hydrophobes» peuvent adhérer deux fois et demi plus que des spores de *Bacillus licheniformis* moins «hydrophobes» sur une surface de verre elle-même «hydrophobe».

L'attachement primaire du biofilm est sous l'influence de nombreux facteurs : pH, pression osmotique du milieu, température, etc. (Beloin et al., 2008).

Le pH du milieu environnant peut avoir des répercussions directes sur l'adhésion bactérienne en altérant, entre autres, les caractéristiques électriques. Une augmentation de l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* au verre a été constatée en milieu acide (Fletcher, 1988). Selon Fletcher (1988), l'abaissement du pH diminuerait les répulsions électrostatiques existant entre les bactéries et la surface du matériau, en réduisant la dissociation des groupements anioniques.

La concentration ionique de la solution influence fortement la répulsion électrostatique, plus la concentration ionique est importante, plus la force de répulsion électrostatique diminue et plus la distance entre les cellules et le support est réduite (Gauthier et al., 1989). Outre la concentration, la nature des ions présents dans le milieu environnant peut modifier le taux d'attachement des bactéries. En effet, il a été démontré que la nature des électrolytes présents dans le milieu de culture influençait fortement l'adhésion de *Pseudomonas fluorescens* et *Enterobacter cloacae* aux surfaces hydrophobes et hydrophiles (Mc Eldowney et Fletcher, 1986).

L'attachement primaire à une surface est suivi par un attachement secondaire spécifique et irréversible à la surface.

1.4.1.4. Adhésion irréversible

L'adhésion irréversible, quant à elle, correspond à une fixation de façon permanente des micro-organismes sur une surface, en général à l'aide des substances polymériques extracellulaires (EPS), et un traitement chimique ou mécanique plus sévère qu'un simple rinçage à l'eau est nécessaire pour les détacher (Klein, 2011).

Les structures d'adhésion varient selon les types de bactéries concernées. Pour les bactéries à Gram-positif, il s'agit de l'acide mycolique, des acides teichoïques, de la capsule et des substances exopolymériques. Pour les bactéries à Gram-négatif, ce sont les pili, les curli, les capsules et les substances exopolymériques. Ces molécules actives d'adhésion permettent d'établir des liaisons cellule-cellule et des liaisons cellule-surface (Lemon et al., 2008).

Les pili ou fimbriae de type I, interviennent dans l'adhésion et la colonisation de surfaces inertes et de tissus vivants, rendant les cellules bactériennes plus adhérentes à d'autres cellules et d'autres particules inorganiques (Harbron et Kent, 1988). Ce sont de fins appendices filamenteux, d'environ 1 µm de long présents à la surface des nombreuses bactéries Gram négatif (de 10 à 1000 fimbriae par cellule) comme par exemple chez les bactéries : *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, etc. (Goller et Romeo, 2008).

Les curli sont des fibres extracellulaires qui ont un rôle dans l'adhésion et la colonisation d'une surface et la formation de biofilms (Vidal et al., 1998). Les curli sont des protéines d'environ 15 kDa), ils peuvent se fixer à des protéines de la matrice extracellulaire. La température, l'osmolarité, le pH et les concentrations en oxygène influencent leur synthèse (Beloin et al., 2008). L'aptitude d'*Escherichia coli* à former des biofilms dépend de leur capacité à exprimer des curli à leur surface (Goller et Romeo, 2008).

Les pili de conjugaison sont d'environ 1 µm de long (1 à 10 pili de conjugaison par cellule). Ils interviennent lors du contact initial avec la surface où ils mettent un terme à la mobilité et la déstabilisation des bactéries et permettent des interactions stables. Dans ce cas, l'attachement devient irréversible, il peut être renforcé grâce à la sécrétion des substances polymériques extracellulaires (EPS) permettant ainsi de consolider la fixation des bactéries à la surface (O'Toole et Kolter, 1998). Ils joueraient aussi un rôle de stabilisation de la structure du biofilm lors de sa phase de maturation. (Ghigo et al., 2001 ; Beloin et al., 2008).

La plupart des bactéries produisent des substances exopolymériques (EPS) qui participent à la formation des agrégats microbiens en biofilms. Ces substances polymériques extracellulaires jouent un rôle très important dans la fixation des bactéries aux surfaces, parmi leurs fonctions (Geesey GG, 1982):

- l'agrégation des cellules bactériennes ;
- la formation d'une barrière protectrice qui offre une résistance aux stress environnants ;
- la rétention d'eau ;
- l'accumulation d'éléments nutritifs de l'environnement par la sorption des composés organiques exogènes ;
- la digestion des macromolécules exogènes par des enzymes pour l'acquisition d'éléments nutritifs ;
- la stabilisation de la structure du biofilm.

Les substances exopolymériques (EPS) sont responsables de la liaison entre les cellules et la surface (adhérence) et avec d'autres particules environnantes (cohésion). Grâce aux EPS, les cellules bactériennes sont étroitement liées entre elles permettant la communication et la coopération (Sutherland, 2001).

D'un point de vue biochimique et physico-chimique, la composition de la matrice change selon la nature des microorganismes constituant le biofilm et les conditions environnementales (pH, salinité, température). De plus, les conditions de culture de bactéries en laboratoire (en milieu nutritif riche), sont très différentes de celles d'un biofilm développé dans des conditions naturelles (Sutherland, 1999).

1.4.1.5 . Maturation

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente au support, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation formant des macro-colonies. La matrice d'EPS, qui est synthétisée dans les premières étapes d'adhésion, ainsi que pendant la maturation du biofilm, va occuper entre 75 - 95 % du volume total du biofilm mature (Ghigo et al., 2001).

La maturation du biofilm est divisée en deux périodes (Clutterbuck et al., 2007). La première période est marquée par des régulations de gènes responsables de la différenciation des cellules au sein du biofilm engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Ces régulations permettent aux cellules de s'adapter aux différents facteurs environnementaux essentiellement lors des métabolismes anaérobies, surtout dans les zones les plus proches du support où la présence d'oxygène est faible (Becker et al., 2001).

La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former une structure hétérogène tridimensionnelle (Costerton et al., 1995). Dans ce film tridimensionnel, des canaux

sont formés permettant la circulation d'oxygène, de nutriments et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien (Costerton et al., 1999).

Par ailleurs, un biofilm mature peut présenter un ensemble de sous-populations bactériennes. Certaines sous-populations sont actives et produisent des EPS, alors que d'autres sont inactives ou en train de mourir (Stewart et Franklin, 2008). Cette lyse cellulaire est contrôlée pendant la maturation du biofilm, ce phénomène permet d'apporter des nutriments et de l'ADN extracellulaire au reste de la population bactérienne. L'ADN libéré de la lyse cellulaire est un constituant essentiel de la matrice d'EPS (Steinberger et Holden, 2005).

D'un point de vue architectural, le biofilm mature a été observé après une étude en trois dimensions de biofilms de *Pseudomonas* en microscopie confocale à balayage laser (Lawrence et al., 1991). Il y est décrit un biofilm en champignon, dont la base est constituée d'attachement très dense de cellules et qui devient de plus en plus diffus dans les régions extérieures ; par contre, une forme de biofilm opposée est observée dans les biofilms de *Vibrio* (Leroy, 2006).

Cependant, la croissance du biofilm est en fonction de la disponibilité des nutriments et du milieu environnant. Si le milieu est riche en nutriments, la répartition du biofilm se fera par arrangement tridimensionnel hétérogène en forme de « champignons », si le milieu est pauvre, il se développe sous forme de petits amas (Donlan, 2002).

1.4.1.6. Dispersion

Quand le biofilm atteint une épaisseur maximale, il subit des phénomènes de dispersion où les cellules bactériennes adhérentes peuvent se détacher et retourner à une vie planctonique. Cette libération permet de favoriser la colonisation de nouveaux sites engendrant la formation d'autres biofilms (Parsek et Greenberg, 2005 ; Clutterbuck et al., 2007). En général, la dispersion peut se faire passivement ou activement.

Le détachement passif des cellules de biofilm s'effectue via l'action de stress hydrodynamiques, en particulier, l'effet de flux ou de forces de cisaillements. Les bactéries peuvent se détacher par érosion (détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats microbiens), par relargage (détachement massif et rapide de quantités importantes de cellules microbiennes), ou par abrasion (détachement par collision de particules entraînant une perte de biomasse attachée) (Characklis et al., 1990a).

Le détachement actif est dû à des remaniements de l'expression de certains gènes spécifiques (Morgan et al., 2006). Il peut être initié par des changements environnementaux tels que la limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann, 2008) et la modification du pH ou la

présence de certains composés spécifiques tels que l'EDTA, le NaCl, le CaCl₂, les agents chélateurs, les agents tensio-actifs, les agents antimicrobiens, etc. (Gjermansen et al., 2005). La privation en oxygène joue un rôle primordial dans le déclenchement des biofilms (Thormann et al. 2006). Des biofilms de *Shewanella oneidensis*, créés in vitro puis soumis 14 heures à une privation en oxygène ont subi un détachement massif et immédiat, avec 50 à 80 % des cellules se détachant du biofilm durant les 15 premières minutes d'hypoxie (Thormann et al., 2006). Lorsque le biofilm atteint une certaine densité cellulaire, l'appauvrissement du milieu en nutriments, ainsi que l'accumulation de déchets métaboliques toxiques favorisent la dispersion du biofilm, ce qui permet aux cellules libérées de migrer vers des sites plus favorables.

Le détachement des cellules peut se faire aussi par réinduction de mobilité flagellaire des cellules, changement de leurs propriétés de surface ou suite à la dégradation de la matrice d'EPS (Choi et Morgenroth, 2003). En outre, la modification des propriétés de surface d'une cellule (perte des pili, par exemple) peut conduire à son détachement du biofilm (Karatan et Watnick, 2009). Par ailleurs, la dispersion est réalisée par différents mécanismes affectant l'intégrité de la matrice extracellulaire via la libération d'enzymes extra-cellulaires ou autres molécules. Les enzymes extra-cellulaires dégradent la matrice d'EPS par digestion des sucres et des acides nucléiques ou par modification des protéines (Lee et al., 1996).

Il a été démontré que la population dispersée présente une diversité phénotypique beaucoup plus importante qu'une population planctonique ordinaire. En effet, cette population comporte des cellules dites variantes affectant entre autres leur mobilité flagellaire et la production d'exopolysaccharides et de surfactants et sont plus promptes à reformer un biofilm (Allegrucci et Sauer, 2007). L'hétérogénéité phénotypique confère à la population dispersée des capacités d'adaptation à plusieurs types d'environnements et donc, un avantage écologique important pour la colonisation de nouveaux sites ou milieux (Stewart et Franklin, 2008).

1.4.2. Quelques facteurs susceptibles de modifier l'adhésion bactérienne en laboratoire

1.4.2.1. Mode de préparation des cultures bactériennes

Le mode de préparation des cultures bactériennes peut avoir un effet remarquable sur les propriétés physico-chimiques de surfaces des bactéries, ainsi que sur leur degré d'attachement (Pedersen et al., 1986). Par exemple, la centrifugation des cultures, qui a pour but le lavage des microorganismes, peut rompre les flagelles et les pili, modifiant la composition de surface des microorganismes (Neu, 1996) et par conséquent les caractéristiques énergétiques de surface de la

bactérie (Pedersen et al., 1986) . La disparition de ces organites peut perturber l'adhésion (Vidal et al., 1998), car ils jouent un rôle très important dans les premières phases d'adhésion en permettant le déplacement vers la surface , ainsi que le contact avec les surfaces réceptrices (Vatanyoopaisarn et al., 2000). Vatanyoopaisarn et al. (2000) ont ainsi remarqué une diminution du niveau d'adhésion à l'acier inoxydable pour un mutant flagelline (-) comparativement à la souche sauvage *L. monocytogenes* NCTC 7973 cultivée à 22°C.

1.4.2.2. Présence de matières interférentes

Dans l'environnement naturel des microorganismes, des matières interférentes telles que les résidus de produits de nettoyage et le sérum albumine bovine qui est utilisé parfois dans les laboratoires pour tester l'efficacité des désinfectants en présence de matières organiques, vont pouvoir s'adsorber aux interfaces. En effet, l'adsorption de sérum albumine bovine en modifiant les caractéristiques physico-chimiques de surface des matériaux (caractère hydrophile, Lewis acide/base) peut diminuer l'adhésion des cellules bactériennes aux surfaces réceptrices. Ainsi, le sérum albumine bovine entraîne une diminution de l'hydrophilie de surface de *Lactococcus lactis* et par conséquent une réduction de son niveau d'adhésion au verre (Chevallier, 2002 ; Rubio, 2002).

1.4.3. Régulation de la formation du biofilm

1.4.3.1. Quorum sensing

Le développement et la régulation de la formation des biofilms sont contrôlés par des mécanismes de Quorum-Sensing (QS). Les micro-organismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules (Klein, 2011).

Les bactéries, par exemple, produisent des signaux organiques, appelés molécules auto-inductrices (AI), qui s'accumulent dans le milieu environnant pendant la croissance du biofilm (Fuqua et Greenberg, 2002). Une forte densité cellulaire entraîne une concentration élevée de ces molécules signal. L'augmentation des concentrations de ces molécules jusqu'à atteindre une valeur seuil, induit l'expression de certains gènes et/ou des changements physiologiques dans les cellules voisines (Parsek et Greenberg, 2005).

Le Quorum-Sensing (QS) joue un rôle dans l'adhésion des biofilms facilitant leur adaptation et leur évolution dans des environnements plus ou moins complexes (Daniels et al., 2004b ; Donlan, 2002).

Le QS aurait aussi un rôle dans l'épaisseur du biofilm, ainsi que dans la régulation de la physiologie du biofilm en modulant la taille de sa population microbienne, et en prenant en compte les conditions environnementales du milieu (Clutterbuck et al., 2007). Il initie les phénomènes de détachement et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm lors de la phase de dispersion (Irie et Parsek, 2008). Il peut, en outre, stimuler ou réprimer l'expression de certains caractères, comme la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Clutterbuck et al., 2007 ; Irie et Parsek, 2008). Les molécules du QS jouent aussi un rôle très important dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (Queck et al., 2006). Les synergies observées au sein des biofilms constitués de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le QS. Les biofilms composés de différentes espèces de microorganismes ont de fortes concentrations en molécules du QS, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes (Bjarnsholt et al., 2005).

1.4.3.2. Les polysaccharides

Parmi les autres mécanismes régulateurs du développement et de la maturation de biofilms, les polysaccharides présents à la surface des cellules bactérienne jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur milieu environnant. Par exemple, une endotoxine a été trouvée à la surface d'*Escherichia coli* faisant partie du lipopolysaccharide (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides, qui font partie de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilm selon les cas (Decho, 2010).

1.5. Protection mécanique et résistance aux stress extérieurs

La sécrétion d'une matrice exo-polymérique par les cellules bactériennes au sein d'un biofilm constitue une gangue stabilisatrice et protectrice vis-à-vis d'un certain nombre de facteurs d'agression environnementaux (dessiccation, forces de cisaillement, températures très faibles ou très hautes, forte pression, forte salinité, faible concentration en nutriments, etc.) ou de facteurs provoqués par l'homme (rayonnement, chaleur, ultrason, biocides, détergents, solution alcaline ou acide, etc.).

La matrice exo-polymérique protège les cellules bactériennes du biofilm de la dessiccation (Clutterbuck et al., 2007) ; la couche la plus externe de cette matrice se déshydrate afin de former

une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland, 2001). Grâce à la viscoélasticité de la matrice, la dispersion des biofilms est limitée en empêchant les bactéries d'être arrachées par les flux de surface. Les biofilms résistent aussi mieux que les formes planctoniques à l'exposition aux rayons UV et aux stress thermiques (Martinez et Casadevall, 2007). Ils peuvent modifier certains paramètres comme le pH ou les taux d'oxygène dissous dans le milieu environnant afin de permettre la survie des bactéries (Lee et de Beer, 1995).

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la résistance générale des bactéries contenues dans les biofilms aux biocides :

1- Protection liée à la matrice exo-polymérique :

Les agents antimicrobiens sont neutralisés par les polymères de la matrice et dilués à des concentrations non létales avant d'avoir pu accéder aux cellules bactériennes au sein du biofilm (Stewart et Costerton, 2001). Cette résistance accrue des biofilms multi-espèces aux agents antimicrobiens peut être liée à des modifications de la matrice extracellulaire des biofilms, qui retarde ou empêche ces agents d'atteindre leurs cibles (microorganismes) dans le biofilm par limitation de la diffusion et/ou interaction chimique avec les protéines extracellulaires et les polysaccharides (Burmolle et al., 2007). De plus, certains polysaccharides peuvent se lier aux agents antimicrobiens et les empêcher de pénétrer à l'intérieur du biofilm. C'est le cas, par exemple de l'alginate, un exopolysaccharide produit par *Pseudomonas aeruginosa* ; c'est un polymère anionique qui capte facilement les molécules cationiques et les inhibe (Leid et al., 2005).

La résistance antimicrobienne exposée par le biofilm est liée à leur structure en trois dimensions et cette résistance est perdue dès que cette structure est interrompue (Hoyle et al., 1992). Par conséquent, la production de quantités excessives de substances polymériques par les bactéries pendant la formation du biofilm et la croissance peut protéger les cellules en profondeur c'est-à-dire les cellules en contact avec le support.

2- Protection liée à l'état physiologique des bactéries et au mélange d'espèces au sein des biofilms :

Bien que beaucoup d'agents antimicrobiens puissent pénétrer librement le biofilm, les cellules bactériennes peuvent toujours être protégées. La présence de quelques zones où les bactéries sont en phase stationnaire dormante car non alimentées en éléments nutritifs représente un facteur significatif de résistance des bactéries du biofilm face aux biocides (Derlon et al., 2008).

Les biocides sont beaucoup plus efficaces contre les cellules bactériennes lors de leur croissance active, c'est-à-dire que le type de désinfectant ainsi que la concentration utilisée contre les cellules planctoniques ne sont pas nécessairement ceux appropriés pour les cellules de biofilm (Holah et al., 1990). En outre, Les cellules dans la couche profonde du biofilm reçoivent moins d'éléments nutritifs et d'oxygène que celles à la périphérie du biofilm (Brown et al., 1988). Ce sont des cellules dormantes ou à croissance très faible; en effet, cet état physiologique modifié entraîne une augmentation de résistance aux agents biocides (McFeters et al., 1995). Dans les biofilms mixtes, une concurrence de nutriments entraîne une carence nutritive, qui a également un rôle majeur dans la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (Berg et al., 1982).

3- Protection liée à la présence de sous-populations résistantes :

Au sein des biofilms, il existe des bactéries qui présentent des caractères phénotypiques différents et des résistances accrues (Suci et Tyler, 2003). Les sous-populations persistantes sont ainsi considérées comme en partie responsables de la résistance importante aux stress extérieurs des biofilms (Harrison et al., 2005). Dans un biofilm, le taux des cellules persistantes correspond à 10% de la population totale, fraction supérieure à celle d'une population de cellules planctoniques (0.1%). En outre, les transferts de caractères de résistance de cellule à cellule au sein de biofilms permettent aussi d'expliquer l'apparition d'une résistance aux agents antimicrobiens (Ghigo et al., 2001). Des plasmides conférant la résistance au mercure ont été isolés de bactéries marines vivant en biofilms et ont pu être transférés à des bactéries sensibles en les rendant moins sensibles (Ghigo et al., 2001 ; May et al., 2009).

Les cellules persistantes ne sont pas des mutants résistants mais des cellules dans un état de dormance surexprimant des gènes de la réponse générale aux stress extérieurs. Après l'exposition d'une population microbienne à un agent antimicrobien et l'éradication du reste de la population, les cellules persistantes permettent une recolonisation de nouveaux sites et présenteront les mêmes caractéristiques génétiques et physiologiques que la population de départ. Cette capacité de résistance rend l'élimination des biofilms très difficile et ceci a un impact considérable, compte-tenu de l'importance industrielle et médicale des biofilms (Dhar et McKinney, 2007).

1.6. Méthodes d'étude des biofilms

La plupart des études sur les biofilms sont réalisées en laboratoire. Elles sont complétées par des études réalisées sur le terrain. Les études menées sur le terrain sont plus difficiles d'un point de

vue logistique ; le prélèvement ainsi que le stockage des échantillons doivent être fait de la façon la plus stérile possible. Ce type d'études est plus proche des conditions réelles et permet de confirmer ou non les hypothèses émises par les laboratoires et de proposer des alternatives ou de nouvelles pistes de recherche (MacLean et al., 2004).

1.6.1. Standardisation des méthodes d'étude des biofilms

La standardisation des méthodes d'étude des biofilms se fait selon un certain nombre de critères :

- Choix des micro-organismes

Le choix des micro-organismes utilisés pour étudier la formation de biofilms repose sur plusieurs critères (MacLean et al., 2004):

- Capacité à former des biofilms par les microorganismes,
- Maîtrise des conditions de culture des micro-organismes (nutriments, oxygène, pH, température, lumière, etc.),
- Stabilité génétique et physiologique des microorganismes,
- Contamination évitée.

Plusieurs études ont été réalisées avec une grande variété de microorganismes, tels que : *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, etc. (MacLean et al., 2004).

- La polyculture

La majorité des études sur les biofilms sont réalisées sur une seule espèce de microorganismes (monoculture). Ce type de culture facilite l'identification des mutations survenues lors du changement de l'aspect des colonies. Néanmoins, dans la nature, les microorganismes sont sous forme de biofilms hétérogènes, composés de plusieurs espèces de microorganismes ; donc, il est rare de trouver des biofilms sous forme de culture pure. La polyculture est une méthode d'étude plus proche de la réalité biologique, mais plus complexe à mettre en œuvre. Les biofilms hétérogènes sont le siège d'un grand nombre d'actions synergiques et d'actions négatives entre les microorganismes (compétition, parasitisme, prédation, etc.). Lorsque les sous populations bactériennes au sein du biofilm atteignent un certain équilibre, seules quelques espèces bactériennes prédominent. Les espèces prédominantes au sein des biofilms ne sont pas obligatoirement les mêmes qui prédominent sous forme planctonique. Ainsi, les études en

laboratoire permettent de déterminer les espèces bactériennes qui deviennent prédominantes lors du changement des conditions environnementales (MacLean et al., 2004).

1.6.2. Méthodes d'obtention des biofilms

Des chercheurs ont développé différents modèles de biofilms artificiels en laboratoires (Lemon et al., 2008).

La technique d'immersion est une méthode pour laquelle la suspension cellulaire est mise en contact avec la surface inerte dans des conditions statiques ou des conditions d'agitation. Les biofilms sont dans un milieu aqueux approvisionné en nutriments, caractérisé ou non par un flux de liquide, dont la vitesse est constante. La surface inerte contenant le biofilm est rincée après un temps de contact variable (de quelques minutes à plusieurs jours) pour détacher les cellules planctoniques et les microorganismes restant adhérents peuvent être comptés sous microscope optique, avec ou sans marquage préalable, ou être dénombrés après avoir été détachés du support par écouvillonnage, sonication, etc. Les procédures de rinçage (doux ou dur), ainsi que les méthodes de détachement appliquées (sonication, écouvillonnage, agitation, etc.) sont le plus souvent non standardisées, et vont dépendre de l'opérateur, rendant ainsi impossible toute comparaison entre des résultats provenant de différents laboratoires. Ces méthodes de détachement, le plus souvent appliquées de manière non intentionnelle, conduisent en fait à évaluer la rétention du microorganisme sur les surfaces inertes plutôt que sa réelle adhésion.

La technique des microplaques n'est qu'une variante de la précédente. En effet, elle consiste à mettre des bactéries en culture dans des plaques de micro-titrage « 96 puits », sans flux. Cette méthode d'étude permet d'analyser de façon rapide et automatisée de nombreux échantillons et d'obtenir des biofilms sous forme de colonies formées à la surface de milieux gélosés. Les procédures de rinçage et de marquage sont du même type que dans la technique précédente. O'Toole et al. en 1999 publient une méthode de formation de biofilm en microplaque où les biofilms formés sur les parois du puits sont révélés par une coloration au crystal violet (CV) et quantifiés par une mesure spectrophotométrique de la densité optique à 570 nm.

Une grande partie des souches bactériennes utilisées en laboratoire produisent des biofilms fragiles comparativement aux souches sauvages des mêmes espèces bactériennes. Ces souches bactériennes auraient accumulé des mutations au fil des années lors des expériences de culture en laboratoire et auraient subi en quelque sorte une domestication (Branda et al., 2001).

1.6.3. Méthodes de détection et de quantification des biofilms

1.6.3.1. Analyse directe des biofilms par microscopie

Les principales méthodes utilisées pour l'observation des biofilms sont la microscopie électronique à balayage et la microscopie confocale à balayage laser.

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir des informations concernant la structure de surface des biofilms, en particulier, la disposition ou la répartition spatiale des cellules (Videla et al., 1988). Elle permet de recueillir des images tridimensionnelles de la surface d'un échantillon en haute résolution avec une bonne observation des microorganismes grâce à sa profondeur de champ, nettement plus élevée que celle des microscopes optiques. Cependant, cette méthode présente un certain nombre de désavantages dont le plus important est le risque de destruction partielle ou de déformation du biofilm, dû à la fixation artificielle des structures, au recouvrement par un film métallique et au travail sous vide (Surman et al., 1996). Par ailleurs, la microscopie électronique à balayage environnemental (MEB-E) permet une meilleure visualisation de la morphologie du biofilm et une bonne conservation de la plupart de ses structures que le MEB classique ; cet avantage est dû à l'observation de l'échantillon sous vide modéré et atmosphère humide (Walker et al., 2001).

La microscopie confocale à balayage laser permet l'observation, en temps réel et en 3D, de la formation de biofilms depuis les premières étapes d'adhésion et sans déformer ou abimer l'échantillon. La distribution spatiale des organismes, les épaisseurs moyennes et maximales ainsi que la visualisation des EPS vont pouvoir être déterminées. La quantification du nombre de microorganismes présents dans le biofilm est plus rapide et plus précise grâce à l'acquisition d'images. La quantité de bactéries vivantes et mortes présentes dans le biofilm peut aussi être déterminée en utilisant la même technique de double marquage. Un autre avantage de cette technique est la possibilité de la coupler avec des logiciels informatiques capables de traiter les images obtenues et de tirer plus d'informations sur la quantité de biomasse fixée, le volume, la surface, les dimensions, la porosité, les profils chimiques, etc. (Lewandowski, 2000). Cette technique présente néanmoins deux inconvénients. Le premier demeure le coût conséquent des microscopes confocaux et le second désavantage est la mobilité des microorganismes libres, leur mouvement durant l'acquisition peut donner des traînées sur les images obtenues. Ce problème est très atténué du fait de l'immobilisation des microorganismes (Neu, 2000).

1.6.3.2. Analyse indirecte des biofilms

La quantification, ainsi que l'étude de la viabilité et de l'adhésion des biofilms peuvent s'effectuer par différentes méthodes :

1.6.3.2.1. Méthodes conventionnelles

Les méthodes conventionnelles ont été largement utilisées depuis des années comme méthodes quantitatives de la contamination des surfaces (Flemming et Geesey, 1991). Ces méthodes intègrent des étapes comme l'écouvillonnage par exemple à l'aide de chiffonnettes ou de rinçages suivis par de la remise en culture pour l'échantillonnage et l'énumération des microorganismes adhérents aux surfaces. Elles permettent le décrochement de la contamination avec mise en culture pour visualiser le développement de colonies facilement dénombrables. Récemment, il a été démontré que la quantification des microorganismes adhérents sur des surfaces inertes est un problème récurrent dont les solutions proposées aujourd'hui ne sont pas complètement satisfaisantes et se résument à l'écouvillonnage, l'impédance-métrie, la PCR en temps réel et l'utilisation des ultrasons. Un dernier désavantage de ces techniques de remise en culture est le temps de réponse pouvant aller de 24 heures à plusieurs jours (Branda et al., 2005). A l'heure actuelle, l'intérêt va au développement de méthodes rapides telles que les méthodes moléculaires types PCR en temps réel. Il existe cependant des limites quant au bon prélèvement des biofilms sur des surfaces situées dans des zones peu accessibles telles que les rainures ou les micro-crevasses. Une autre difficulté à ces techniques d'incubation conventionnelles est liée à la présence de formes viables mais non cultivables quand on souhaite suivre l'hygiène des installations (Carpentier et al., 2009). Ces techniques sont liées aux contraintes environnementales spécifiques (dessiccation, carence en nutriments, pH, actions de détergents et désinfectants, etc.) endommageant les microorganismes sans les tuer (Wong et Cerf, 1995).

1.6.3.2.2. Bio-essais antibactériens

Ces essais permettent d'évaluer l'effet bactériostatique ou bactéricide d'une substance active. Un composé antibactérien peut soit directement tuer les microorganismes soit inhiber leur multiplication ; dans ce deuxième cas, les microorganismes pourront reprendre leur croissance normale après réintroduction dans un nouveau milieu nutritif. L'inhibition de croissance peut être obtenue, à différentes dilutions des produits antimicrobiens, sur milieu gélosé par diffusion (dépôts de disques ou puits formés dans la gélose) (Ortega-Morales et al., 2008) ou dans un

milieu liquide par mesure directe de la croissance (turbidité ou après étalement sur boîtes de pétri, croissance et détermination des unités formants colonies). En raison de la mauvaise diffusion de certains composés peu ou non solubles tels que les huiles essentielles, la méthode par diffusion est utilisée avec précaution car ces composés ne peuvent pas diffuser au travers de la gélose. Par contre, la méthode par dilution, qui est utilisée essentiellement pour déterminer le MIC (minimum inhibitory concentration), est beaucoup plus fiable et plus précise pour la détermination de l'efficacité des produits antimicrobiens (Rios et al., 1988).

1.6.3.2.3. Bio-essais anti-adhésion

L'étude des effets d'inhibition de l'adhésion de bactéries s'effectue dans un premier temps sur des tubes à essais. Après l'incubation des bactéries durant une nuit à une température donnée, le milieu contenant les bactéries non adhérentes aux parois des tubes à essais est retiré. Les bactéries qui restent adhérentes aux parois de verre sont marquées avec un colorant comme la safranine. Plus la coloration est importante de la couche apparue sur les parois, plus il y a de bactéries. Cette méthode est facilement réalisable, mais elle est longue et engendre parfois des erreurs d'interprétations lors de la lecture pour un manipulateur peu expérimenté (Stepanovic et al., 2000).

L'introduction des coupons de verre ou d'autre matériau dans les tubes à essais contenant les bactéries et les biocides à tester à différentes concentrations est possible. Après formation du biofilm, les coupons sont retirés et rincés à l'eau distillée afin d'enlever les cellules planctoniques. Le biofilm est récupéré ensuite par grattage (écouvillonnage) et l'efficacité du biocide est déterminée par comptage des bactéries après des dilutions en séries (Bhosale et al., 2002) ou par observation microscopique (Xu et al., 2005). Cette méthode présente néanmoins un inconvénient dont la formation d'EPS n'est pas vérifiée.

1.7. Préventions et moyens de lutte contre les biofilms

1.7.1. Contrôle de la formation des biofilms

L'une des solutions qui empêcheraient ou en tout cas réduiraient significativement la quantité des microorganismes vivants adhérents est de concevoir des matériaux convenables anti-adhésion. La topographie et le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface du matériau sont deux paramètres qui ont une grande importance dans l'adhérence et la colonisation bactérienne (Houari, 2009).

L'augmentation de la rugosité de surface de seulement 0.1µm aboutit à une hausse significative de l'accrochage après modification de la force d'attachement des bactéries à la surface du matériau (Boyd et al., 2002). Cependant, il est possible de modifier les propriétés initiales d'une surface, qui possède par définition des caractéristiques propres aux matériaux qui la composent, pour lui conférer des propriétés bactéricides. Pour les surfaces en contact avec les aliments, cette modification peut être obtenue surtout par le biais de traitements physiques pour créer des matériaux difficilement colonisables par les microorganismes. Des études ont suggérées qu'il faut produire un matériau très hydrophile et chargé négativement pour retarder l'adhésion des microorganismes. Il semble que plus une surface est hydrophile et chargée négativement, plus elle est résistante au développement bactérien et difficilement colonisable qu'une surface hydrophobe et chargée positivement (Tang et al., 2009). Cependant, il a été démontré que des surfaces très hydrophobes (angle de contact supérieur à 150°) présentent des propriétés résistantes à la colonisation par des microorganismes (Genzer et Efimenko, 2006).

1.7.2. Elimination des biofilms déjà formés

Le meilleur moyen de lutter contre les biofilms est de les détruire lorsqu'on n'a pas pu agir suffisamment tôt pour empêcher leur formation. De nombreuses techniques se font concurrence pour atteindre ce but.

1.7.2.1. Nettoyage mécanique

Le nettoyage mécanique présente le moyen le plus efficace pour lutter contre les biofilms. Il permet, grâce aux forces de cisaillement importantes créées, d'éliminer ces biofilms en détachant les microorganismes de leur support.

Le nettoyage précède souvent la désinfection. En général, le but de la désinfection est de détruire les bactéries du biofilm, qui n'auraient pas été éliminées préalablement par les différents moyens de nettoyage (mécanique, chimique, physique, etc.).

Le nettoyage mécanique (brosse, jets d'eau à moyenne et à haute pression, etc.) est performant pour l'élimination des biofilms formés sur les surfaces ; néanmoins, ce moyen est responsable de la production ou la dispersion d'aérosols contaminés sur d'autres surfaces. Une étude réalisée par le laboratoire d'étude et de recherche pour l'alimentation collective sur l'efficacité d'un jet d'eau froide (50 bars, débit de 250 L/h, distance buse-surface de 30 cm) sur des biofilms formés artificiellement en laboratoire et des biofilms formés en quatre semaines dans un atelier de

l'industrie fromagère, a montré que les contaminations après nettoyage étaient loin d'être négligeable, la réduction par décrochement de la contamination microbienne était de l'ordre de 10 à 10^2 alors que les populations initiales s'élevaient jusqu'à 10^7 ufc/cm² (Wanner et Bauchrowitz, 2006).

1.7.2.2. Traitements enzymatiques

Les produits de nettoyage à base d'enzymes sont parmi les plus efficaces pour l'élimination des souillures de type biologique comme les biofilms (Whittaker et al., 1984). Les températures optimales d'utilisation pour les traitements enzymatiques ne doivent pas excéder 50°C et la durée d'action en général est assez courte si la concentration en enzymes est optimale (Argüello et al., 2003).

Le traitement enzymatique dégrade les polysaccharides de la matrice et aboutit à la destruction du biofilm en désorganisant totalement son architecture (Donlan, 2008). Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, produisent l'alginate qui est un exopolysaccharide et qui retarde la diffusion des antimicrobiens au sein du biofilm et inhibe leur activité. Si on ajoute au milieu une enzyme : l'alginate lyase qui dégrade l'alginate, le pouvoir de pénétration et l'activité antimicrobienne de l'antimicrobien sont augmentés dans le biofilm (Donlan, 2008).

Cependant, comme les biofilms sont complexes et hétérogènes, l'utilisation d'un seul type d'enzyme pour ce type de traitement est peu efficace. Différentes enzymes seules ou ensembles ont été testées contre des biofilms monospécifiques in vitro dans des conditions de laboratoire (Johansen et al., 1997). L'enzyme « Pectinex ultra » décroche des bactéries avec une efficacité variable selon les espèces et dégrade la matrice de polysaccharides, mais elle n'a pas d'activité bactéricide. Par contre, la « glucose oxydase » et la « lactopéroxydase » possèdent des activités nettoyante et bactéricide.

1.7.2.3. Traitements chimiques

Les produits chimiques peuvent être divisés en plusieurs catégories : les acides, les alcalins, les oxydants, les chélateurs et les agents tensioactifs également appelés surfactants (Al-Amoudi et Lovitt, 2007). Plusieurs études abordent l'efficacité de ces traitements pour la destruction des microorganismes organisés en biofilm et pour le nettoyage des souillures (Whittaker et al., 1984).

L'action des détergents et des désinfectants détache difficilement plus de 90% de la contamination et seuls les détergents alcalins sont efficaces pour détacher les biofilms, alors que les détergents acides sont couramment utilisés car capables de dissoudre des dépôts minéraux.

Les désinfectants oxydants tels que l'eau oxygénée, le chlore, le peroxyde d'hydrogène et l'acide péracétique semblent avoir un meilleur effet antibactérien, couplé à la capacité de décrocher une partie des microbes adhérents.

Les traitements par les chélateurs induisent le décrochage des matières organiques, inorganiques et biologiques par la capture d'ions métalliques. Les traitements par les agents tensio-actifs anioniques, cationiques et non ioniques peuvent être utilisés. Les tensio-actifs anioniques à pH basique a montré une bonne efficacité de nettoyage (Mohammadi et al., 2001) tandis que les tensio-actifs cationiques sont peu probants (Lee et al., 2001). Les tensio-actifs non ioniques sont moins efficaces pour réduire les quantités de biofilm et de microorganismes vivants (Chen et Stewart, 2000).

Les microorganismes inclus dans un biofilm sont plus résistants aux agents désinfectants que lorsqu'ils sont en suspension. En effet, il a été montré que la concentration du désinfectant doit être de 100 à 1000 fois supérieur afin d'obtenir sur des biofilms la même efficacité que sur des cellules dispersées dans un milieu liquide. Par ailleurs, il semble que la résistance aux agents désinfectants disparaît rapidement après le détachement des microorganismes de leur support (Simões, 2010).

1.7.2.4. Traitements physiques

Certains traitements physiques tels que les modifications de température, les rayonnements (ultraviolet) ou des ultrasons sont utilisés pour décrocher ou détruire les souillures de type biologique comme les biofilms. Ces traitements sont rarement utilisés seuls car leur action présente un effet synergique avec les traitements enzymatiques ou chimiques.

L'utilisation des UV par exemple a un effet faible sur les microorganismes inclus dans un biofilm car la matrice extracellulaire absorbe une grande partie des rayonnements (Elasri et Miller, 1999). La dose habituelle efficace pour détruire des microorganismes à l'état planctonique devient négligeable envers les microorganismes organisés en biofilm (Lehtola et al., 2005).

Les ultrasons, en général, sont efficaces pour détruire les bactéries mais n'ont pas d'effet sur la structure des biofilms, ils ne déstabilisent pas la matrice extracellulaire et ne dispersent pas les cellules bactériennes (Qian et al., 1996). Par contre, si les ultrasons sont associés avec des

traitements enzymatiques, un effet synergique est observé pour la destruction du biofilm (Oulahal-Lagsir et al., 2003). En outre, Des résultats similaires d'effets synergiques ont été prouvés avec des associations antimicrobiens-ultrasons (Oian et al., 1996).

1.7.2.5. Traitements par des composés naturels d'origine végétale

Plusieurs études suggèrent que les extraits naturels des plantes peuvent être actifs contre les biofilms (Quave et al., 2008). Il a été démontré que les extraits de romarin et de menthe poivrée inhibent la formation du biofilm de *Streptococcus mutans* à une concentration de 200 à 800 ppm (0,02 à 0,08 %) (Rasooli et al., 2008). Les composés de l'extrait d'origan, le thymol et le carvacrol ont un effet direct sur le biofilm de *S. aureus* et *S. epidermidis* (Nostro et al., 2007). La formation du biofilm de *C. albicans* a été inhibée par les extraits d'eucalyptus, de la menthe poivrée et des clous de girofle (Agarwal et al., 2008), et aussi par le thymol, le carvacrol, le géraniol, le 1,8- cinéole, citral, l'eugénol, le farnesol, le linalol, le menthol et le terpinène (Dalleau et al., 2008). Le thymol, le carvacrol et le géraniol étaient les plus inhibiteurs, avec une haute activité dans des essais de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les extraits de *Satureja thymbra* (1,0 %) (Chorianopoulos et al., 2008) et d'origan, le thymol et le carvacrol ont également été démontrés pour leur effet d'éliminer le biofilm formé (Nostro et al., 2007) .]

Les extraits de *C. cassia* peuvent être utilisés pour le développement de produits désinfectants naturels pour contrôler les biofilms bactériens, en particulier dans l'industrie laitière (Omidbaigi et al., 2007).

Des chercheurs ont montré que l'extrait de clous de girofle a de fortes propriétés antimicrobiennes et a efficacement inhibé et éradiqué les cellules planctoniques et du biofilm de *S. aureus* (Irkin et al., 2009) et *C. sakazakii* (Sharma et Tripathi, 2008).

Nous avons pu voir au cours de ce chapitre que de nombreux facteurs interviennent dans la formation du biofilm : le substrat, le film primaire organique et les bactéries. Le phénomène d'adhésion du biofilm sur les surfaces inertes et plus particulièrement les premières phases d'adhésion des bactéries sur les substrats en contact permanent avec les denrées alimentaires n'a pas encore été totalement clarifié. Dans cette optique, nous allons essayer dans la partie expérimentale de dénombrer les indicateurs de l'état d'hygiène des surfaces inertes en contact avec les poissons après incorporation d'extraits de plantes aromatiques dans la glace lors de la conservation de l'anchois méditerranéen.

Chapitre 2

Evolution de la qualité du poisson

2.1. Composition de la chair du poisson

De manière générale, la composition de la chair des poissons varie considérablement d'une espèce et d'un individu à l'autre suivant l'âge, le sexe, l'environnement, la saison, le cycle et la diète.

La chair des poissons renferme de l'eau (70-85%), des protéines (15-25%), ainsi que des composés azotés, des lipides (1-10%), des hydrates de carbone (0.1-1%), des minéraux (1-1.5%) et des vitamines (Kaushik, 1997 ; Yoshinaka et al., 1988 ; Piclet, 1987). Le tableau 1 donne des exemples des différences entre les poissons gras, semi-gras et maigres.

Tableau 1: Composition chimique comparative de muscle de poissons gras, semi-gras et maigres (Jacquot, 1962).

	Eau	Protéines	Lipides	Cendres
Poissons gras	68.6%	20%	10%	1.4%
Poissons semi-gras	77.2%	19%	2.5%	1.3%
Poissons maigres	81.2%	16.4%	0.5%	1.3%

2.1.1. Protéines et acides aminés libres

Les protéines constituent environ 60 à 75% du poids sec de ces tissus (Tanner et al., 2000), soit 18 à 22% du poids frais (Haard, 1992).

La teneur en protéines de la chair des poissons est indépendante du sexe et de la taille des individus (Robards et al., 1999). Cependant, une réduction de la teneur en protéines a été observée en période de migration et de reproduction (Aksnes et al., 1986) ou lors d'un jeûne prolongé (Beaulieu et Guderley, 1998). En outre, la teneur en protéines augmente avec la taille du poisson au sein d'une même espèce et notamment au cours des périodes de forte croissance (Shearer, 1994). Par ailleurs, il a été montré qu'une augmentation de la teneur en protéines de l'aliment induit un accroissement de la teneur en protéines du poisson (Gunasekera et al., 1997),

tandis qu'aucun effet n'est mis en évidence dans d'autres études comme chez le saumon (Sveier et al., 1999), la perche commune (Mathis et al., 2003) ou le red drum (Thoman et al., 1999).

La teneur en acides aminés libres de la chair du poisson varie de 0.5 à 2.0% de la matière fraîche selon les espèces (Haard, 1992). Leur teneur dépend de l'apport alimentaire (Gomez-Requeni et al., 2004), de la vitesse de protéosynthèse et de protéolyse et également des variations saisonnières (Shirai et al., 2002). Ce type d'acides aminés provient de la digestion des protéines alimentaires et de la protéolyse des tissus (Wilson, 2002).

2.1.2. Lipides

Chez le poisson, les principaux sites de dépôts lipidiques sont le foie, le muscle, le tissu adipeux périveriscéral et le tissu adipeux sous cutané, dont la répartition varie selon les espèces (Scheridan, 1988).

Dans le groupe des poissons maigres, la matière grasse est stockée dans le foie qui atteint des taux de 40 à 70 g de lipides pour 100 g de tissu, et les muscles ne contiennent que quelques grammes de lipides pour 100 g de chair (5 g pour 100 g de chair). Les graisses musculaires contiennent peu de glycérides ou lipides apolaires (environ 35% de la teneur en lipides totaux) et une forte proportion de phospholipides ou lipides polaires (environ 65% de la teneur en lipides totaux) intimement associés aux protéines car ils sont constitutifs des membranes cellulaires (Corraze et Kaushik, 1999). La teneur en lipides des poissons gras augmente de la queue vers la tête contrairement aux poissons maigres. Elle peut généralement varier entre 5 et 25% (Sainclivier, 1983). Les graisses se présentent sous forme de globules gras extracellulaires dans le tissu sous-cutané, dans les muscles de la paroi abdominale et dans les muscles animant les nageoires et la queue. Ce type de matière grasse est surtout constitué essentiellement des triglycérides (lipides neutres) appelés matières grasses de réserve où les acides gras sont généralement les plus saturés. Les poissons semi-gras sont généralement des poissons plats qui accumulent leurs graisses dans le foie mais aussi dans leurs muscles et dans d'autres tissus tels que le tissu adipeux péri-viscéral. (Corraze et Kaushik, 1999).

La teneur en lipides des muscles dépend de la nature du muscle considéré : rouges ou blancs. Les muscles rouges contiennent environ deux fois plus de lipides que les muscles blancs chez les poissons maigres (Body et Vlieg, 1989).

Les lipides de poisson contiennent une proportion importante d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série des oméga 3 (15 à 36% de l'ensemble des acides gras présents), notamment les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Cette

prédominance est due à la forte concentration d'acides gras polyinsaturés (n-3) dans le phytoplancton (Sargent et al., 1989). Ces acides gras sont impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires, cancéreuses et inflammatoires (Kamal-Eldin et Yanishlieva, 2002).

2.1.3. Extraits azotés non protéiques

Les extraits azotés non protéiques sont des composés de nature non protéique, de poids moléculaires faibles, solubles dans l'eau et qui renferment de l'azote. Ils constituent de 9 à 18 % de l'azote dans les téléostéens.

Les composants principaux des extraits azotés non protéiques sont : l'ammoniaque, l'oxyde de triméthylamine (OTMA), la créatine, les acides aminés libres, les bases puriques et les bases nucléotides et, dans le cas des poissons cartilagineux, l'urée (Oehlenschläger et Rehbein, 2009).

L'OTMA mérite plus d'attention car il constitue une part importante et caractéristique de la fraction ANP dans les espèces marines. Le taux de ce composé varie de 1 à 5% du tissu musculaire (poids net) de poissons marins (Hebard et al., 1982).

2.1.4. Glucides

La teneur en glucides dans le muscle du poisson est faible, habituellement inférieure à 0,5% et le sucre essentiel de son muscle est le glycogène qui est une forme de stockage du glucose (Schulz et al., 2005). Cette teneur varie selon les espèces, l'état alimentaire et le degré de fatigue, elle est influencée également par les conditions de capture, qui peuvent conduire à l'épuisement des réserves de glycogène et ainsi à une diminution du niveau de glucide. La teneur en glycogène de la chair de poisson, immédiatement après la mort, serait de près de 0.44 à 0.85 g pour 100 g de muscle frais pour l'aiglefin, de 0.6 g chez le maquereau et de 1.5 g chez la truite saumonée. Dans les conditions anoxiques post mortem, l'évolution du pH en conditions post mortem dépend de la quantité d'acide lactique formée suite à la dégradation du glycogène (Sainclivier, 1983)

2.1.5. Vitamines et sels minéraux

La chair du poisson est une bonne source de vitamines B, A et D. La teneur en vitamines A et D, que l'on trouve en grandes quantités dans la chair des poissons gras, est en abondance dans le foie de certaines espèces comme le cabillaud et le flétan. Le niveau de vitamine E dans la chair du poisson correspondait à sa concentration dans son alimentation. Cette vitamine a été ajoutée dans l'aliment du poisson en tant qu'antioxydant pour protéger les acides gras polyinsaturés

oméga 3, considérés comme très importants pour la santé tant du poisson que de l'homme. (Waagbø et al., 1993).

La chair du poisson d'eau de mer est considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore en particulier, mais également de fer, de cuivre, de sélénium et d'iode. La teneur en vitamines et sels minéraux est spécifique et peut varier selon l'espèce et la saison (Oehlenschläger et Rehbein, 2009).

2.2. Les altérations post mortem du poisson influençant la qualité

Plusieurs mécanismes se produisent et engendrent la détérioration du poisson après la mort :

2.2.1. Altérations organoleptiques

Les modifications organoleptiques caractéristiques dans le poisson post mortem sont celles perçues par les sens ; c'est-à-dire : odeur, apparence, texture et goût. Elles varient considérablement suivant l'espèce de poisson et la méthode de stockage.

L'apparition d'odeurs, souvent désagréables, est parmi les conséquences les plus significatives de l'altération bactérienne du poisson. Au cours de cette altération, des odeurs différentes sont détectées selon l'espèce de poisson et les bactéries en cause. Ces dernières et à faible pourcentage produisent un changement organoleptique perceptible sur le poisson. Certains composés responsables des odeurs ont été identifiés; ce sont notamment l'acétaldéhyde, le diméthylsulfure, le diméthyldisulfure, le méthylmercaptan, l'éthylacétate, l'éthylalcool, l'hexanoate d'éthyle, le butyrate d'éthyle et la butanone. En outre, d'autres substances sont impliquées comme l'ammoniac, la DMA, la TMA, l'hydrogène sulfuré et l'acide sulfhydrique (Miller et al., 1973b ; Joffraud et al., 2001).

Parallèlement à l'odeur, la peau, les branchies, le mucus et l'œil subissent également des modifications. En outre, la rigidité du corps est affectée.

Le goût caractéristique du poisson se développe normalement pendant les deux premiers jours de la conservation sous glace. Lors de l'altération, l'évolution du goût se traduit au début par une diminution prononcée de la saveur spécifique, cette saveur est progressivement remplacée par des saveurs différentes suivant les espèces et la nature des contaminations (lactique, acétique, butyrique, amère, sulfurée, ammoniacale) (Soudan et al., 1965).

L'inconvénient majeur du poisson est que son altération est peu maîtrisée et que l'estimation de son niveau de fraîcheur est très difficile. Les changements organoleptiques du poisson et donc de sa qualité sont surtout liés aux changements autolytiques, bactériologiques et lipidiques.

2.2.2. Altérations autolytiques

2.2.2.1. Production d'énergie post mortem dans le muscle

Après la mort du poisson, la glycolyse post mortem est la seule voie possible de production d'énergie. Elle a essentiellement comme produits finaux les acides lactique et pyruvique. L'accumulation de ces produits abaisse le pH du muscle. Le pH diminue de 6,8 à un pH final de 6,1 à 6,5 ; néanmoins, chez certaines espèces de poissons, le pH final peut être aussi bas que 5,8-6,0. Ces pH sont rarement aussi bas au moment de la rigor mortis que ceux observés post mortem dans les muscles des mammifères. Par exemple, le muscle des bovins atteint souvent des niveaux de pH de 5,4-5,6. La quantité d'acide lactique produite est en rapport avec la valeur de glycogène accumulée dans le tissu vivant. En général, la chair de poisson contient un taux assez faible de glycogène comparé aux viandes des mammifères et donc il se forme bien moins d'acide lactique après sa mort. L'état nutritionnel, le stress et la fatigue du poisson avant et pendant la capture auront également un impact important sur le taux du glycogène stocké et par la suite sur le pH final post mortem. Il a été montré que quelques minutes seulement de stress avant capture produisaient une baisse de 0,50 unités de pH en trois heures alors que, dans un poisson qui ne s'est pas débattu, le pH diminuait uniquement de 0,10 unités dans le même temps (Chiba et al., 1991).

La chute du pH post mortem du muscle du poisson affecte les propriétés physiques du muscle avec une dénaturation partielle des protéines musculaires et une perte d'une partie de leur capacité de rétention d'eau. En état de rigor mortis, la chair du poisson perd son humidité à la cuisson et est particulièrement inapte à un traitement ultérieur par la chaleur, car ce traitement cause sa dénaturation et a un effet néfaste sur la texture de muscle du poisson. Il a été montré que des niveaux de dureté inacceptables, accompagnés de pertes d'eau à la cuisson, se produisent à des niveaux très faibles de pH (Love, 1975).

2.2.2.2. Autolyse et catabolisme de nucléotide

Un poisson en état de rigor mortis est trop raide et déformé pour être fileté ou manipulé, rendant impossible le traitement mécanique. Le ramollissement de la chair du poisson durant la résolution de la rigor (et éventuellement les processus d'altération) coïncide avec les changements autolytiques. La dégradation des composés reliés à l'ATP est l'une des premières modifications qu'on décèle de manière plus ou moins prévisible après la mort. Cette dégradation de l'ATP aboutit à la formation de l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate

(AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et l'hypoxanthine (Hx) (Surette et al., 1988). La vitesse de la dégradation des catabolites de l'ATP varie beaucoup d'une espèce à l'autre et elle coïncide souvent avec le niveau perceptible de la dégradation déterminé par des analystes entraînés (Saito et al., 1959).

2.2.2.3. Autolyses et enzymes protéolytiques

Les effets de la dégradation protéolytique due à des protéases isolées de la chair du poisson sont souvent reliés à un ramollissement considérable du tissu. L'autolyse de la cavité viscérale (appelée éclatement de l'abdomen) est l'un des effets les plus notables de la protéolyse autolytique chez les espèces pélagiques (poissons gras) comme le hareng et le capelan. L'autolyse fournit un environnement favorable au développement et à la croissance des bactéries d'altération (Aksnes et Brekken, 1988). Il a été démontré que l'autolyse de la cavité viscérale de certaines espèces de poisson était d'avantage reliée à la manutention physique qu'à des facteurs biologiques comme la taille du poisson ou la quantité d'aliments dans les viscères. En particulier, les opérations de congélation et décongélation, le temps de décongélation à 15°C et le temps de stockage sous glace influaient plus sur l'autolyse de la cavité viscérale que les facteurs biologiques (Botta et al., 1992).

Les cathepsines sont des protéases "acides" libérées à la suite d'accidents physiques ou de congélation-décongélation post mortem de la chair du poisson. Les cathepsines D et L jouent un rôle majeur dans la dégradation autolytique des tissus du poisson du fait que la plupart des autres cathepsines ont une plage d'activité étroite de pH bien trop basse pour être significative physiologiquement. Il a été démontré que la cathepsine D est active sur une gamme de pH de 3 à 8 avec un pH maximum de près de 4,0. La cathepsine L contribue davantage à l'autolyse du muscle de poisson que la cathepsine D car elle est plus active à pH neutre. Il a été constaté qu'elle digérait aussi bien les protéines myofibrillaires (actomyosine) que les tissus conjonctifs (Reddi et al., 1972).

Un second groupe de protéases appelées "calcium activated factor ou CAF " ou "calpaïnes" a été associé à l'autolyse du muscle du poisson. Les calpaïnes sont retrouvées dans les poissons à nageoires, les crustacés et les viandes. Les calpaïnes provoquent l'autolyse post mortem de la chair par la digestion de la myosine (particulièrement la myosine à chaîne longue) et des protéines Z des myofibrilles. Ces calpaïnes sont actives au pH physiologique et elles jouent un rôle très important dans le ramollissement du poisson pendant la conservation au froid. Alors que le ramollissement par autolyse est un sérieux problème diminuant la valeur commerciale du

poisson car la dureté ne présente aucun problème dans du poisson non congelé. Il a été montré que les calpaines du poisson sont nettement plus actives à basse température que ne le sont les calpaines de mammifères (Muramoto et al., 1989).

2.2.3. Changements microbiologiques

2.2.3.1. Flore bactérienne du poisson vivant

Les microorganismes se trouvent sur la peau, les branchies et dans le tractus gastro-intestinal des poissons vivants et fraîchement capturés. Leur nombre varie considérablement allant de 10^2 à 10^7 UFC (unités formant colonies)/cm² de surface de peau (Liston, 1980) et de 10^3 à 10^9 UFC/g d'intestins ou de branchies (Shewan, 1962). La flore bactérienne naturelle du poisson fraîchement pêché est le reflet de la qualité microbiologique de l'eau environnante où il vit. Le poisson pêché dans les eaux chaudes a une charge bactérienne plus forte que celle du poisson pêché dans des eaux propres et froides. Les poissons provenant d'eaux chaudes polluées présentent des charges importantes, de l'ordre de 10^7 UFC/cm² (Shewan, 1977).

La microflore initiale de poissons issus des eaux tempérées est dominée par les bactéries psychrotrophes à Gram négatif appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* et *Flavobacterium*. Les *Vibrionaceae* (*Vibrio* et *Photobacterium*) et les *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* spp.) sont aussi des bactéries aquatiques de la flore du poisson. Des bactéries à Gram positif comme *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* et corynéformes peuvent être également trouvées en nombres variables. Des charges élevées d'*Enterobacteriaceae* ont été trouvées dans les eaux polluées. Cependant, *Escherichia coli* et *Salmonella* peuvent survivre très longtemps dans les eaux tropicales et devenir indigènes de l'environnement (Fujioka et al., 1988).

2.2.3.2. Invasion microbienne

La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile et les régions contaminées correspondent aux régions du corps en contact avec l'eau (peau, mucus et branchies) et au tractus intestinal (Shewan, 1977).

La pénétration des bactéries s'effectuent en partie par la peau, mais essentiellement par le système vasculaire à partir des branchies et de la cavité viscérale. Les réactions d'autolyse des muscles du poisson favorisent la progression des bactéries. Les bactéries de l'intestin peuvent pénétrer dans les muscles de la paroi abdominale par l'action des enzymes digestives. Le mucus

de certaines espèces présente des propriétés antibactériennes du fait de la présence de lysozymes et de certains anticorps (Shewan, 1977 ; Fletcher et Csonka, 1998).

Les bactéries de la surface de la peau colonisent largement les alvéoles des écailles et envahissent la chair en se déplaçant entre les fibres musculaires. Cependant, il a été montré que seul un nombre très limité de bactéries envahit la chair pendant la conservation sous glace (Murray et Shewan, 1979).

En conditions post-mortem, le pH qui atteint une valeur proche de la neutralité (6.8/6.9), favorise la prolifération bactérienne de la microflore initiale du poisson. Ensuite, au cours d'éviscération, d'étêtage, de filetage et de parage, les microorganismes peuvent contaminer la chair malgré que ces étapes soient suivies du lavage et de la réfrigération pour réduire la charge microbienne (Tahiri, 2007).

2.2.3.3. Evolutions de la microflore du poisson au cours du stockage

Pendant la conservation sous glace, les bactéries atteignent 10^8 - 10^9 UFC/g de chair ou par cm^2 de peau après 2 à 3 semaines. Pendant la conservation à température ambiante, leur nombre est de 10^7 - 10^8 UFC/g après 24 heures de stockage. La composition de la microflore du poisson, qu'il soit tropical, ou d'eaux tempérées, varie également de façon très importante pendant le stockage. Ainsi, cette microflore est composée presque exclusivement de *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens* après 1 à 2 semaines de conservation sous glace en aérobiose. A température ambiante (25°C), les mésophiles domine la microflore du poisson au stade de l'altération, notamment par des *Vibrionaceae*, et par des *Enterobacteriaceae* si les poissons sont pêchés dans des eaux polluées (Devaraju et Setty, 1985).

Si le poisson est conservé sous froid dans des conditions d'anaérobiose ou dans une atmosphère modifiée (contenant du CO_2), le nombre de bactéries psychrotrophes telles que *S. putrefaciens* et *Pseudomonas* est souvent bien plus faible que sur le poisson conservé en aérobiose (Dalgaard, 1993).

2.2.3.4. Changements biochimiques produits par le développement bactérien durant la conservation et l'altération

Les sous-produits issus du métabolisme bactérien et qui se développent dans le poisson au cours de sa dégradation naturelle sont généralement la triméthylamine (TMA), l'ammoniaque, les composés soufrés volatils, les aldéhydes, les cétones, les esters, l'hypoxanthine ou encore des

amines biogènes tels que la putrescine, la cadavérine, la tyramine, la spermine ou l'histamine. Les principaux substrats pour la production des sous-produits sont les glucides (lactate, ribose, etc.), les nucléotides (inosine, monophosphate, inosine, etc.), les molécules azotées non protéiques "ANP" et les acides aminés.

L'activité protéolytique s'associe souvent à une libération d'acides gras libres par lipolyse. Ces acides gras sont de bons indicateurs de l'altération du poisson. L'oxyde de triméthylamine (TMAO) présent dans la chair du poisson peut être dégradé par les enzymes bactériennes endogènes (TMA oxydase) en triméthylamine (TMA) aux températures de réfrigération (Jorgensen et al., 2001). Le sulfure d'hydrogène (H_2S), le méthanthiol ou méthyl mercaptan (CH_3SH), les acides gras volatils et l'ammoniaque surgissent suite au développement microbien (Sivertsvik et al., 2002). L'ammoniaque est un des éléments constitutifs de l'azote basique volatile total (ABVT), dont le dosage est utilisé pour évaluer l'état de fraîcheur du poisson.

2.2.4. Changements au niveau des lipides

Comme expliqué précédemment, les lipides du poisson possèdent des propriétés nutritionnelles recherchées et sont favorables pour la santé humaine (Kamal-Eldin et Yanishlieva, 2002). Cependant, les acides gras polyinsaturés sont très sensibles aux réactions d'oxydation. L'hydrolyse et l'oxydation sont deux réactions distinctes qui présentent les principales voies d'altérations des lipides au cours de la conservation et de la transformation des poissons. Il en résulte la production d'une série de substances qui affecte la qualité physico-chimique et sensorielle du poisson (odeur et goût désagréables) et modifie la texture par des liaisons covalentes avec les protéines de la chair du poisson. Les différentes réactions dépendent surtout des espèces de poissons et de la température de conservation ; elles sont, soit non-enzymatiques, soit enzymatiques d'origine microbienne, intracellulaires ou digestives provenant du poisson lui-même. Les poissons gras sont évidemment très sensibles à la dégradation des lipides, même à des températures de conservation inférieures à 0°C (Hsieh et al. 1989).

2.2.4.1. L'hydrolyse

L'hydrolyse est associée à la dégradation du muscle de poisson au cours de la transformation et de la conservation (Shewfelt, 1981).

Chez le poisson, l'hydrolyse des lipides est principalement le fait d'enzymes lipolytiques tissulaires telles que les lipases, la phospholipase A2, et la phospholipase B. Les lipases libèrent

à partir des triglycérides des acides gras libres, des diglycérides et des monoglycérides. Bien que l'activité lipolytique des phospholipases diminue après 7 jours de stockage sous glace (2-3°C), l'activité lipolytique des lipases continue au-delà de 15 jours (Hwang et Regenstien, 1993 ; Aubourg et al., 1998b). Une quantité considérable d'acides gras libres (AGL) peuvent s'accumuler au cours du stockage et donner un arrière-goût de savon à la chair du poisson.

Les activités enzymatiques sur les lipides sont plus importantes dans le muscle rouge que dans le muscle blanc (Shewfelt, 1981; Hwang et Regenstien, 1993). Ces enzymes sont inactivées par la cuisson (Hwang et Regenstien, 1993). L'hydrolyse des lipides est très active entre -4°C et 4°C (Aubourg et al., 1998b; Aubourg et al., 1998a). Cette activité lipolytique, bien que faible, persiste lors de la conservation à l'état congelé. La cinétique de formation des acides gras libres est ralentie si les températures de conservation sont basses. Il a été montré que la formation des acides gras libres continue après 145 et 245 jours de stockage à -40°C de la chair du poisson (De Koning et Mol, 1990). D'après Aubourg (2001a; 2001b), les acides gras libres ont un effet pro-oxydant sur les lipides de poisson et interagissent avec les protéines favorisant leur dénaturation et conduisent à l'altération du produit (Dyer et Fraser, 1959). En général, ces réactions de lipolyse induisent une dégradation de la qualité physico-chimique et sensorielle du poisson (Shewfelt, 1981).

2.2.4.2. L'oxydation des lipides

Il existe des mécanismes naturels de contrôle de l'oxydation lorsque le tissu est vivant afin de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Ainsi, il existe une régulation, des facteurs prooxydants et antioxydants qui permet de maintenir la stabilité des lipides. Cette régulation est perturbée à la mort de l'animal et durant le stockage et la transformation des poissons. Ce dérèglement induit des changements des propriétés biochimiques de la chair du poisson tels que l'augmentation de la teneur en fer libre, l'activation des protéines héminiques et la dégradation des membranes (Hultin, 1994 ; Kanner et al., 1987). Ces différents facteurs favorisent le développement des réactions d'oxydation qui induisent la dégradation des propriétés physico-chimiques, organoleptiques et nutritionnelles du poisson (Frankel, 1998).

L'oxydation des lipides est sous l'influence de différents facteurs. Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides, la présence de pro-oxydants (pigments héminiques, enzymes, ions métalliques) ou d'antioxydants naturels (vitamine E, caroténoïdes, etc.) et des facteurs externes tels que la température, la pression partielle en

oxygène, la lumière, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation (Hsieh et al., 1989).

2.2.4.2.1. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés présents dans les lipides du poisson les rendent très sensibles à l'oxydation. Cette oxydation peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs : l'auto-oxydation, les ions métalliques, les radicaux libres, la photo-oxydation et l'oxydation enzymatique.

L'auto-oxydation est une réaction auto-catalytique qui se déroule en trois étapes. Une première réaction, favorisée par une élévation de température, produit un radical libre de lipide par élimination d'un hydrogène de l'acide gras en présence de lumière ou d'oxygène (initiation). Elle se poursuit par une étape de propagation (réaction en chaîne) où les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxydes instables qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes. La dernière phase (terminaison) où les substrats radicalaires sont épuisés pour conduire à un produit qui n'est pas un radical libre. Les hydroperoxydes apparaissent pendant les phases d'initiation et de propagation. Ils peuvent être dosés lors des analyses d'oxydation, mais ils ne présentent pas vraiment un critère suffisant pour déterminer l'état oxydatif du milieu, car ils sont des composés instables qui se dissocient aboutissant notamment à la formation de composés secondaires, tels que des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides carboxyliques et des alcanes. Les hydroperoxydes sont sans goût et, par conséquent, l'indice de peroxyde" largement utilisé pour déterminer l'état oxydatif n'ait souvent que peu de relations avec les propriétés sensorielles (Ghaly et al., 2010).

L'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique, dont les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (Hultin, 1994). L'activité de la cyclooxygénase aboutit à la formation des hydroperoxydes spécifiques. Ainsi, l'activité des lipoxygénases est souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Cette activité lipoxygénasique est surtout présente au niveau de la peau et des branchies du poisson (German et al., 1985). Les substrats privilégiés de la lipoxygénase de poisson sont les AGPI comme l'acide arachidonique, l'EPA et le DHA. Les lipoxygénases du poisson sont inactivées par la cuisson et à des températures supérieures à 60°C (Josephson et Lindsay, 1986). L'oxydation enzymatique se produit aux températures les plus

basses, même à l'état congelé, mais cette activité reprenne et s'accroît une fois le poisson est décongelé même à des températures de 0°C à 4°C (Frankel, 1998).

2.2.4.2.2. Les initiateurs de l'oxydation des lipides et les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides

Les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides durant la conservation et la transformation des poissons sont : la pression partielle en oxygène, les ions métalliques, les enzymes, la température, le pH et l'activité de l'eau (Hsieh et Kinsella, 1989 ; Hultin, 1994 ; Frankel, 1998).

La vitesse d'oxydation est sous l'influence de la concentration d'oxygène (pression partielle en oxygène) dans l'espace environnant du poisson et dans le poisson lui-même. Cette concentration en oxygène intervient au niveau de la nature des produits secondaires formés par décomposition des hydroperoxydes. Elle a donc un effet à la fois sur la durée de conservation du poisson et la nature des odeurs perçues quand le poisson est oxydé (Eymard, 2003).

Les ions métalliques jouent un rôle important durant la première étape de l'auto-oxydation des lipides du poisson. Le niveau élevé de l'oxydation lipidique présent n'est pas directement due à la proportion importante de lipides mais dépend plutôt de sa forte concentration en fer (Love, 1980). Au sein des tissus biologiques tels que le muscle du poisson, les principaux métaux de transition présents sont le fer et le cuivre. Ces derniers déclenchent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques. Les voies non enzymatiques interviennent en présence d'agents réducteurs tels que l'ascorbate, les superoxydes et la cystéine (Kanner et al., 1987).

La voie d'initiation de l'oxydation des lipides au niveau musculaire est de nature enzymatique. Elle fait intervenir le fer, l'ADP, le NADH ou le NADPH. (Rhee, 1988). Les hydroperoxydes produits par les enzymes seraient décomposés, en présence des ions métalliques, pour former des composés volatils responsables des mauvaises odeurs. La première étape de l'oxydation lipidique par les métaux peut se faire par transfert d'électron ou par formation de complexe de transition ou de complexe avec le peroxyde d'hydrogène qui déclenchent l'auto-oxydation (Frankel, 1998).

Aux températures élevées, l'oxydation des lipides est rapide. Une élévation de température favorise la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires. Aux températures de l'ordre de 70°C, il y a dénaturation des protéines, notamment de la myoglobine qui rend le fer directement disponible pour initier l'oxydation et favoriser la décomposition des

hydroperoxydes, en présence d'agents réducteurs (Khayat et Schwall, 1983). Au contraire, la vitesse d'oxydation des lipides et des pigments héminiques est notablement réduite à faibles températures. La congélation est considérée comme un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits (Genot, 2000). Pour arrêter complètement l'oxydation lors du stockage, il est nécessaire d'atteindre des températures de -40°C , car la formation d'hydroperoxydes reste possible à une température de -15°C (Ke et al., 1977).

L'oxydation des lipides est sous l'influence de pH de la chair de poisson par le biais de plusieurs mécanismes. Premièrement, un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation, en particulier quand les pro-oxydants (pigments héminiques, enzymes, ions métalliques) sont présents. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité et le potentiel redox des ions métalliques, et donc leur réactivité vis à vis des molécules oxydables sont élevés, en particulier dans l'initiation de la réaction. Un pH bas favorise la dénaturation des protéines héminiques dans le tissu musculaire, ainsi que la libération d'un agent pro-oxydant qui est le fer (Genot et al., 2003).

L'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. Par définition, l' a_w est le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau d'un produit sur la pression partielle de vapeur d'eau saturante exercée par l'eau pure à la même température.

L'eau permet la mobilisation des substances pro-oxydantes ou antioxydantes, et interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation. En général, en présence d'ions métalliques, une a_w voisine de 0,3 correspond aux vitesses d'autoxydation les plus faibles. Par contre, une a_w comprise entre 0,6 et 0,8 correspond aux vitesses d'oxydation les plus grandes. Les réactions d'oxydation initiées par des activités enzymatiques sont fortement ralenties quand l'activité de l'eau est inférieure à 0,7-0,8 (Frankel, 1998).

2.2.4.2.3. Produits formés au cours de l'oxydation des lipides

Lors du développement des réactions d'oxydation des lipides, les produits primaires et secondaires de l'oxydation vont successivement apparaître.

- Produits primaires :

L'oxydation des lipides de poisson conduit à la formation de produits primaires : radicaux libres, diènes conjugués et hydroperoxydes.

Au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction d'oxydation des lipides, les radicaux libres sont formés. Ces composés sont très instables, très réactifs et cytotoxiques

susceptibles d'induire des altérations des molécules d'ADN et des protéines. Les diènes conjugués sont formés par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoyle des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes sont les précurseurs des composés volatils, ils sont sans odeur spécifique et se décomposent rapidement (Kanazawa et al., 2000).

- Produits secondaires :

Les produits primaires sont très instables et rapidement décomposés en produits secondaires souvent volatils. Ces composés sont responsables des odeurs des lipides oxydés des poissons (odeur d'herbe coupée), caractéristiques des composés carbonylés (aldéhydes, cétones, alcools) issus de la dégradation des acides gras polyinsaturés probablement par voie enzymatique (Josephson et al., 1984).

- Produits d'interaction entre les produits d'altération des lipides et les protéines :

Les interactions des hydroperoxydes et des produits secondaires, issus de l'oxydation des lipides, avec les protéines et les acides aminés ont un impact important sur la dégradation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Pokorny, 1977). La nature de ces interactions dépend de la teneur en hydroperoxydes ou en produits secondaires c'est à dire du stade de l'oxydation des lipides (Ladikos et Lougovois, 1990). Cette interaction des hydroperoxydes et des produits secondaires avec les protéines conduit à la formation de différents composés possédant des propriétés fluorescentes tels que les imines, les bases de Schiff, etc. (Gardner, 1979).

2.3. Facteurs influençant la qualité et la durée de conservation du poisson réfrigéré

2.3.1. Effet de la température de conservation

Comme expliqué précédemment, les variations de température ont une plus grande influence sur les activités enzymatique et microbiologique dans la chair du poisson. Cependant, si la température est élevée, l'activité microbienne est relativement plus importante et est responsable de l'altération de la plupart des poissons frais. Quand ces produits sont conservés à basse température, leur durée de conservation est rallongée (Huss, 1999) (Tableau 2).

Tableau 2. Durée de conservation en jours et vitesse relative d'altération (VRA) de produits de la mer stockés à différentes températures.

	Durée de conservation (jours)		
	0°C	5°C	10°C
Pinces de crabe ^a	10,1	5,5	2,6
Saumon ^b	11,8	8,0	3,0
Dorade ^c	32,0	-	8,0
Cabillaud emballé ^d	14	6,0	3,0

a) Cann et al. (1985); b) Cann et al. (1984); c) Olley et Quarmby (1981); d) Cann et al. (1983)

Le délai avant le refroidissement est de première importance pour la conservation des poissons réfrigérés. Il a été constaté que si le poisson maigre à chair blanche entre en rigor mortis à des températures supérieures à 17°C, le tissu musculaire peut se déchirer du fait d'importantes contractions musculaires et de l'affaiblissement du tissu conjonctif. Les lamelles musculaires de la chair se détachent les unes des autres et ce "clivage" détruit l'apparence du produit. Le filetage du poisson devient alors difficile et la capacité de rétention d'eau du muscle décroît (Love, 1973).

2.3.2. Influence de l'hygiène pendant la manutention

La manutention hygiénique du poisson dès sa capture assure une bonne qualité et une longue conservation du produit. Huss et al. (1974) ont vérifié, par différentes pratiques d'hygiène, l'importance de l'hygiène pendant la manutention à bord. Ils ont comparé la qualité et la durée de conservation de poisson traité de façon entièrement aseptique, c'est à dire la manutention était presque aseptique avec du poisson glacé dans des caisses en plastique dépourvues de souillures et contenant de la glace propre, avec du poisson traité sans précautions particulières, c'est-à-dire la glace était dans de vieilles caisses sales en bois. Ils ont trouvé une différence importante de contamination bactérienne au cours de la seconde semaine de conservation. Cette activité bactérienne n'acquiert une certaine importance que seulement dans les dernières étapes de la période de conservation. Le niveau de contamination est devenu important dans le lot dont la manutention était impropre par rapport au lot hygiéniquement stocké, ainsi que le temps de

conservation du poisson fortement contaminé a diminué de quelques jours. Il n'a cependant pas relevé une telle différence notable pendant la première semaine de stockage.

Le poisson réfrigéré est conservé sous glace dans des caisses empilées les unes sur les autres. Il a été suggéré que ces caisses devaient être conçues pour éviter le ruissellement de l'eau de fonte de la glace d'une caisse supérieure à une caisse inférieure. Ceci permettrait de diminuer la contamination bactérienne du poisson par l'eau de fusion qui serait chargée de bactéries (Huss, 1999).

2.3.3. Effet de l'éviscération

Il a été démontré que la qualité et la durée de conservation de nombreux poissons diminuent si ces derniers n'ont pas été éviscérés, car le système digestif du poisson renferme de nombreuses bactéries avec une production accrue d'enzymes digestives. Ces enzymes créent une autolyse viscérale prononcée post mortem qui peut causer l'éclatement du ventre avec une production d'une saveur désagréable spécialement dans la région abdominale. Par ailleurs, la cavité abdominale et les surfaces découvertes par l'éviscération sont susceptibles à l'oxydation et à la décoloration car elles sont exposées à l'air. De ce fait, il faut prendre en considération quelques facteurs tels que l'âge et l'espèce du poisson, son taux de lipides, les zones et les méthodes de pêche avant de décider s'il vaut mieux l'éviscérer ou non.

Les poissons gras de petite et de moyenne taille ne sont pas éviscérés immédiatement après leur capture pour éviter les risques de décoloration et d'accélération du rancissement, ainsi qu'ils sont pêchés en grandes quantités. Cependant, des problèmes tels que l'éclatement du ventre, peuvent se présenter avec du poisson non éviscérés durant les périodes de forte alimentation.

L'éviscération des espèces maigres est obligatoire en général car la qualité et la durée de conservation de ces espèces se dégradent si elles ne sont pas éviscérées. Il a été prouvé qu'un poisson non éviscéré subissait une perte importante de qualité avec une décoloration visible de la zone abdominale et un dégagement d'une forte odeur de chou (Huss et Ajenso, 1976).

2.3.4. Influence de l'espèce de poisson, de la manutention et des propriétés de la peau

La vitesse d'altération et la durée de conservation du poisson sont affectées par de nombreux paramètres tels que l'espèce, la manutention et les propriétés de la peau du poisson.

En général, les poissons les plus gros se conservent mieux que les plus petits, les poissons plats se dégradent plus lentement que les poissons ronds et les poissons maigres restent comestibles plus longtemps que les poissons gras en aérobiose; de même, les poissons osseux se gardent plus longtemps que les cartilagineux.

Une manutention brutale provoque des dommages physiques du poisson, ce qui permet un accès facile aux enzymes et aux bactéries entraînant ainsi une altération plus rapide.

La peau des poissons pélagiques gras est souvent très mince, les enzymes et les bactéries peuvent y pénétrer entraînant une altération rapide. Cependant, la peau épaisse des poissons plats, ainsi que la présence d'antibactériens, d'anticorps et d'enzymes bactériolytiques dans leur mucus peuvent contribuer à leur bonne conservation (Murray et Fletcher, 1976).

2.4. Evaluation de la qualité d'un poisson

Les méthodes utilisées pour évaluer la fraîcheur et la détérioration des poissons peuvent être réalisées par des méthodes sensorielles, instrumentales, chimiques ou encore bactériologiques. La plupart des méthodes chimiques, bactériologiques et instrumentales doivent être en accord avec l'évaluation sensorielle avant d'être utilisées en laboratoire (Olafsdottir et al., 1997).

2.4.1. Les méthodes sensorielles

L'analyse sensorielle est le moyen le plus utilisé par les services d'inspections et dans l'industrie des pêches pour évaluer la fraîcheur et la qualité des produits de la pêche. Elle constitue un outil de mesure immédiate, rapide et précis qui permet d'estimer systématiquement l'odeur, la saveur, l'aspect et la texture. Un poisson frais possède un aspect brillant, des couleurs vives, une peau pigmentée, des écailles brillantes, des yeux vifs et brillants, des branchies colorées et humides, une texture ferme et élastique, tendue sans déchirures et une odeur agréable. Ces caractéristiques varient selon les espèces, l'habitat (eau de mer, eau douce, eaux courantes ou stagnantes), le type de pêche et les manipulations (Regenstein, 1996).

En Europe, la méthode la plus utilisée pour évaluer les poissons crus sur des bases sensorielles est le tableau de cotation européen présenté dans la Directive européenne 2406/96. Quatre catégories de fraîcheur correspondent aux différents niveaux d'altération: E, A, B et C ; dont, la

catégorie E (extra) est considérée comme le niveau de qualité le plus élevé, et la catégorie C correspond au seuil au-dessous duquel le poisson est écarté de la consommation.

Aujourd'hui, la méthode QIM (Quality Index Method) est un nouveau système utilisé pour une évaluation, plus rapide et plus performante. Plusieurs tables de cotation QIM ont été développées pour différentes espèces. Cette méthode est basée sur les changements des caractéristiques sensorielles des poissons crus au niveau de l'odeur, de la texture, de l'aspect des yeux, de la peau et des branchies. Des notes de 0 à 1 ; 0 à 2 ; ou 0 à 3 points de démerite (ou index) sont attribuées à un échantillon en fonction des changements, la note 0 est attribuée au poisson très frais. Les notes recueillies sont additionnées pour donner une note sensorielle globale ou QI (Quality Index). Cette note est comparée à une courbe de calibration, ce qui permet d'estimer la fraîcheur en nombre de jours d'entreposage sous glace, ainsi que la durée de conservation restante avec une précision satisfaisante (Bremner et Hallett, 1985).

La formation du panel sensoriel (des juges pour l'évaluation sensorielle) est nécessaire. Un panel de laboratoire doit se composer de 6 à 10 membres et doit être formé et contrôlé de façon régulière.

L'équipement nécessaire à l'évaluation sensorielle comprend deux pièces bien ventilées et bien éclairées pour la préparation et la présentation des échantillons de poisson cru. Les échantillons ne devraient pas être inférieurs à 50 g par personne. Pour les échantillons cuits, la température interne de cuisson doit être 65°C. Le poisson peut être étuvé, cuit en sachet plastique ou dans une feuille d'aluminium en utilisant un four micro-onde ou un four à vapeur. Les échantillons doivent être codés avant d'être servis à chaud dans des récipients isolés (Howgate, 1994).

2.4.2. Les méthodes physiques

2.4.2.1. Analyse de la texture

L'analyse de la texture des poissons est très importante pour le contrôle de la qualité du poisson cru ou cuit. La chair du poisson peut devenir molle et pâteuse à la suite d'une dégradation autolytique ou à la suite d'un stockage congelé (Toyohara et al., 1990). La texture comprend les caractéristiques les plus communes telles que la fermeté, la tendreté, l'élasticité, la cohésion ou encore la jutosité ou l'exsudation. De nombreuses méthodes mécaniques destructives ou non destructives ont été utilisées pour mesurer la texture. Ces méthodes instrumentales s'avèrent indispensables et doivent être systématiquement validées par l'analyse sensorielle (Laroche, 1996). Les méthodes les plus utilisées mesurent la résistance au cisaillement et à la déformabilité

par compression de la chair du poisson ; l'échantillon de poisson est coupé avec précision et comprimé par un piston. Un module de déformation à partir de la courbe enregistrée est calculé ; cependant, ces résultats de telles mesures peuvent être difficiles à interpréter (Dunajski, 1980).

Botta (1991) a utilisé un petit pénétromètre portable qui mesure à la fois la fermeté et la résilience de façon rapide et non destructive. Chaque test dure seulement 2 à 3 secondes et les résultats semblent bien s'accorder avec les méthodes sensorielles de texture.

2.4.2.2. Le nez électronique

Le nez électronique (appelé FreshSense) mesure les composés volatils et indique l'altération de l'odeur dans les produits de la mer de façon rapide et non destructive. FreshSense a des capteurs électrochimiques de gaz, qui sont sensibles aux composés volatils. Différents nez électroniques ont été employés pour mesurer le degré de fraîcheur du poisson avec des capteurs de gaz à oxydes métalliques semi-conducteurs, des capteurs électrochimiques (CO, H₂O, NO, SO₂ et NH₃), un capteur de gaz au diméthylamine (DMA) semi-conducteur, etc. (Olafsdottir et al., 1997a ; Olafsdóttir et al., 1997b ; Haugen et al., 2006).

Tryggvadottir et Olaafsdottir (2000) ont étudié la fraîcheur de l'églefin et ont trouvé qu'il existe une bonne corrélation entre la réponse du capteur électronique (CO, H₂O, NO, SO₂ et NH₃) et la méthode QIM.

2.4.2.3. Spectroscopie de réflectance dans l'infrarouge proche

La spectroscopie de réflectance dans l'infrarouge proche est une méthode rapide, simple, non destructive et nécessite peu de formation pour les opérateurs (Nilsen et Esaiassen, 2005). Cette méthode détermine la teneur en matières grasses, en eaux et en protéines dans le poisson (Khodabux et al., 2007), la teneur en acides gras libres (AGL) dans l'huile de poisson (Cuzzolino et al. 2005) et la capacité de rétention d'eau dans le muscle de poisson décongelé (Bechmann et Jørgensen, 1998).

2.4.2.4. pH

La connaissance du pH de la chair du poisson peut montrer la diminution de la qualité de la chair durant le stockage (Greaser et Pearson, 1999). Le pH post mortem varie généralement de 5,5 à 7,1 suivant les espèces, la saison et d'autres facteurs (Haard, 2002). Un pH initial faible est un indicateur de stress au moment de l'abattage de beaucoup d'animaux (Morzel et Van De Vis,

2003 ; Özogul et al., 2005). Cette diminution de la valeur du pH est due à l'épuisement des réserves énergétiques, principalement le glycogène, avec la production de lactate. Un pH relativement faible peut entraîner une diminution de la rétention d'eau dans les myofibrilles, affectant ainsi la diffusion de lumière et l'apparence du poisson. Un pH faible favorise aussi l'oxydation des lipides (Haard, 2002).

Les mesures sont effectuées avec un pH-mètre, en plaçant les électrodes (verre-calomel) soit dans une suspension de chair de poisson dans de l'eau distillée, soit directement à l'intérieur de la chair.

2.4.3. Les méthodes microbiologiques

Les examens microbiologiques des produits de la pêche permettent de donner une idée sur la présence possible de microorganismes pathogènes et d'évaluer la qualité hygiénique de ces produits incluant la rupture de la chaîne de froid, l'hygiène au cours de la manutention et de la transformation.

La flore mésophile aérobie totale (FMAT) représente le nombre total de microorganismes capables de former des colonies visibles sur un milieu de culture comme le PCA (Plate Count Agar) à une température donnée. Cette flore n'est pas vraiment un bon indicateur de la qualité sensorielle ou de la durée de conservation du produit (Huss et al., 1974). Dans des perches du Nil conservées sous glace, le nombre de la flore totale était de 10^9 UFC/g pendant plusieurs jours avant que le poisson ne soit rejeté. Cependant, cette méthode peut donner une mesure comparative du degré général de contamination bactérienne et de l'hygiène mise en œuvre (Gram et al., 1989).

La gélose au fer (Iron Agar) est plus nutritive que la gélose PCA, elle donne des numérations nettement plus élevées et fournit aussi le dénombrement des bactéries produisant du sulfure d'hydrogène, lesquelles, dans certains produits de la pêche, sont responsables de l'altération. (Gram, 1990). Les examens microbiologiques traditionnels sont longs, complexes, coûteux et nécessitent des compétences pour leur exécution.

2.4.4. Les méthodes chimiques et biochimiques

Les méthodes chimiques et biochimiques pour l'évaluation de la qualité des produits de la pêche sont objectives, fiables et précises, depuis qu'elles écartent les opinions personnelles sur la qualité de ces produits. Cependant, ces méthodes doivent être en corrélation avec les évaluations

sensorielles de qualité et les composés chimiques à mesurer doivent augmenter ou diminuer avec le niveau d'altération microbienne ou d'autolyse (Huss, 1995).

2.4.4.1. ATP et ses produits de dégradation

Les taux d'ATP et des produits de dégradation ont été utilisés comme indicateurs de fraîcheur de certaines espèces de poisson (Özogul et al., 2005 ; Özogul et al., 2006).

Depuis qu'il a été démontré que les nucléotides adénosine sont presque convertis en IMP (inosine monophosphate) après 24 heures post mortem, une valeur K a été proposée par Karube et al. (1984), et qui exclue l'ATP, l'ADP et l'AMP. La valeur K comprend les produits intermédiaires de dégradation et varie suivant les espèces de poissons (Murata et Sakaguchi, 1986). Cependant, il a été montré avec certaines espèces que la valeur K augmentait rapidement puis restait constante même si la fraîcheur continuait de diminuer (Luong et al., 1991).

2.4.4.2. Azote Basique Volatil Total (ABVT)

Dans les produits de la pêche, le dosage de l'ABVT (Azote Basique Volatil Total) comprend la détermination de la triméthylamine (TMA), l'ammoniac, la diméthylamine (DMA) et d'autres composés azotés volatils basiques. Bien que ces indicateurs soient relativement simples à effectuer ; cependant, ils ne sont pas performantes sur toutes les espèces et ne reflètent pas le mode d'altération que ce soit bactérien ou autolytique. En outre, ils ne sont pas considérés fiables pour mesurer l'altération pendant les dix premiers jours de conservation, mais ils reflètent surtout les dernières étapes de l'altération (Relibein et Oehlenschlager, 1982).

Les analyses d'ABVT sont particulièrement utiles pour mesurer la qualité des crustacés (Vyncke, 1970), des céphalopodes et des poissons industriels destinés à la farine ou à l'ensilage (LeBlanc, et Gill, 1984).

2.4.4.3. Triméthylamine (TMA)

La TMA est considérée comme la principale cause de mauvaises odeurs dans les produits de la pêche (Olafsdottir et al. 1997a; Olafsdóttir et al. 1997b). La TMA peut être utilisée comme un indicateur de l'altération et son utilité dépend principalement de la période de l'année, du stade de l'altération et du type de stockage.

Les dosages de TMA peuvent être effectués plus rapidement que les analyses microbiologiques classiques, et donnent une image plus exacte du niveau d'altération (déterminé

organoleptiquement). Cependant, ils ne sont fiables que pour certaines espèces de poissons, et ne reflètent pas les stades précoces d'altération.

Il existe plusieurs méthodes analytiques pour mesurer la TMA, la DMA ou encore l'ABVT : la distillation à vapeur (Malle et Poumeyrol, 1989), la microdiffusion Conway et titration (Conway, 1947), la méthode colorimétrique, la photométrie (Zhi et al., 1995), la méthode HPLC (Malle et al., 1996), la méthode GC (Veciana-Nogues et al., 1996), la méthode d'électrophorèse capillaire (Timm et Jørgensen, 2002), la méthode de débit d'injection de diffusion de gaz, le biocapteur à l'aide de l'enzyme flavin-containing monooxygenase type 3 (Mitsubayashi et al., 2004), et le capteur semi conducteur basé sur le vert de bromocresol (Pacquit et al., 2006).

2.4.4.4. Amines biogènes

Il a été montré que la concentration d'amines biogènes est une méthode fiable de mesure de la qualité des produits de la pêche, selon les espèces examinées (Yamanaka et al., 1989 ; Rodríguez et al., 1999 ; Özogul et al., 2002).

La formation d'une large variété de composés aminés résulte de la dégradation microbienne durant un long stockage de poisson, et la concentration par production d'amines biogènes augmente avec la durée de stockage (Özogul et Özogul, 2006 ; Özogul et al., 2006). Les amines biogènes proviennent de la décarboxylation microbienne des acides aminés libres en réaction au pH acide dans le poisson et les crustacés (Rawles et al., 1996).

Les plus importantes amines biogènes produites après la décarboxylation de l'histidine, l'ornithine, la lysine et la tyrosine sont respectivement l'histamine, la putrescine, la cadaverine, et la tyramine.

La consommation de produits de la pêche contenant de fortes quantités d'amines biogènes peut avoir des effets toxicologiques, en particulier, chez les personnes sensibles (Bodmer et al., 1999). Parmi ces amines, l'histamine qui est potentiellement dangereuse, causant des intoxications histaminiques. En outre, la putrescine et la cadaverine sont rapportés pour augmenter la toxicité de l'histamine (Morrow et al., 1991).

Plusieurs techniques d'analyse sont utilisées pour déterminer la concentration en amines biogènes, dont la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) est la plus performante (méthode sensible, fiable et reproductible) : la chromatographie sur couche mince (Shalaby, 1995), la CLHP (Hwang et al., 1997), la GC (Feier et Goetsch, 1993), l'électrophorèse capillaire (Arce et al., 1997), et l'utilisation de biocapteurs (Poli et al., 2000).

La diminution de la qualité du poisson durant sa conservation constitue un enjeu primordial pour les acteurs de la filière pour améliorer le développement économique et assurer la sécurité alimentaire. La qualité d'un poisson prend en compte différents facteurs qui sont en relation les uns avec les autres. Ainsi, la caractérisation la plus pertinente de la qualité des produits de la mer doit intégrer l'ensemble de ces facteurs. Ces facteurs sont d'ordre microbiologique (contamination et prolifération des microorganismes), biochimique (oxydation et auto-oxydation des lipides par exemple), environnemental, etc. Les travaux antérieurs réalisés montrent que, maîtriser l'ensemble de ces facteurs est impossible en milieu marin.

Chapitre 3

La conservation du poisson

3.1. Les techniques de conservation du poisson

L'action des microorganismes de contamination responsables de la dégradation des poissons, ainsi que les réactions chimiques et enzymatiques d'autodestruction ne se réalisent que dans des conditions spécifiques. Un changement de ces conditions peut permettre de ralentir, voire arrêter cette dégradation.

3.1.1. Les agents physiques

Le premier agent physique utilisé pour la conservation est le froid (réfrigération, surgélation et congélation). La réfrigération (0-5 °C) est le mode de conservation le plus utilisé car elle permet de ralentir la croissance des bactéries et de prolonger la durée de vie des produits de pêche ; néanmoins, des changements mineurs dans les conditions physico-chimiques ont de grands effets sur la croissance bactérienne (Korkeala et al., 1989). Toutefois, la réfrigération n'élimine pas une contamination microbienne. Elle permet de limiter la croissance, seules les bactéries psychrotrophes poursuivent leurs activités réduites sur des produits frais stockés à des températures en dessous de 7°C (Ashie et al., 1996). Le poisson frais doit être conservé, après capture, à des températures comprises entre -2 et 0°C pour éviter qu'il ne se détériore (Boyd et al., 1992). Dans les cas de congélation et de surgélation (≤ -18 °C), les bactéries et les microorganismes sont en état de vie ralentie et ne peuvent pas se multiplier et envahir la chair du poisson, car l'eau, sous forme de cristaux de glace, n'est plus disponible pour les bactéries, ce qui stoppe leur développement. Pendant une congélation prolongée, la seule altération chimique observée est l'autoxydation des lipides (phénomène inhibé au-dessous de -30 °C). En revanche, ce type de conservation entraîne une diminution des structures par éclatements cellulaires, ce qui diminue les qualités texturales des produits après décongélation (Doyle et al., 1997).

L'application de hautes températures représente le traitement le plus efficace contre les microorganismes et les enzymes et intervenir lors de la mise en conserve des poissons (technique d'appertisation). En outre, l'effet du chauffage va conduire à une dénaturation irréversible des protéines qui inhibe le développement des microorganismes. Cependant, plus un poisson est altéré, plus les produits de dégradation augmentent au cours de la stérilisation ; ceci souligne

l'importance de la qualité microbiologique et physicochimique initiale du produit (Sainclivier, 1983).

Le séchage a pour but le dessèchement partiel du poisson en vue d'augmenter son temps de conservation. Par la perte d'eau dans les tissus où l'activité de l'eau est basse, il inhibe les activités enzymatiques et diminue voire arrête l'activité des microorganismes, excepté quelques moisissures xérophiles et des bactéries halophiles (Gram et Huss, 1996). La teneur finale en eau des poissons secs est généralement de 25 à 32% (GRET et CTA, 1993). Cette technique peut se faire à l'air (Fellows, 1997) ou par utilisation d'équipements qui permettent le contrôle des paramètres de séchage (Gérard, 1989).

Le fumage est un autre agent physique possible qui combine les effets du salage, du séchage, du chauffage et de la fumée (Blight et al., 1988). La fumée contient une grande variété de constituants organiques tels que les composés phénoliques et carbonyliques, et les acides organiques. La fumée compte plus de deux cents constituants dont de l'hydrogène, du monoxyde de carbone, du dioxyde de carbone, des acides organiques, des composés phénoliques et carbonyliques, etc. (Horner, 1997). Ces composés vont jouer un rôle sur la coloration, l'arôme et la texture ; ils possèdent également une action chimique et antibactérienne (Leroi et al., 2000). Les phénols ont une action importante comme antioxydant des lipides, cela est d'autant plus important que le poisson est gras. L'effet bactériostatique et bactéricide de la fumée est basé sur la diminution de l'activité de l'eau par une déshydratation partielle ainsi que par la formation d'une croûte composée de matière grasse et de composés de la fumée formant une barrière physique contre une post-contamination (GRET et CTA, 1993).

L'ionisation (anciennement irradiation) est le plus récent agent physique utilisé pour conserver les aliments. C'est une technique onéreuse qui consiste à exposer les produits à l'action directe de certains rayons générés par une source radioactive telle que le Cobalt60, ou le Cesium137. Cette technique accroît la durée de conservation par une destruction des bactéries pathogènes et une réduction de la flore d'altération. En outre, elle provoque des perturbations des systèmes enzymatiques, des altérations des molécules d'ADN, des modifications de la perméabilité cellulaire. Toutefois, les doses d'ionisation généralement appliquées aux denrées alimentaires, ne suffisent pas à bloquer et à supprimer l'activité de leurs systèmes enzymatiques. Cependant, cette technologie n'est autorisée que dans quelques pays de l'Union européenne, et est très rare dans les pays en voie de développement (Kodo, 1990).

3.1.2. Les agents conservateurs

Dans l'alimentation, les conservateurs officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation et les plus utilisés sont les antioxydants synthétiques (BHT : l'hydroxytoluène butylé, BHA : hydroxyanisole butylé), l'hydroquinone de butyle tertiaire (TBHQ) et le gallate de propyle (PG) et quelques composés naturels tels que les composés phénoliques, le tocophérol, l'acide ascorbique et le Béta-carotène. Cependant, certains antioxydants synthétiques ont été jugés comme sources de danger d'après quelques études toxicologiques (Evans et al., 1992).

Dans la littérature, des milliers de publications ont pour objet la recherche de nouveaux antioxydants naturels qui peuvent être utilisés dans la conservation des aliments (Pietta, 2000 ; Moure et al., 2001).

3.1.2.1. Les conservateurs chimiques

La directive 95/2/CE fixe les différents conservateurs autorisés dans les produits de la pêche.

Le salage est l'une des techniques de conservation du poisson les plus anciennes qui consiste à ajouter une quantité de sel qui assure une salinité du poisson soit à travers le phénomène de l'exsudation soit par la diffusion du sel dans la chair (Horner, 1997). L'action du sel (NaCl) consiste en une réduction de l'activité de l'eau, ce qui diminue la disponibilité de l'eau libre nécessaire aux réactions chimiques et enzymatiques d'altération (sauf lipase et ligase). En revanche, certaines bactéries (bactéries halophiles), levures et moisissures peuvent se développer et participer à l'altération (Zuggaramurdi, 1976). En outre, les poissons gras sont connus pour leur propriété à ne pas absorber assez rapidement le sel (OSU, 1993)

Les conservateurs acides constituent un autre facteur pour réduire l'activité des microorganismes dans divers aliments, y compris les produits à base de poisson. Dans les produits de poissons marinés, la préservation est réalisée par ajout d'acide benzoïque, d'acide sorbique, de sel, de vinaigre (acide acétique) et de sucre. Ces composés abaissent le pH en dessous de 5 et peuvent réduire l'activité des bactéries Gram négatif non acidophiles et/ou non halophiles et productrices de mauvaises odeurs putrides (Blood, 1975).

Parmi les antioxydants synthétiques qui sont autorisés dans certains aliments : le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT). Ces deux composés résistent bien à la chaleur ; néanmoins, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évaporent rapidement. Le tetra-butylhydroquinone (TBHQ) a l'inconvénient d'être moins soluble dans les graisses et le gallate propylé (PG) a l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais

l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée (Pibiri, 2005). Les antioxydants de synthèse sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car il existe de sérieux problèmes concernant l'utilisation et la toxicité de ces produits, tant au niveau de leur métabolisme que de leur accumulation dans les tissus de l'organisme humain (Lisu Wang et al., 2003).

3.1.2.2 . Les bio-conservateurs

Des souches de bactéries lactiques sélectionnées (ferments) ou des préparations de bactériocines présentent un intérêt potentiel d'application en conservation alimentaire par leur capacité à inhiber certaines bactéries pathogènes ou d'altération des poissons (Einarsson et Lauzon, 1995 ; Brillet et al., 2005). Les principales souches lactiques acidifiantes utilisées sont *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Pediococcus* spp. et *Lactococcus* spp. Le muscle du poisson ayant une teneur en glucides très faible, et pour améliorer l'activité antimicrobienne du ferment, certains procédés de fermentation font intervenir une source externe de carbone (Bourgeois et Larpent, 1996). La bactériocine la plus utilisée en tant qu'additif alimentaire est la nisine (E234). Les bactériocines des bactéries lactiques sont des molécules directement produites par synthèse ribosomique sous la forme de polypeptides ou de précurseurs de polypeptides. La bactérie lactique productrice synthétise une molécule qui l'immunise contre l'action de sa propre bactériocine. Des études ont montré que les bactériocines limitent la croissance de *L.monocytogenes* dans le saumon fumé (Brillet et al., 2004).

3.1.2.3. Facteurs de l'environnement

La compréhension de la contamination microbienne et d'autodestruction des produits de la pêche a permis de développer de nouvelles stratégies de conservation telles que l'utilisation d'emballages sous vide et d'emballages à atmosphère modifiée permettant de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière, de limiter les réactions d'oxydation, de protéger le produit contre la contamination et la détérioration de la couleur, et donc de prolonger la durée de vie des produits.

La conservation de filets de poissons marins sous emballage à CO₂ permet d'inhiber la croissance de certaines bactéries contaminantes telles que *Shewanella* et *Pseudomonas* et devrait en principe entraîner une extension remarquable de la durée de conservation. Toutefois du fait de

la présence de bactéries résistant au CO₂, comme *P. phosphoreum*, le produit se dégrade presque au même taux que les filets non emballés sous atmosphère à CO₂. Cette technique doit être associée à une inhibition ciblée de *P. phosphoreum* par congélation ou par addition d'épices qui réduit sa croissance, entraînant une augmentation de la durée de conservation (Mejlholm et Dalgaard, 2002).

3.1.2.4. Les conservateurs d'origine végétale

Chez les plantes, il existe des métabolites secondaires qui sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, les acides aminés et les composés phénoliques. Plusieurs composés actifs ont été isolés et évalués comme étant des conservateurs. Dans la majorité des cas, le composé actif est un composé phénolique (Cuendet, 1999).

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles et les fruits de tous les végétaux (Boizot et Charpentier., 2006).

Chez les plantes, les substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif, le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, les agents pathogènes et les infections fongiques et microbiennes (Moure et al., 2001).

Les composés phénoliques comportent au moins 8000 structures différentes (Bahorun, 1997). Les principales classes de composé phénoliques sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines ; où les flavonoïdes, qui représentent plus de la moitié des polyphénols et la classe la plus abondante et la plus étudiée de cette classification, comptent plus de 4000 composés découverts à ce jour (Tapiero et al., 2002).

L'utilisation des extraits de plantes, en particulier les composés phénoliques, est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour conserver les aliments, dont les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes sont très marquées (Heimeur et al., 2004). De plus, il a été démontré que les polyphénols végétaux sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicaux, en particulier les flavonoïdes (Bahorun, 1997). Cependant, il a été démontré in vitro que quelques flavonoïdes peuvent être mutagènes (Sahu et al., 1993).

3.2. Activités anti-oxydante et antimicrobienne des composés phénoliques de plantes

Les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques qui sont exploitées dans de nombreux domaines industriels et médicaux, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes : anti-oxydante, bactériostatique, fongistatique, insecticide, nématicide et herbicide (Fuhrman et al., 1995).

Dans les domaines agro-alimentaires, les composés phénoliques ou leurs composés actifs pourraient être employés comme agents antioxydants et agents de protection contre les champignons phyto-pathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. Ils possèdent des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

Les plantes les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. (El Kalamouni, 2010).

Dans ce chapitre, nous n'allons nous intéresser qu'à deux activités biologiques : l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne.

3.2.1. Effets antioxydants des composés phénoliques

3.2.1.1. Définitions

D'un point de vue général, « Un antioxydant est une substance qui, en faibles concentrations et en présence du substrat oxydable, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats matériels » (Halliwell, 1995). « "Food antioxydant" est spécialement désigné comme une substance qui, en faible quantité, est responsable du ralentissement de l'oxydation des composés facilement oxydables comme les acides gras (Frankel et Meyer, 2000).

Les antioxydants à usage alimentaire sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique et être sans effet sur les propriétés nutritionnelles et sensorielles du produit alimentaire. Ce type d'antioxydants permet le maintien de la qualité et l'augmentation de la durée de conservation du produit. En outre, l'antioxydant idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, non toxique, résistant aux processus technologiques, stable dans le produit fini et n'entraîner ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable (Pokorny et al., 2001).

3.2.1.2. Mécanismes d'action antioxydante

Les composés phénoliques sont des antioxydants puissants, deux modes principaux d'action de l'activité antioxydante ont été décrits :

- le piégeage direct des radicaux libres :

Les composés phénoliques sont susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van Acker et al., 1995). En effet, les composés phénoliques sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus pro-oxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Puppo, 1992).

- la chélation des ions métalliques (Fe^{3+} , Cu^{+}) :

Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques peut s'exercer par une activité chélatrice des ions métalliques tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Puppo, 1992 ; Van Acker et al., 1995).

3.2.2. Effets antimicrobiens des composés phénoliques

3.2.2.1. Mécanisme d'action antimicrobienne

Les effets antimicrobiens de différentes plantes sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les composés phénoliques sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe « GRAS »), ou approuvés comme additifs alimentaires par la "Food and Drug Administration".

Les composés phénoliques ont un spectre d'action très large puisqu'ils inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures, des levures et des virus (Jürgen et al., 2009). Ils agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les moisissures, ils inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines, alors qu'ils agissent sur la biomasse et la production des pseudomycéliums chez les levures (Sipailiene et al., 2006).

L'activité antibactérienne des composés phénoliques a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner

une idée claire et précise sur leur mode d'action. Burt (2004a) suggère que l'action des extraits phénoliques de plantes est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules. En outre, il a été démontré que l'action des composés phénoliques sur la multiplication microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie (Oussalah et al., 2006). En général, les bactéries Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries Gram positif parce que la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les composés phénoliques d'y adhérer (Cristiani et al., 2007).

3.2.2.2. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Plusieurs facteurs influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques ou leurs composants actifs tels que : l'effet de la matrice alimentaire, les propriétés intrinsèques de l'aliment (lipide/protéine/eau, le pH, le sel, la présence d'antioxydants, de conservateurs, d'autres additifs) et les propriétés extrinsèques (la température, l'emballage sous vide/gaz/air, les caractéristiques des microorganismes) (Tassou et al., 1995).

Plusieurs études ont noté l'effet des matrices alimentaires sur la résistance microbienne aux composés phénoliques. La disponibilité de substances nutritives dans les produits alimentaires permet aux bactéries de réparer les cellules endommagées plus rapidement. Généralement, la sensibilité des bactéries à l'action des composés phénoliques semble augmenter avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage et de la concentration en oxygène dans le milieu. L'hydrophobicité d'un composé phénolique augmente à pH bas, lui permettant de se dissoudre plus facilement dans les lipides membranaires de bactéries cibles (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Par ailleurs, la présence de graisse et/ou les protéines dans les aliments réduit la disponibilité des molécules actives, ces dernières se dissolvent dans la phase lipidique de l'aliment, il y aura relativement moins de ces molécules disponibles pour agir sur les bactéries. Par contre, les glucides des produits alimentaires ne protègent pas les bactéries de l'action des composés phénoliques autant que les lipides et les protéines (Burt, 2004b).

3.3. Activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de plantes sélectionnées

L'origan, le thym et les clous de girofle, appartenant aux *Labiatae*, sont d'autant des plantes aromatiques à extraits riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés sont utilisés comme agents de conservation des aliments, ils sont reconnus pour être non toxiques (Pauli, 2001). Plusieurs études ont noté les effets antioxydants et antimicrobiens des ces extraits sur les produits de la pêche tels que la morue charbonnière (Erkan et al., 2011), le loup de mer (Kostaki et al., 2009), le poulpe (Atrea et al., 2009), l'espadon (Kykkidou et al., 2009) et la truite arc-en-ciel (Erkan et al., 2011 ; Alçiçek, 2011 ; Frangos et al., 2010).

Les extraits phénoliques d'origan, du thym et de clous de girofle possèdent une forte activité antioxydante. L'effet de l'extrait phénolique de thym sur l'oxydation des lipides et d'autres paramètres de la qualité du maquereau congelé et stocké à -20 °C a été examiné sur une période de 11 mois. Il a été montré dans cette étude que le traitement par l'extrait de thym est efficace pour retarder l'oxydation des lipides (Erkan et Bilen, 2010).

Goulas et Kontominas (2007) ont étudié l'effet combiné de l'emballage sous atmosphère modifiée (40% CO₂/30% O₂/30% N₂) et de l'extrait phénolique d'origan sur la durée de vie des filets de la daurade (*Sparus aurata*) stockée sous réfrigération. Ils ont montré que l'effet antioxydant est d'autant plus marqué si la concentration de l'extrait d'origan est plus grande.

L'activité antimicrobienne des extraits d'origan, du thym et de clous de girofle a été attribuée à leurs composés phénoliques qui ont un effet inhibiteur contre un certain nombre de bactéries marines (*Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium*, *Photobacterium phosphoreum*, *Salmonella enteritidis*, etc.), moisissures et levures (Tajkarimi et al., 2010).

Les clous de girofle, l'origan et le thym ont été utilisés avec succès pour protéger les fruits de mer du risque de contamination de *Vibrio parahaemolyticus* (Yano et al., 2006).

Mejlholm et Dalgaard (2002) ont constaté que l'extrait d'origan a réduit la croissance de *Photobacterium phosphoreum* et a prolongé la durée de conservation des filets de morue conservés dans des emballages sous atmosphère modifiée.

3.4. L'extraction des composés phénoliques de plantes

L'extraction de molécules végétales s'inscrit entre une étape de préparation des matières végétales destinée à favoriser l'accessibilité des molécules du solide à extraire par le solvant et des étapes de séparation solide/liquide, puis de purification des extraits ainsi que du raffinat

solide. L'extraction solide/liquide de métabolites ou de principes actifs est souvent décrite comme une extraction par diffusion, elle permet de séparer les composés extractibles solubles d'une matrice solide, formée par les tissus végétaux, à l'aide d'une phase liquide, le solvant (Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003). La diffusion est un phénomène de transport irréversible qui se traduit par la migration des espèces chimiques des zones de forte concentration vers celles de faible concentration par un déplacement de constituants de la matrice végétale vers le solvant. Ce type d'extraction suppose alors la conservation de l'intégrité des membranes cellulaires et la non-dénaturation de la matrice végétale. La déstructuration de la matière végétale (traitement thermomécanique, broyage, etc.) et/ou l'élévation de la température, préconisées pour accélérer l'extraction, se traduisent alors par une modification de la matrice solide (déstructuration des membranes par dénaturation des protéines et des assemblages de complexes lipoprotéiques, rupture des parois, voire défibrage des structures pariétales lignocellulosiques) (Cacace et Mazza, 2003).

Les composés phénoliques sont des composés moyennement polaires et relativement solubles dans l'eau à cause de leur forme glycosylée de stockage. Cette solubilité est due à l'affinité de l'eau pour les groupements hydroxyles portés par le sucre, mais les formes aglycones y sont moins solubles à température ambiante (Lattanzio et al., 2006). Ainsi, l'extraction des composés phénoliques est souvent réalisée avec du méthanol, de l'éthanol ou de l'acétone (Saleem et al., 2002 ; Jerez et al., 2006), et les rendements en polyphénols et en composés antioxydants sont plus élevés dans ces solvants car leur polarité est inférieure à celle de l'eau (Jerez et al., 2006 ; Ko et al., 2010). Certains groupes de flavonoïdes, tels que les flavonols et les flavones, sous forme native de combinaisons hétérosidiques, ne sont généralement pas récupérés intacts dans ce type d'extraits, mais plutôt sous leur forme aglycone, c'est-à-dire hydrolysée (Hakkinen et Torronen, 2000). Le mélange méthanol/eau (70 : 30 ou 80 : 20, v/v) a aussi conduit à de bons rendements d'extraction des dérivés hydroxycinnamiques, flavones, flavanols et catéchines (Billot et al., 1978 ; Melin et al., 1979). L'éthanol est souvent utilisé pour l'extraction de composés phénoliques dans l'industrie agroalimentaire du fait de sa moindre toxicité (Franco et al., 2008). Le dioxyde de carbone supercritique est parmi les solvants verts atypiques utilisés pour l'extraction des polyphénols ; néanmoins, il est un excellent solvant des composés organiques apolaires (Reverchon et De Marco, 2006). La faible polarité peut être corrigée par l'ajout d'un agent modifiant la polarité du milieu d'extraction, comme dans le cas de l'éthanol, pour augmenter la solubilité des molécules organiques moyennement polaires (Palma et Taylor, 1999).

Les poissons présentent de fortes teneurs en acides gras polyinsaturés très sensibles aux réactions d'oxydation. Ces réactions, en particulier l'oxydation des lipides, induisent des dégradations des propriétés organoleptiques du produit au cours des procédés de conservation et de transformation.

Les travaux antérieurs réalisés montrent le rôle prépondérant des agents conservateurs dans les caractéristiques de la qualité physique et organoleptique de la chair. Par conséquent, il nous apparaît essentiel de tester l'effet des produits naturels tels que les extraits éthanoliques des plantes sur les produits de la mer conservés dans le contexte de l'amélioration de la qualité et de l'augmentation de leur durée de vie.

ÉTUDE EXPERIMENTALE

Problématique

Les petits pélagiques gras tels que l'anchois sont des produits très périssables, ils possèdent de fortes teneurs en lipides qui sont très sensibles aux réactions d'oxydation, en particulier, les lipides polyinsaturés. Au cours des procédés de conservation de ces espèces, des réactions d'autodestruction liées à l'activité des enzymes autolytiques libèrent dans la chair du poisson des molécules simples constituant des substrats favorisant la propagation des microorganismes notamment les bactéries.

Ce risque d'autodestruction et de contamination est d'autant plus élevé que les tendances actuelles du marché qui limitent substantiellement le recours à des techniques classiques telles que le salage, le fumage et les conservateurs chimiques en raison de leur impact négatif sur la santé humaine. Dans ce contexte, la conservation par des produits naturels, notamment l'utilisation d'extraits éthanoliques de plantes, est sans doute l'alternative la plus prometteuse pour assurer l'innocuité de ce type de produits et réduire l'auto-oxydation et l'incidence de bactéries d'altération et pathogènes.

Une amélioration des techniques de conservation par l'incorporation de ces extraits éthanoliques des plantes dans la glace pourrait permettre, d'une part de réduire les pertes post-captures et d'augmenter la salubrité des produits de la mer, et d'autre part de prévenir la formation ou d'éliminer les biofilms déjà adhérents sur les surfaces en contact direct avec le poisson. La présence des biofilms microbiens sur ces surfaces augmente le niveau de contamination initiale des produits de la mer, ce dernier est l'un des facteurs les plus importants affectant la durée de vie de conservation.

Pour mener à bien ce travail et afin de contrôler l'effet de la glace contenant des extraits de plantes sur la qualité des anchois méditerranéens et la formation des biofilms sur les surfaces inertes en contact avec le poisson, nous avons évalué dans une première partie l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer à bord des navires de pêche et dans la halle à marée du port de Zemmouri (W. de Boumerdes) et proposé un dispositif d'écouvillonnage des surfaces planes pour standardiser les techniques de prélèvements de surfaces. Ainsi, dans la deuxième partie, nous avons étudié l'effet de la glace préparée avec des extraits éthanoliques du thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation du biofilm sur le polyéthylène haute densité au cours de la conservation des anchois méditerranéens, ainsi que sur les paramètres de la qualité de cette espèce de poisson (Voir la figure 2 : le logigramme de l'étude expérimentale).

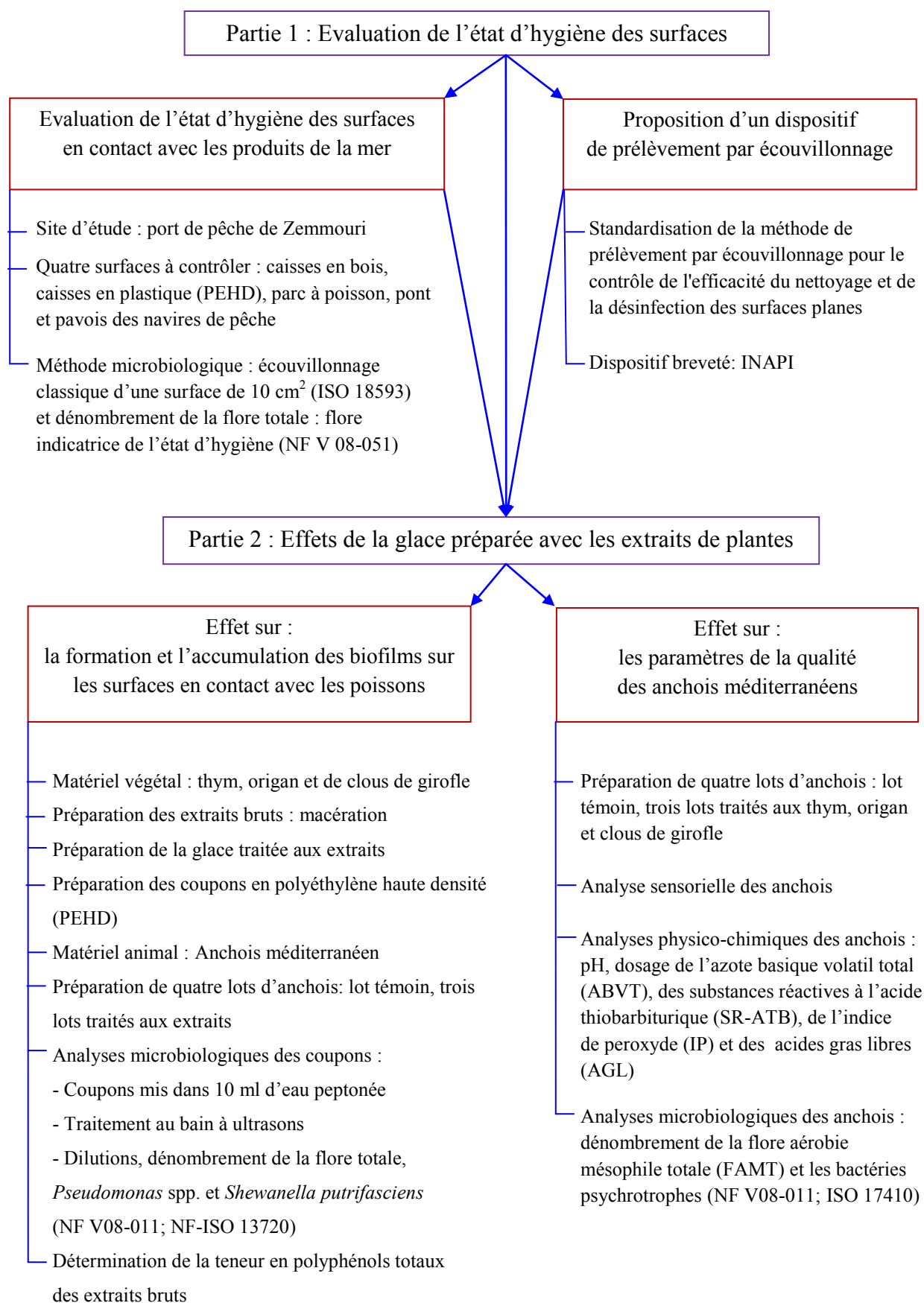


Figure 2: Logigramme présentant les différentes étapes de l'étude expérimentale

Partie 1

Evaluation de l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer et proposition d'un dispositif de prélèvement par écouvillonnage

Cette partie est organisée en deux chapitres, le premier consiste à évaluer l'efficacité du protocole de nettoyage-désinfection appliqué à bord des navires de pêche et dans la halle à marée du port de Zemmouri (W. de Boumerdes). Cette évaluation repose sur des méthodes classiques d'écouvillonnage et de dénombrement. Dans le second chapitre de cette partie, nous proposerons une méthodologie d'écouvillonnage qui repose notamment sur une invention basée sur l'utilisation d'un dispositif permettant de standardiser la technique de prélèvement par écouvillonnage.

1.1. Evaluation de l'état d'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer

1.1.1. Objectifs

L'adhésion de salissures et de microorganismes concerne toute surface en contact avec les produits de la mer. Afin de lutter contre les souillures organiques et microbiologiques des surfaces, des procédures de prévention, de nettoyage et de désinfection doivent être mises en place pour réduire la population microbienne des surfaces à un niveau tel que le risque de contamination des produits de la pêche soit acceptable (Reynisson et al., 2008).

L'objectif de ce chapitre consiste à mesurer l'intensité de la contamination par les microorganismes des surfaces en contact avec les produits de la mer, celle-ci constitue un paramètre nécessaire à l'évaluation de l'efficacité des techniques de nettoyage et de désinfection. Des analyses quantitatives de la flore totale ont été effectuées afin de comparer, d'une part, le nombre de microorganismes adhérant sur les quatre surfaces choisies après leur nettoyage-désinfection, et d'autre part le nombre de microorganismes adhérant sur le fond et la face interne de la paroi latérale de chaque surface testée. La détermination de la flore totale est un indicateur de l'efficacité de la désinfection (Griffith, 2005).

1.1.2. Matériel et méthodes

1.1.2.1. Site d'étude

L'étude a été réalisée au port de pêche de Zemmouri qui est situé à 48 Km à l'Est d'Alger et à 12 Km à l'Est du chef lieu de la wilaya de Boumerdes. Il a été construit en 1987 avec une capacité de 183 unités de pêche et une production qui a dépassé 16000 Tonnes/an en 2013. 95% de cette récolte concerne la fameuse sardine de Zemmouri (ANDI, 2013).

Divers matériaux sont susceptibles d'être utilisés pour fabriquer les caisses à poissons, les surfaces des cales, des parcs à poissons, des ponts et des pavois des navires de pêche. A bord de ces navires, ainsi que dans les halles à marée, le polyéthylène haute-densité (PEHD) et le bois (poli et laqué) sont utilisés préférentiellement. Au niveau du port de Zemmouri, le bois poli et laqué est souvent utilisé pour la fabrication des cales, des parcs à poissons, des ponts et des pavois. Quant aux caisses à poissons, ces dernières sont fabriquées à partir de bois et de PEHD.

Deux procédés de nettoyage des surfaces à bord des navires de pêche et dans la halle à marée de Zemmouri ont été mis en œuvre et appliqués en routine. La majorité des pêcheurs (> 98%) procèdent pour nettoyer les surfaces de travail et des équipements à un raclage pour éliminer les résidus puis un rinçage à l'eau sous moyenne pression (< 40 bars). Seulement 1 à 2% des pêcheurs appliquent les principales étapes du nettoyage et de la désinfection: prélavage, application d'un détergent chloré et rinçage final. Les opérations d'hygiène des surfaces de travail ne sont pas systématiques, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas réalisées après chaque utilisation des équipements et des surfaces de travail. Ce protocole appliqué consiste tout d'abord en un raclage pour éliminer les résidus puis un rinçage à l'eau sous moyenne pression (< 40 bars). Une étape de nettoyage-désinfection est ensuite réalisée et consiste à pulvériser une solution à base d'alcalin chloré sous forme de mousse sur les surfaces avec un temps de contact non déterminé. Un rinçage avec de l'eau à moyenne pression est ensuite effectué pour éliminer le produit de nettoyage.

L'alcalin chloré employé à bord des navires de pêche et dans la halle à marée est un produit communément utilisé pour le nettoyage et la désinfection des surfaces de travail dans de nombreuses industries agroalimentaires, du fait de ses propriétés détergente, bactéricide, sporicide, fongicide et virucide. Sa formulation combine 3 composés : 3.25% d'hypochlorite de sodium, 5-15% de tensioactifs non ioniques, et 5% de phosphates. La dilution a été effectuée dans de l'eau de réseau à température ambiante selon les concentrations préconisées par le fabricant.

1.1.2.2. Sites et méthode de prélèvement

Au cours de l'étude, quatre types de surfaces ont été échantillonnées à bord des navires de pêche et dans la halle à marée : le fond et la face interne de la paroi latérale des caisses en bois, des caisses en plastique alimentaire (PEHD) et du parc à poisson, ainsi que le pont et la face interne du pavois des navires de pêche. Le choix s'est porté sur ces surfaces car elles sont en contact direct avec les produits de la mer et présentent une source de leur contamination.

En général, avant de procéder à des analyses de surface pour contrôler l'efficacité des opérations de nettoyage-désinfection, il faut noter la propreté visuelle des surfaces à prélever car si la surface apparaît sale en de nombreux endroits, il n'est pas nécessaire de procéder à des analyses plus poussées puisque l'insuffisance des opérations de nettoyage est manifeste. En outre, les analyses microbiologiques ne doivent être effectuées que sur des surfaces nettoyées et désinfectées.

Les échantillons ont été prélevés par écouvillonnage sur les surfaces à contrôler après nettoyage et désinfection afin d'évaluer leur efficacité. Des prélèvements réguliers ont été réalisés de façon stérile sur une surface de 10 cm² délimitée par un gabarit stérile en acier inoxydable (Davidson, 2001).

Les échantillons ont été collectés à l'aide de chiffonnettes stériles en coton, humidifiées dans 1 ml d'eau physiologique. 30 g/L de polysorbate ou Tween 80 et 3 g/L de lécithine ont été ajoutés à la solution d'humidification comme neutralisants. Une pression constante a été appliquée pendant la totalité du prélèvement, le chiffonnage est effectué dans trois directions différentes : de gauche à droite, de haut en bas et en diagonale et le nombre de mouvements de l'écouvillon ont été bien définis. Une fois les prélèvements achevés, les échantillons prélevés ont été entreposés et réfrigérés à 4 °C. Ils sont ensuite transportés au laboratoire dans les 24 h qui suivent pour analyses. Le protocole de prélèvement et de transport des échantillons a été inspiré de la méthode décrite par la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004).

La méthode d'écouvillonnage utilisant des chiffonnettes s'avère dans la littérature donc plus fiable que celle utilisant des écouvillons en coton-tige ; ces derniers sont facilement saturables lors d'une présence d'un biofilm ou d'un nombre élevé de microorganismes ; c'est pourquoi nous avons choisi de les utiliser préférentiellement lors de l'évaluation de la concentration en microorganismes sur les surfaces.

L'ajout de Tween et de lécithine à la solution d'humidification permet la neutralisation de l'activité bactéricide du détergent chloré, permettant ainsi le dénombrement des bactéries cultivables restantes après le traitement de désinfection.

1.1.2.3. Préparation des échantillons et technique de dénombrement

Tout le matériel, les solutions et le milieu de culture sont préalablement stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes).

Chaque écouvillon est alors transféré dans un tube en verre contenant 10 ml d'eau physiologique, puis soumis à une homogénéisation pendant une minute à l'aide d'un vortex. Cette technique est inspirée de la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004).

Pour déterminer la quantité de microorganismes adsorbés sur un écouvillon, des dilutions en série au dixième sont réalisées dans de l'eau physiologique conformément à la norme ISO 6887-1 (Anonyme, 1999a) relatives aux règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. Puis, 0.1 ml de l'échantillon initial ainsi que de chacune des dilutions est ensemencé en surface (par étalement) sur le milieu gélosé PCA (Plate Count Agar) dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Le nombre d'Unités Formant Colonies (UFC) est évalué après 72 h d'incubation à 30 ± 2 °C en aérobiose (Norme AFNOR NF V 08-051) (Anonyme, 1999b). Les colonies sont dénombrées avec une limite de lisibilité de 300 UFC par boîte de Pétri. Les résultats des charges microbiennes sont exprimés en UFC/cm² selon la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004) puis transformés en log (UFC/cm²).

Pour calculer le nombre N de microorganismes dénombrés à 30°C par cm², nous avons utilisé la formule suivante selon la norme ISO 18593 (Anonyme, 2004):

$$N_s = (N \times F \times D) / A$$

N_s: nombre de colonies par centimètre carré de la surface contrôlée;

N: nombre des UFC par millilitre de la dilution retenue ;

F : volume en millilitres de la dilution mère ;

D: Inverse du taux de la dilution retenue ;

A: surface contrôlée en centimètre carré.

Afin de comparer les résultats obtenus de la flore totale avec les normes, nous avons adopté une limite d'acceptabilité (4 UFC/ cm², soit 0.6 Log₁₀ UFC/ cm²) utilisée dans une étude précédente réalisée dans des usines de transformation des produits de la mer (Martowitono, 2011).

1.1.2.4. Analyse statistique

Les résultats représentent les moyennes de six prélèvements par type de surface contrôlée.

Après avoir testé la normalité et l'égalité des variances (Ramousse et al., 2000), les valeurs sont transformées en $\log_{10}$ UFC/cm² pour permettre de comparer les moyennes entre groupes de petits nombres d'échantillons ($n < 30$). Les résultats sont traités par analyse de variance (Scherrer, 1984) suivie d'une comparaison des moyennes par les tests de Duncan et de Student.

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 2007 et le niveau statistique de significativité est fixé à 95% soit : $p < 0,05$.

1.1.3. Résultats et discussion

Les résultats de niveaux de contamination par la flore totale obtenus à partir des quatre surfaces échantillonnées sont indiqués dans le tableau n° 3 et représentés sur la figure 3.

Tableau 3: Concentrations moyennes et écarts-types ($\log$ UFC/cm²) en flore totale à 30 °C aux différents points de prélèvement de surface.

	Caisses en bois	Caisses en plastique alimentaire	Parc à poisson des navires de pêche	Pont et pavois des navires de pêche
Fond	6.74±0.27 ^a	6.24±1.13 ^a	4,67±0.28 ^a	5.42±0.31 ^a (Pont)
Face interne de la paroi latérale	7.01±0.14 ^a	5.67±1.06 ^a	6.96±0.08 ^b	5.23±0.36 ^a (Pavois)
Moyenne	6.88±0.24 ^{x,***}	5.95±1.03 ^{xy,***}	5.81±1.27 ^{y,***}	5.32±0.32 ^{y,***}

^{a, b} : Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes.

^{x, y} : Les données sur une même ligne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes.

*** : Différence très hautement significative par rapport à la limite d'acceptabilité (0.6 $\log_{10}$ UFC/ cm²).

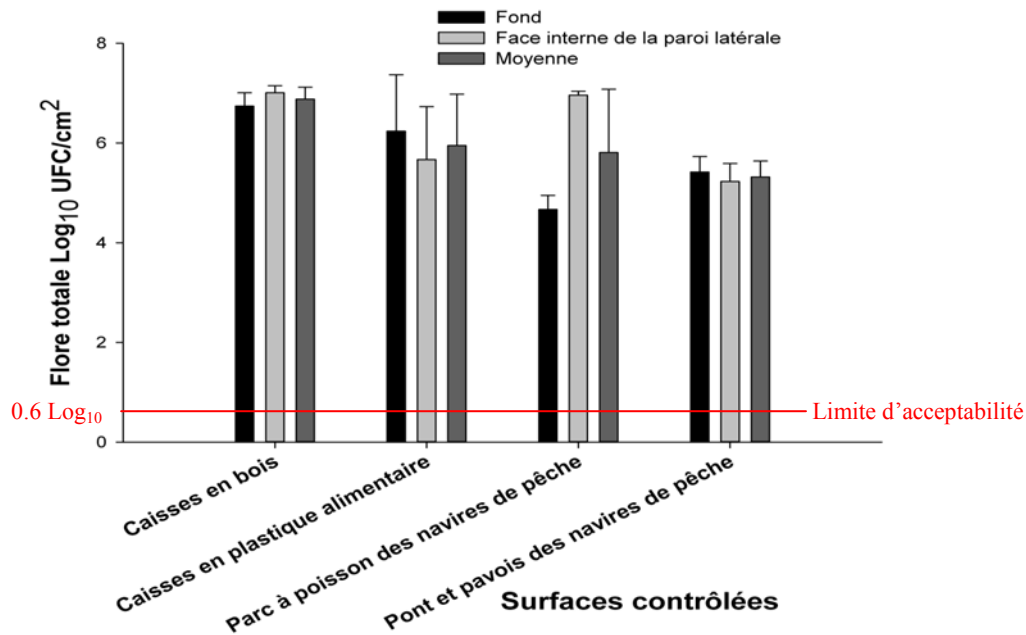


Figure 3: Concentrations en flore totale (en log UFC/cm²) aux différents points de prélèvement de surface.

La ligne horizontale représente la limite d'acceptabilité. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

Le contrôle de la contamination des quatre surfaces choisies a été réalisé par mesures de la flore totale à 30 °C.

D'après le tableau 3, il est remarqué que les concentrations en flore totale sont significativement supérieures ($p < 0.05$) à la limite d'acceptabilité sur l'ensemble des surfaces contrôlées (différence très hautement significative). De manière générale, nos résultats ont démontré que les opérations de nettoyage-désinfection utilisant le détergent chloré n'étaient pas efficaces aux concentrations préconisées par les fabricants.

Même si cette contamination élevée des surfaces peut être attribuée à l'accumulation des souillures organiques et microbiologiques sur les surfaces contrôlées à cause de l'application inadéquate et non systématique d'un protocole de nettoyage-désinfection, nous pouvons envisager la formation d'un biofilm sur les surfaces en contact avec les produits de la mer, qui n'a pas été affecté par l'utilisation d'un détergent chloré.

Très peu d'études ont été consacrées de manière spécifique aux biofilms qui se développent sur les surfaces en contact avec les produits de la mer telles que les cales, les caisses, les parcs à poissons et les équipements de transformation (Duong, 2005 ; Martowitono, 2011)). Pourtant, il

est connu de longue date que toutes les surfaces des environnements de fabrication de viandes sont colonisées par des microorganismes et notamment par des biofilms (Labadie, 2001).

Des travaux nombreux et récents ont montré que la résistance des biofilms aux désinfectants est très grande. Le chlore est pourtant apprécié pour son large spectre d'activité et est considéré comme un des biocides les plus actifs. Cependant, De Beer et al. (1994) ont mesuré la pénétration du chlore à l'intérieur d'un biofilm constitué de *P. aeruginosa* et de *Klebsiella pneumoniae*. Ils ont montré que la pénétration du chlore est lente et la vitesse de pénétration est proportionnelle à la concentration à l'extérieur du biofilm. D'après d'autres auteurs, ce phénomène indique que le processus de diffusion a bien lieu, mais que la matrice d'EPS réagit avec le chlore et le neutralise, empêchant sa pénétration dans les couches plus profondes du biofilm. Devant la faible activité bactéricide d'hypochlorite de sodium seul sur les biofilms, des formulations faisant intervenir plusieurs composants ont été développées. De Quieroz et al. (2007) ont par exemple décrit l'utilisation d'hypochlorite de sodium combiné au peroxyde d'hydrogène pour inactiver et éliminer les cellules de biofilms de *P. aeruginosa*.

Les analyses statistiques effectuées par type de surface ne révèlent pas de différence significative entre le niveau de contamination des surfaces des caisses en bois et celui des caisses en plastique. Il semblerait donc que ces caisses soient souillées à cause de l'application non systématique des procédures de nettoyage-désinfection après chaque utilisation provoquant une accumulation et un encrassement des salissures, ce qui les rend plus difficiles à éliminer. Le PEHD, comme décrit dans la littérature, est connu pour ses propriétés hygiéniques remarquables (surfaces lisse, facile à nettoyer et à désinfecter, résistante, non absorbante, etc.) contrairement au bois (surface poreuse, absorbante, fissurée et parfois friable). Nous pouvons donc conclure que la qualité des surfaces n'a aucunement influé sur l'efficacité du nettoyage-désinfection vis-à-vis de la flore totale à cause de l'application non systématique des protocoles d'hygiène. Dans ce cas, nous pouvons constater que l'exigence d'utiliser de matériaux d'emballage en matière plastique par l'arrêté interministériel du 28 avril 2010 (Anonyme, 2010) est sans importance si le protocole du nettoyage-désinfection adéquat n'est pas appliqué et la fréquence d'utilisation de ce protocole n'est pas respectée à cause de l'absence d'un contrôle régulier par les responsables de l'hygiène. Le même arrêté stipule que les caisses destinées aux produits de la pêche et de l'aquaculture doivent être nettoyées, lavées, séchées et entreposées dans un local séparé de l'aire de production après chaque utilisation. Ces caisses doivent être protégées de la poussière et de toute source de contamination.

Les niveaux de contamination résiduelle obtenus sont significativement supérieurs sur les surfaces des caisses en bois et en plastique par rapport aux surfaces du parc à poissons, du pavois et du pont du navire de pêche. Cette différence est sans doute à attribuer à la disponibilité en continu des molécules organiques et inorganiques (lipides, protéines, carbohydrates, sels, etc.), provenant des produits de la mer, sur les surfaces des caisses à poissons avec un temps de contact élevé (quelques jours à quelques semaines) par rapport aux autres surfaces, favorisant un développement très important des biofilms au cours de stockage de ces produits. Il a été clairement démontré que la concentration en nutriments du milieu environnant, ainsi que le temps de contact ont une influence sur l'adhésion microbienne (Donlan, 2002).

Par ailleurs, aucune différence significative n'apparaît entre la surface intérieure de la paroi latérale et le fond de chaque surface contrôlée, à l'exception du parc à poissons où la surface intérieure de la paroi latérale reste significativement plus contaminée après nettoyage-désinfection que le fond. Cela peut être attribué au nettoyage-désinfection du fond du parc à poissons qui semble donc dans l'ensemble maîtrisé, probablement en raison de la priorité accordée par les opérateurs à l'hygiène de ce site qui cherche toujours à éliminer les souillures visibles.

En résumé, cette étude a présenté l'avantage d'intégrer plusieurs paramètres pouvant être à l'origine des échecs du protocole de nettoyage et de désinfection des surfaces en contact avec les produits de la mer. Nous avons utilisé dans ce chapitre une méthode d'écouvillonnage classique pour le contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection, cette méthode présente beaucoup d'inconvénients. Pour cela, nous allons proposer dans le deuxième chapitre de cette partie un dispositif d'écouvillonnage qui puisse lever les contraintes de la méthode classique.

1.2. Proposition d'un dispositif d'écouvillonnage des surfaces planes

Cette proposition fait l'objet d'un brevet d'invention paru dans le journal de l'INAPI (N° de dépôt : 100563, le 15/09/2010 : Institut National Algérien de la Propriété Industrielle). Dans ce chapitre, nous présenterons une amélioration du contrôle de l'environnement de production avec un nouveau dispositif d'écouvillonnage innovant.

1.2.1. Objectifs

L'hygiène qui est un élément essentiel de la mise en œuvre de la production et la transformation des denrées alimentaires, doit intégrer un grand nombre de paramètres, parmi lesquels l'état d'entretien et de propreté du matériel et des surfaces de travail qui tiennent une place essentielle. A ce titre, une insuffisance ou une mauvaise application des procédés de nettoyage-désinfection peut aboutir à une persistance de microorganismes sur les surfaces risquant de conduire à l'altération et la contamination de denrées, et d'anéantir les efforts réalisés pour la production d'aliments de bonne qualité microbiologique (Labadie, 2001). Il apparaît, donc, nécessaire d'effectuer un contrôle de l'état hygiénique des surfaces de travail. L'objectif principal qui doit être visé lors du prélèvement de surface des échantillons est d'obtenir un échantillon qui présente une image fidèle de la surface choisie, afin d'apprécier objectivement l'état d'hygiène du site contrôlé. Ce contrôle est réalisé, habituellement, à l'aide de nombreuses méthodes d'évaluation de la contamination microbienne comme par exemple l'écouvillonnage, les empreintes par gélose, les ultrasons, le pétrifilm, les lames gélosées, etc. L'écouvillonnage est parmi les méthodes les plus utilisées (Jay et al., 2005).

La plupart des écouvillons se présentent sous forme de cotons-tiges, de chiffonnettes ou d'éponges. Par l'intermédiaire d'un gabarit qui délimite 10 ou 25 centimètres carrés (surfaces recommandées), le prélèvement se fait par frottement dix fois verticalement et dix fois horizontalement en appuyant fermement sur la surface tout en tournant l'écouvillon dans les deux sens, l'angle de prélèvement est de quarante cinq degrés. Après prélèvements, les écouvillons sont transférés en milieu d'enrichissement pour un contrôle microbiologique, ou soumis à un contrôle physicochimique par ATP-métrie (Holah, 2003).

L'écouvillonnage classique présente quelques inconvénients, la pression exercée sur la surface et le schéma de balayage ne peuvent pas être constants et varient d'un opérateur à l'autre, et même l'angle d'application ne peut être respecté et uniformisé.

L'invention a pour objet de réaliser un dispositif à usage unique qui fournit une nouvelle solution technique pour résoudre l'ensemble des problèmes précités en standardisant la méthode de prélèvement par écouvillonnage pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des surfaces planes.

Le dit dispositif permet, par l'intermédiaire d'un écouvillon, l'application d'une pression constante sur toute la surface à contrôler, et il délimite lui-même la surface recommandée (10 cm²) sans utilisation d'un gabarit qui doit être nettoyé et stérilisé après chaque prélèvement.

Par ailleurs, il crée un schéma de balayage constant, il est facile à manipuler et la technique peut être exercée par n'importe quel opérateur "expérimenté ou non".

1.2.2. Présentation de l'invention et son mode de réalisation

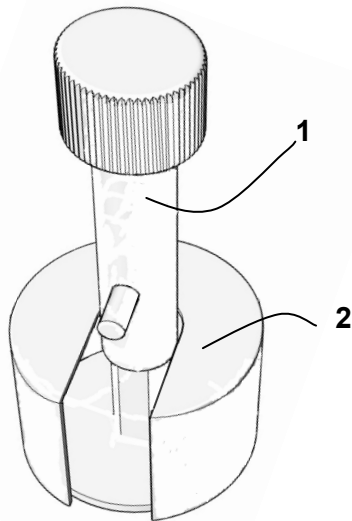


Figure 4: Vue générale en perspective du dispositif

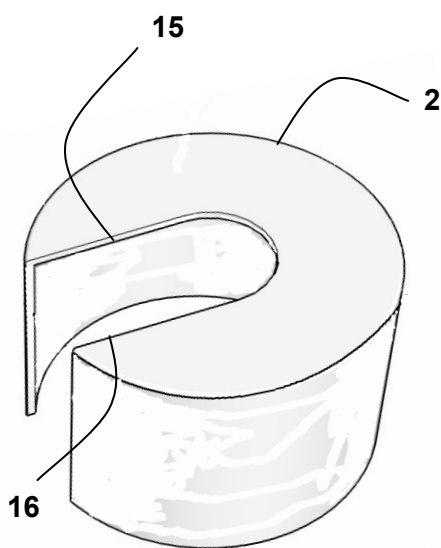


Figure 6: Vue en perspective de l'élément fixateur du dispositif

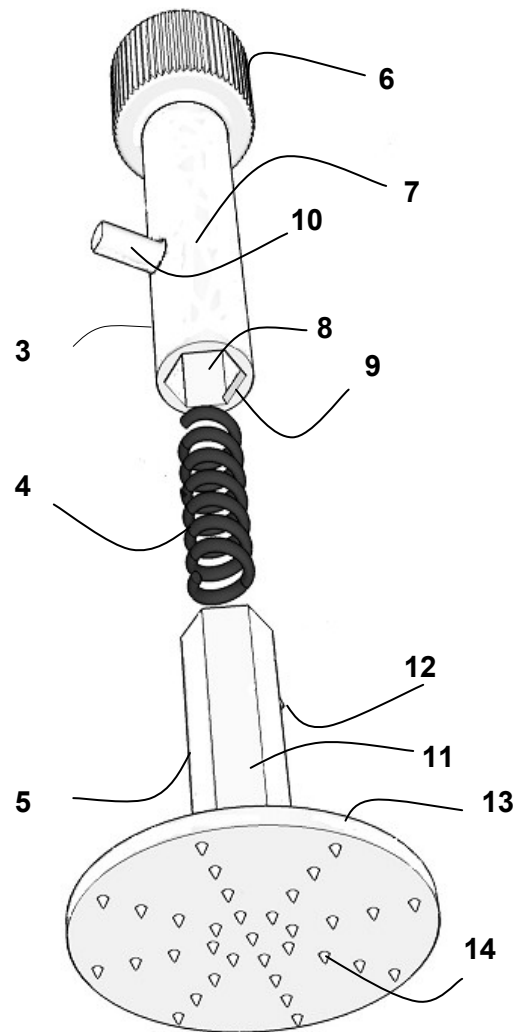


Figure 5: Vue éclatée en perspective de l'élément composé du dispositif

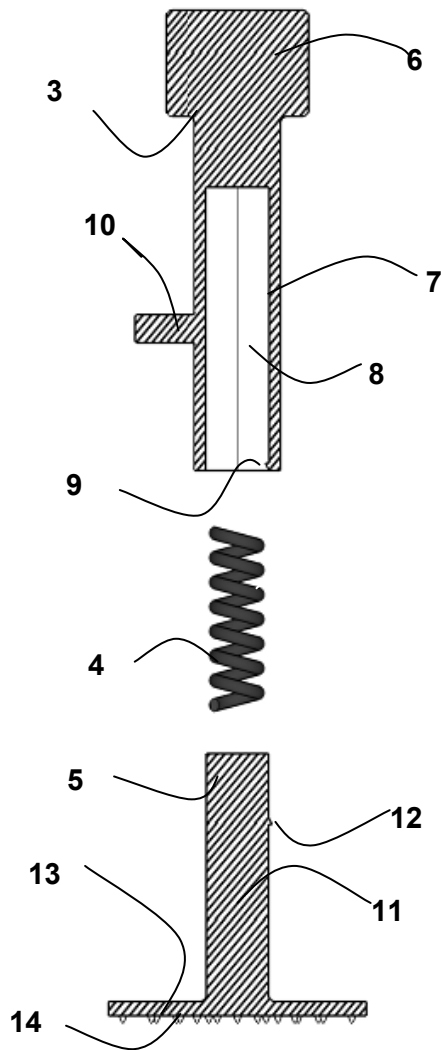


Figure 7: Vue schématique en coupe partielle de l'élément composé du dispositif

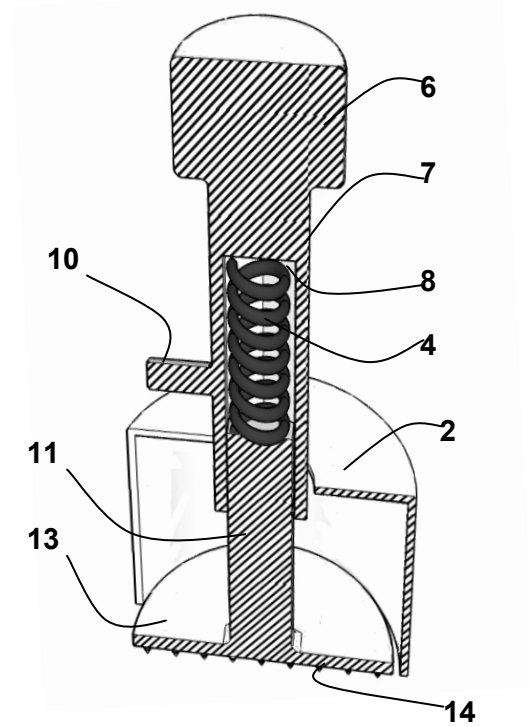


Figure 8 : Vue schématique en coupe partielle du dispositif

En référence à la figure 4, le dispositif comprend deux éléments séparés, à savoir un élément composé 1 et un élément fixateur 2.

L'élément composé 1, représenté par la figure 5, est formé de trois pièces (3, 4 et 5).

La pièce 3, représentée en détail sur les figures 5 et 7, est formée d'un élément cylindrique 7 dont il est ménagé à l'intérieur de ce dernier un espace hexagonal creux 8. La première extrémité de l'élément cylindrique 7 se prolonge pour former un moyen de préhension 6 qui présente une forme cylindrique avec une surface moletée sur la paroi latérale pour éviter tout glissement pendant les manipulations.

La deuxième extrémité de l'élément cylindrique 7 est pourvue d'un moyen d'arrêt 9, précisément à l'extrémité libre de l'espace creux 8. Une tige cylindrique 10 est reliée à la surface convexe de la paroi latérale de l'élément cylindrique 7.

La pièce 4 est un ressort hélicoïdal de compression qui peut être réalisé en plastique ou en métal. Comme il est montré sur les figures 5 et 7, la pièce 5 comporte une tige 11 qui a une forme d'un polyèdre hexagonal, elle-même comporte un moyen d'arrêt 12. Cette tige 11 est munie sur son extrémité d'un disque 13 qui présente à sa face distale une surface rugueuse en petits cônes 14. Le disque 13 peut avoir une surface de dix centimètres carrés de préférence.

L'élément fixateur 2, représenté seul sur la figure 6, prend la forme d'un cylindre creux ouvert par le bas possédant une fente qui s'étend le long de la paroi latérale jusqu'au centre de la base supérieure.

Les pièces 3, 5 et 2 sont avantageusement fabriquées en polyéthylène haute densité; mais, elles peuvent être également fabriquées en une autre matière plastique rigide.

Le montage des différentes pièces (3, 4 et 5) de l'élément composé 1 est particulièrement simple et s'effectue de la manière suivante :

Tout d'abord, on place le ressort 4 dans l'espace creux 8 de la pièce 3 ; ensuite, on introduit la tige 11 de la pièce 5 dans cet espace creux 8. L'ensemble c'est-à-dire l'élément composé 1 peut être manipulé d'un seul bloc sans se détacher par l'intermédiaire des deux moyens d'arrêts 9 et 12 (Figures 7 et 8).

Pour avoir un dispositif prêt à l'emploi, l'élément composé 1 ainsi que l'élément fixateur 2 doivent être conditionnés stérilement dans un emballage plastifié, par exemple, en polyéthylène basse densité.

Les écouvillons, pré-humidifiés et prêts à l'emploi utilisés pour le prélèvement par notre dispositif, peuvent être fabriqués en coton, éponge, cellulose, alginate ou en nylon floqué. La technologie appelée “flocage” pour produire des écouvillons de nylon floqué crée un revêtement mince comme de velours qui confère des performances de récupération de microorganismes très supérieures à celles d'écouvillons classiques fabriqués en coton, en Rayon ou en Dacron par exemple. Les écouvillons doivent avoir une forme de disque dont leur diamètre est le même que celui du disque 13 et leur épaisseur doit correspondre à une fois et demie la hauteur des petits cônes 14. Ils doivent être aussi conditionnés individuellement et stérilement dans des emballages, par exemple en polyéthylène basse densité.

1.2.3. Mode de fonctionnement

Si la surface plane à contrôler est horizontale, le fonctionnement du dispositif est le suivant (Figure 9) :

On pose l'écouvillon, après l'avoir enlevé de son emballage, sur la surface à contrôler, on place ensuite l'élément composé 1 sur l'écouvillon, sans pression, de façon à mettre la surface distale du disque 13 sur cet écouvillon. On fixe l'élément composé 1 par l'élément fixateur 2 comme il est représenté dans la figure 4. L'élément fixateur 2 doit être solidement immobilisé par la main afin de ne pas bouger pendant toute la période du prélèvement. On exerce ensuite une pression dirigée verticalement vers le bas par l'autre main sur l'élément composé 1 à partir de son moyen de préhension 6 tout en tournant légèrement jusqu'à l'accrochage de la pièce 10 de l'élément composé 1 sous le premier bord 15 de la fente de la base supérieure de l'élément fixateur 2 puis on cesse d'appuyer (Figure 9).

A partir du moyen de préhension 6, on tourne l'élément composé 1 presque un tour sans pression pendant un temps donné de cinq secondes de préférence et à la même vitesse, jusqu'à la sortie automatique exercée par le ressort 4, de la pièce 10 par le deuxième bord 16 de la fente de la base supérieure de l'élément fixateur 2. La présence des petits cônes 14 sur la surface distale du disque 13 permet une rotation de l'écouvillon sans glissement.

Enfin, on retire tout d'abord l'élément fixateur 2 puis l'élément composé 1 afin de récupérer l'écouvillon par une pince pour le transporter au laboratoire dans des conditions optimales de conservation à des fins d'analyses microbiologiques ou biochimiques.

Dans le cas où la surface plane à écouvillonner est verticale ou oblique, on pose l'écouvillon sur la face distale du disque 13 de l'élément composé 1, puis on les place sur la surface à contrôler sans pression, on fixe ensuite l'élément composé 1 par l'élément fixateur 2 et on suit les mêmes étapes expliquées ci-dessus.

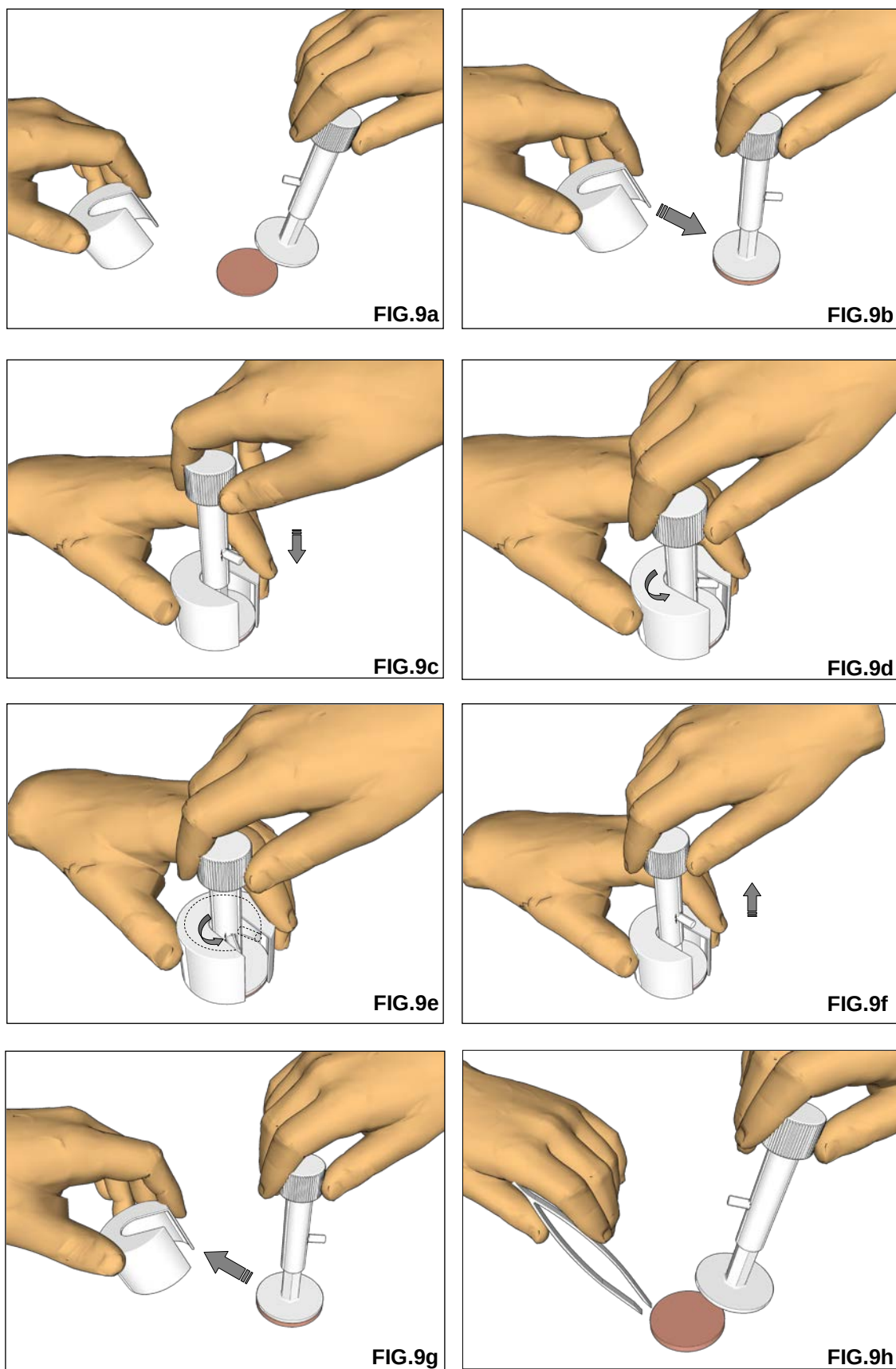


Figure 9 : Mode de fonctionnement du dispositif

1.2.4. Discussion

Les écouvillons sont utilisés à grande échelle dans les programmes de contrôle microbiologique des surfaces d'équipements et des plans de travail (Moore and Griffith, 2002a). La technique d'écouvillonnage, comme décrite dans la littérature, manque de fiabilité parce que ces techniques sont difficiles à standardiser, la répétabilité et la reproductibilité sont faibles (Moore et Griffith, 2002a et b ; Moore et al, 2001). Diverses méthodes sont recommandées par l'Union européenne. Une norme ISO (ISO 18593) (Anonyme, 2004) a également été publiée ; mais actuellement, il n'existe pas de méthode universellement satisfaisante.

Notre innovation a consisté à standardiser la technique de prélèvement par écouvillonnage. La technique classique d'écouvillonnage présente quelques inconvénients parmi lesquels la force appliquée pour le frottement et l'angle entre la surface contaminée et l'écouvillon ne peuvent pas être contrôlés ou maîtrisés (Gonzales, 1995).

Notre dispositif permet l'application d'une pression constante sur toute la surface à contrôler, et délimite dix centimètres carrés sans utilisation d'un gabarit. Par ailleurs, Il crée un schéma de balayage constant et il est facile à manipuler puisque n'importe quel opérateur "expérimenté ou non" peut l'utiliser avec précision. Cependant, notre dispositif présente un inconvénient : il ne peut s'appliquer que sur des surfaces planes ; donc, l'écouvillon classique (coton-tige) restant irremplaçable pour les prélèvements effectués dans des recoins ou à l'intérieur d'appareils.

Dans notre étude, nous avons utilisé une chiffonnette pour le prélèvement. Il a été montré lors d'une étude comparative que 79% des dénombrements obtenus à partir des prélèvements par la chiffonnette étaient supérieurs à ceux obtenus à partir de prélèvements à l'écouvillon classique. En effet, les chiffonnettes sont efficaces pour l'échantillonnage en raison de leur bonne préhension et leur grande capacité d'absorption (Deberghes et al., 1995).

Nous avons recommandé dans notre étude d'utiliser des chiffonnettes en nylon floqué.

Avant d'inventer le nylon floqué par la société COPAN (brevet international Copan), les écouvillons en coton étaient considérés comme un outil efficace de prélèvement. Moore et al. (2001) ont montré que sur des surfaces humides, l'écouvillon en coton permettait une meilleure récupération des bactéries comparé à l'écouvillon en alginate car le coton est principalement composé de cellulose, capable d'absorber une plus grande quantité de liquide résiduel sur les surfaces. Ces dernières années, une technologie appelée "flocage" pour produire des écouvillons de Nylon floqué s'est avérée révolutionnaire.

Il a été montré que les écouvillons classiques ont un faible taux de récupération de 20 % des contaminants des surfaces. L'écouvillon en Nylon floqué, en raison de sa capillarité hydraulique

exceptionnelle, présente une amélioration du pourcentage de récupération des micro-organismes, comprise entre 20 % et 60 %, par rapport aux écouvillons classiques et possède une capacité à restituer plus de 90 % des micro-organismes recueillis (Griffith and Moore, 2004).

Partie 2

Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation des biofilms sur les surfaces en contact avec les poissons et les paramètres de la qualité des anchois méditerranéens.

2.1. Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation des biofilms sur les surfaces en contact avec les poissons

2.1.1. Objectifs

La prévention du biofilm est une priorité dans l'industrie des produits de la mer, cette dernière devrait être encouragée à investir dans la recherche et le développement de nouvelles stratégies pour le contrôle des biofilms. Les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle ont suscité l'intérêt des chercheurs et des fabricants de produits alimentaires comme agents antimicrobiens et antioxydants naturels. Ils contiennent de fortes concentrations en composés phénoliques, y compris le carvacrol, le thymol et l'eugénol. Pour ces raisons, l'objectif de ce chapitre vise à déterminer si la glace contenant des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle peut empêcher la formation de biofilm microbien et inhiber la croissance des biofilms établis sur les coupons de PEHD (Poly Ethylène Haute Densité) pendant la conservation sous froid de l'anchois méditerranéen. Pour ce faire, le nombre de cellules cultivables dans le biofilm (Bactéries aérobies mésophiles et *Pseudomonas* spp.) a été mesuré. En outre, la teneur en composés phénoliques totaux des extraits testés et le rendement d'extraction sont évalués.

2.1.2. Matériel et méthodes

2.1.2.1. Matériel végétal et préparation des extraits bruts

Dans la présente étude, il s'agit de deux sortes de matières végétales : deux plantes aromatiques, l'origan sauvage (*Origanum glandulosum*) et le thym (*Thymus vulgaris*), et des bourgeons secs de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*).

Les bourgeons secs de clou de girofle ont été achetés à partir de commerces spécialisés. L'origan a été collecté dans les montagnes environnantes de la wilaya de Djelfa (Algérie), tandis que la récolte du thym de culture s'est effectuée en Automne (W. de Blida). Ces plantes ont été botaniquement authentifiées par un botaniste du Département d'Agronomie (Université de Blida).

Les parties aériennes du thym et d'origan sont séchées à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante, puis conservées dans des sacs en papier.

La première étape dans la préparation d'extraits végétaux est le broyage du matériel végétal. Sous cette forme broyée, la poudre présentera une plus grande surface de contact avec le solvant choisi, permettant ainsi d'améliorer le rendement de l'extraction. La méthode d'extraction de routine que nous avons employée est dite l'extraction éthanolique «classique» qui consiste à placer le matériel végétal sec dans un solvant d'extraction selon la méthode décrite par Ertürk et al. (2003) avec quelques modifications.

Chaque plante séchée et broyée est d'abord mise en contact avec de l'éthanol absolu (ratio poids/volume : 1/5) pendant 24 heures à température ambiante. Ensuite, le mélange est filtré sur papier Whatman n° 1 (Whatman International Ltd, Angleterre). Après filtration, le charbon actif a été ajouté au filtrat (10 g de charbon actif pour 50 g de matière végétale) puis éliminé immédiatement du filtrat en utilisant du papier de filtration Whatman n° 1. Les filtrats, de nouveau, sont évaporés sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor ; Max. 50°C). Les extraits sans solvant ont été pesés, puis traités par UV (30 W, 50 cm de distance d'irradiation) pendant 30 min pour réduire la microflore naturellement existée. Ensuite, ces extraits ont été redissous dans un petit volume d'éthanol absolu (pour dissoudre les composants liposolubles) et stockés dans des flacons dans l'obscurité à 4 °C jusqu'à leur utilisation.

Pour la détermination du rendement en pourcentage, cette formule est utilisée ($100 \times \text{poids de l'extrait éthanolique après évaporation du solvant} / \text{poids de la matière végétale utilisée pour l'extraction}$), trois répétitions ont été appliquées pour chaque extraction, et la moyenne fut considérée.

2.1.2.2. Préparation de la glace traitée

Les extraits du thym, de l'origan et de clous de girofle (400, 300 et 200 mg, respectivement) sont dissous dans 1 L d'eau distillée, puis placés dans des sacs scellés de polyéthylène et maintenus congelés (-18°C) jusqu'à leur utilisation. La glace du lot témoin a été préparée en utilisant uniquement de l'eau distillée, puis congelée et conservée avec les trois autres traitements de glace. Avant utilisation, toute la glace traitée est écrasée au marteau de fer pour obtenir de la glace en paillettes.

La concentration de chaque extrait de plantes a été choisie selon des essais préliminaires (100-1000 mg d'extrait de plante/L d'eau distillée) où la chair du poisson résultante a été analysée visuellement. La concentration maximale a été choisie pour chaque extrait, dont les caractères organoleptiques sont acceptables ; c'est-à-dire, selon l'aspect du poisson et la présence d'odeurs et de couleur des extraits transmis à la chair.

2.1.2.3. Préparation des coupons

Le polyéthylène haute densité (PEHD) était le matériau de surface choisi pour le développement du biofilm. Il est fréquemment utilisé dans la fabrication des surfaces en contact avec les produits de la mer sur les navires de pêche, la halle à marée et les caisses à poissons. Les coupons de PEHD (2x1x0.1 cm) ont été nettoyés avec de l'éthanol 70% et stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes avant leur utilisation.

2.1.2.4. Matériel animal et conditions d'entreposage

L'étude a porté sur l'anchois méditerranéen (*Engraulis encrasicolus*), entreposé sous glace dès la capture dans une glacière préalablement désinfectée et débarquée au port. Les anchois utilisés avaient un poids d'environ 10 g et une longueur moyenne de 9-11 cm.

Le temps écoulé entre la capture et l'arrivée au laboratoire est de deux jours. Immédiatement après l'arrivée au laboratoire, les anchois ont été étêtés, éviscérés et lavés à l'eau potable.

Les échantillons de poissons ont été répartis en quatre lots. Tout d'abord, les coupons ont été déposés séparément et de façon horizontale dans des caisses en polystyrène désinfectées et perforées pour permettre le drainage de l'eau résultant de la fonte des glaces. Ensuite, les échantillons de poissons ont été ajoutés aux caisses et recouverts d'une couche de chacune des glaces traitées, avec un rapport poisson/glace 2:1 (poids/poids). Un lot témoin a été recouvert de glace préparée avec de l'eau distillée, tandis que pour les trois autres lots, la glace est traitée par

0,04% (p/v), 0,03% (p/v) et 0,02% (p/v) d'extraits de thym, d'origan et des clous de girofle, respectivement. Au cours de l'entreposage, la glace fondue est remplacée régulièrement afin de respecter le ratio glace/poisson.

Les quatre lots sont placés dans une chambre froide ($+3\pm 1^{\circ}\text{C}$), les prélèvements de coupons sont effectués le 3, 6, 9 et le 12^{ème} jour de conservation. Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

2.1.2.5. Analyses microbiologiques

Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques sont présentés sous forme de coupons rectangulaires en PEHD. A chaque coupon sont ajoutés 10 ml d'eau peptonée préalablement préparée et stérilisée dans l'autoclave. Chaque échantillon est traité trois fois au bain à ultrasons pour une période de 30 secondes à une fréquence de 35 kHz suivi d'une agitation de 30 secondes à l'aide d'un homogénéisateur (vortex) afin de mettre en suspension les microorganismes qui y sont attachés. La suspension obtenue correspond à la dilution 10^0 .

Des dilutions multiples sont préparées jusqu'à la dilution 10^{-6} en utilisant le même diluant. Pour chaque dilution deux boîtes sont ensemencées en surface. Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) a été déterminé en utilisant le milieu de culture « plate count agar (PCA) selon la norme française NF V08-011 (Anonyme, 1998). Les boîtes sont par la suite incubées à 30°C pendant 72 heures. Le dénombrement des *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefascien* est effectué sur le milieu gélosé sélectif (CFC : milieu à la cétrimide, fucidine et céphaloridine) à 25°C pendant 48 heures selon la norme (NF-ISO 13720) (Anonyme, 1995). Ce milieu sélectif permet le développement des *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefascien* et quelques espèces d'entérobactéries. Ces dernières peuvent être repérées par le test d'oxydase.

Après dénombrement sur le milieu gélosé sélectif (CFC : milieu à la cétrimide, fucidine et céphaloridine), dix différentes colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur, etc.) ont été repiquées sur gélose nutritive afin de s'assurer de la pureté des cultures. Ensuite, les tests d'oxydase sont effectués sur les colonies isolées pour distinguer les bactéries *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens* des entérobactéries, et seulement les souches qui ont donné un résultat oxydase-positif ont été retenues. A partir de chaque culture pure et jeune (18 à 24 heures), une à quatre colonies sont prélevées et mises en suspension dans le milieu API Medium de façon à obtenir une opacité de 0,5 sur l'échelle Mac Farland, puis identifiées à l'aide de galerie Api 20 NE (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les profils proposés par le système API. Au total, 75 identifications ont été réalisées.

2.1.2.6. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La concentration des phénols totaux dans les extraits éthanoliques du thym, d'origan et des clous de girofle a été déterminée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, telle que décrite par Singleton et al. (1999), avec des modifications mineures. Pour une meilleure détermination du taux des phénols totaux de chaque extrait, trois répétitions ont été appliquées et l'écart type fut calculé.

La poudre d'acide gallique (0,5 g) a été dissoute dans 10 ml d'éthanol et diluée avec 100 ml d'eau ultra-pure pour avoir une concentration de 5 g/1000 ml. De même seront obtenues les concentrations suivantes d'acide gallique : 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L qui ont été préparées par dilutions successives avec de l'eau ultra-pure (solutions de calibrage).

La solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) a été préparée en dissolvant 200 g de carbonate de sodium anhydre dans 800 ml d'eau. Après chauffage, la solution a été refroidie, diluée jusqu'à 1000 ml de volume, filtrée si nécessaire, et utilisée après 24 heures.

50 mg de chaque extrait sont dissous dans 10 ml d'éthanol et 40 ml d'eau ultra-pure. 0.2 ml (1 g/L) de chaque extrait et de chaque solution de calibrage a été mélangé par agitation manuelle, pendant 1-8 min, avec 0,8 ml de réactif de Folin-Ciocalteu non dilué. Après 5 min, 3,6 ml de solution saturée de carbonate de sodium ont été ajoutés et la solution a été diluée à 12 ml avec de l'eau ultra-pure. Le mélange réactionnel a été maintenu dans l'obscurité pendant 2 heures à 20 °C, et son absorbance a été mesurée à 765 nm dans un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée (Figure 10). Les valeurs de concentration seront directement lues à partir des droites d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence d'acide gallique, de la forme : $\text{Abs} = a \times [\text{AG}] + b$. Il s'ensuit que la concentration de l'échantillon est exprimée en mg d'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait, « a » représente la pente, « b » l'ordonnée à l'origine de la droite étalon et « Abs » l'absorbance. La gamme d'acide gallique est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 1000 mg /L.

La concentration des composés phénoliques a été estimée à trois reprises en utilisant la courbe d'étalonnage tracée avec de l'acide gallique comme référence. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par g d'extraits.

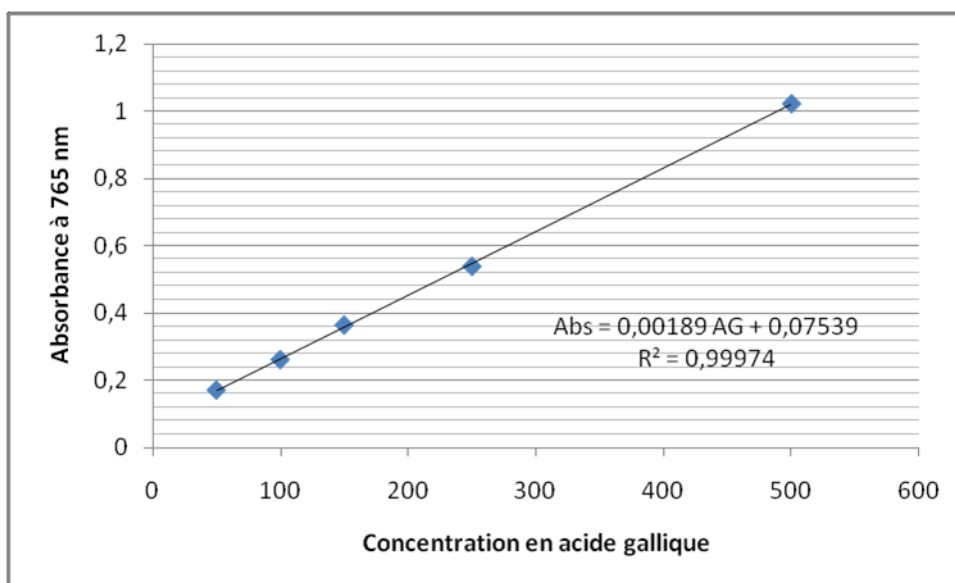


Figure 10: Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin Ciocalteu

2.1.2.7. Stabilité des glaces traitées

La vitesse de fusion a été déterminée pour chaque type de glace traitée selon le procédé de Feliciano et al. (2010) avec des modifications mineures. Les glaçons (dimensions: 1,5 x 1,5 x 2 cm ; volume: 1 L) ont été placés dans des bacs en plastique (20 x 35 cm). Ces derniers ont été laissés fondre à 25 °C. A intervalles de 30 min, le volume de liquide à partir de la glace fondante pour chaque traitement a été mesuré jusqu'à ce que la glace soit complètement fondue. Les tests ont été répétés trois fois.

2.1.2.8. Traitement statistique des données

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (SPSS 17.0 pour Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Toutes les analyses ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ Ecart-type. Après avoir testé la normalité et l'égalité des variances (Ramousse et al., 2000), les valeurs sont transformées en $\log_{10}$ UFC/cm² pour permettre de comparer les moyennes entre groupes de petits nombres d'échantillons ($n < 30$).

Les analyses de variance à un facteur (ANOVA) ont été réalisées sur l'ensemble des résultats obtenus afin de déterminer s'il existait des différences significatives entre les valeurs des différents échantillons. Lorsqu'une différence significative a été mise en évidence, les moyennes

ont été comparées à l'aide du test de comparaison multiple de moyenne de Duncan. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

2.1.3. Résultats et discussion

2.1.3.1. Dénombrement des bactéries aérobies mésophiles et *Pseudomonas* spp.

La mesure du nombre total de bactéries mésophiles est l'outil indispensable pour l'évaluation de la qualité et la détermination de la durée de vie des produits de la pêche et peut être considérée comme l'indicateur de l'état d'hygiène dans les industries de transformation du poisson, tandis que les espèces de *Pseudomonas* spp. sont les responsables majeurs de l'altération du poisson frais, conservé sous froid dans des conditions aérobies (Gram et Huss, 1996).

L'effet de la glace contenant des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation des communautés de biofilm sur les coupons de PEHD pendant la réfrigération de l'anchois est présenté dans le tableau 4.

Tableau 4: Inhibition de la formation et de l'accumulation de biofilm sur les surfaces de polyéthylène à haute densité, sous différentes conditions de glaçage des anchois.

		Durée de conservation (jours)			
		3	6	9	12
Flore aérobie mésophile totale (log UFC/coupon)	Lot témoin	3.14±0.32 ^a	5.78±0.13 ^a	6.17±0.22 ^a	7.03±0.35 ^a
	Thym	3.21±0.18 ^a	4.47±0.01 ^c	5.37±0.11 ^b	6.31±0.10 ^b
	Origan	3.17±0.76 ^a	5.32±0.18 ^b	6.21±0.48 ^a	7.37±0.08 ^a
	C. de girofle	2.68±0.25 ^a	4.35±0.14 ^c	5.53±0.36 ^b	6.18±0.29 ^b
Bactéries Psychrotrophes (log UFC/coupon)	Lot témoin	3.03±0.19 ^a	5.91±0.38 ^a	6.19±0.13 ^a	7.32±0.43 ^a
	Thym	2.42±0.49 ^a	4.25±0.15 ^c	5.31±0.08 ^c	6.55±0.27 ^b
	Origan	3.06±0.33 ^a	5.14±0.61 ^b	6.47±0.24 ^a	7.40±0.03 ^a
	C. de girofle	2.90±0.30 ^a	4.30±0.26 ^c	5.77±0.23 ^b	6.19±0.13 ^b

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart-type, n = 3. ^{a-c} Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Après 3 jours de conservation, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été remarquée par analyse de la variance entre le nombre de bactéries mésophiles et *Pseudomonas* spp. adhérentes dans des biofilms formés sur les coupons de PEHD dans les différentes conditions de glaçage des anchois (Tableau 4). Les extraits utilisés n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la fixation des cellules et ne sont pas donc efficaces pour prévenir la formation de biofilms sur les surfaces des coupons de PEHD. L'échec de l'inhibition de la fixation des cellules peut être attribué à plusieurs causes. La glace traitée prend quelques heures pour fondre et atteindre les coupons de PEHD ; durant cette période et en l'absence de l'exposition des coupons aux agents antimicrobiens des extraits, la formation du biofilm commence. D'autre part, la fixation microbienne à la surface en contact avec les aliments est un processus assez rapide (Van Houdt et Michiels, 2010). Les espèces de *Pseudomonas* spp. ont besoin d'une période de quatre heures pour s'attacher sur le plastique, dont 78 % des bactéries sont fixées de façon irréversible (Marshall, 1992). Après que les cellules soient adhérentes, la production de matrice extracellulaire commence, il convient de noter que cette matrice est considérée comme étant importante pour la relation entre cellules, lors de la colonisation de la surface (Hussain et al., 1992). Ainsi, le polyéthylène haute densité est un matériau favorable à la fixation des bactéries. Le degré d'hydrophobie de la surface a souvent été cité comme facteur déterminant très important de la fixation des cellules, ce qui suggère que l'adhérence est plus forte sur des surfaces hydrophobes (Brooks et Flint, 2008 ; Simões et al., 2010). Il a été démontré que les souches marines de *Pseudomonas* spp. se fixent plus rapidement sur les surfaces hydrophobes telles que le polyéthylène plutôt que sur les surfaces hydrophiles, telles que le métal (Fletcher et Loeb, 1979). Par ailleurs, lorsque la glace contenant les extraits utilisés est fondue, elle s'écoule d'abord à travers les poissons, et les concentrations atteignent des niveaux bas pendant quelques jours avant le contact avec les coupons de PEHD. Par conséquent, l'attachement initial (fixation cellule-surface) se produit rapidement et la croissance du biofilm commence en l'absence de l'exposition aux agents antimicrobiens.

Après 6 jours de conservation, l'utilisation de la glace préparée avec des extraits de plantes pour inhiber le développement et l'accumulation de biofilm (les bactéries mésophiles et les espèces de *Pseudomonas* spp.) sur les coupons de PEHD a été efficace avec l'ensemble des extraits montrant un nombre réduit de cellules de biofilm ($p < 0,05$) par rapport au lot témoin conservé sous glace préparée avec de l'eau distillée. Cependant, aucun des extraits utilisés n'est capable d'inhiber complètement l'adhésion cellulaire (Tableau 4). L'effet inhibiteur des extraits de plante est surtout dû à l'action de leurs principaux composés phénoliques, qui empêchent la croissance des

biofilms établis ; sans doute, les cellules viables ont été tuées avant la fixation des cellules au biofilm. Le thym, l'origan et les clous de girofle sont riches en composés phénoliques, dont le thymol, le carvacrol et l'eugénol qui sont probablement responsables de l'activité antibactérienne des extraits issus de ces plantes (Tajkarimi et al., 2010). Ces composés phénoliques interagissent avec la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques bactériennes provoquant une perte de l'intégrité et de la fuite des éléments cellulaires, tels que les ions, l'ATP et les acides nucléiques (Nostro et al., 2007).

Nous avons pu observer également que les biofilms âgés de six jours (anciens biofilms) sont difficiles à éradiquer complètement. L'une des raisons de la faible activité des extraits a été la nature du biofilm. Les biofilms dans la nature sont généralement multi-espèces ; plusieurs chercheurs ont suggéré que les espèces mixtes de biofilms sont souvent plus stables et plus résistants que les biofilms constitués d'une seule espèce (Brooks et Flint, 2008). En outre, les microorganismes sont beaucoup plus protégés des composants d'extraits lorsqu'ils se trouvent dans un biofilm (El abed et al., 2011). Les cellules de biofilm peuvent être 100-1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que leurs équivalents planctoniques (Simões, 2011). D'autre part, la matrice exopolymérique pourrait réduire la pénétration des agents antimicrobiens ou de provoquer leur inactivation (Stewart et Costerton, 2001). Stewart et Costerton (2001) ont signalé que la protection contre les agents antimicrobiens dans les biofilms est due à des changements physiologiques dans les cellules en raison du taux de croissance réduit et la production d'enzymes capables de dégrader les substances antimicrobiennes. L'efficacité réduite peut également être attribuée à l'utilisation d'extraits bruts qui contiennent des flavonoïdes sous forme glycosidique, où le sucre présent diminue l'efficacité contre certaines bactéries (Negi, 2012).

La glace préparée avec les extraits de thym et de clous de girofle a entraîné une réduction significative ($p < 0,05$) de cellules de biofilm (les bactéries mésophiles et les espèces de *Pseudomonas* spp.) par (1,3 à 1,7 log ufc/coupon) par rapport au lot témoin dans les 6 jours du développement du biofilm. Par ailleurs, la glace contenant l'extrait d'origan a causé une réduction de cellules de (0,5 à 0,8 log UFC/coupon) ($p < 0,05$), elle reste moins efficace que la glace contenant les extraits de thym et de clous de girofle (Tableau 4). La différence constatée entre les effets des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur la formation et l'accumulation de biofilm (Tableau 4) peut être attribuée essentiellement à leur composition chimique distincte. Les différences dans l'activité anti-biofilm existant entre les extraits de plantes sont liées à la concentration et la nature de leurs constituants chimiques, telles que la

composition, les groupes fonctionnels, la configuration structurale des composants et les interactions synergiques possibles (Chang et al., 2001).

Aux 9^{ème} et 12^{ème} jours de conservation, les glaces préparées avec des extraits de thym et de clous de girofle ont montré un effet réduit ($p < 0,05$) sur le développement et l'accumulation du biofilm préformé par rapport au biofilm du lot témoin, où une réduction de (0,4 à 0,9 log ufc/coupon) de cellules de biofilm (les bactéries mésophiles et les espèces de *Pseudomonas* spp.) a été obtenue (Tableau 4). En revanche, la glace contenant l'extrait d'origan n'a pas montré une activité anti-biofilm ($p > 0,05$). Les raisons possibles de l'augmentation de la résistance des cellules de biofilm à l'activité antibactérienne des extraits de plantes comprennent l'âge du biofilm et de la production de polysaccharides. De nombreuses études ont montré que la résistance des bactéries du biofilm aux agents antimicrobiens augmente avec l'âge du biofilm (Frank et Koffi, 1990 ; Sommer et al., 1999). En outre, une exposition prolongée à une faible concentration d'agents antimicrobiens peut également provoquer l'adaptation des micro-organismes, qui sécrètent des exopolysaccharides en excès en présence d'extraits de plantes (De Laubenfels, 2001).

Les résultats de notre étude peuvent aussi indiquer que les extraits choisis et incorporés dans la glace n'ont pas favorisé la croissance du biofilm pendant toute la période de conservation comme l'indique la diminution du nombre de cellules de biofilm par rapport au biofilm du lot témoin. Il a été décrit dans la littérature qu'un taux élevé d'attachement de cellules de biofilm est observé lors de l'exposition des surfaces à certains extraits de plantes, cela peut être dû à la présence de certains composés dans les extraits qui ont fourni un film de conditionnement favorisant l'adhérence microbienne. Sandasi et al. (2008) ont montré que le traitement des biofilms de *listeria* avec les composants des extraits végétaux a renforcé la croissance du biofilm.

2.1.3.2. Isolement et identification des *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens*

Cent soixante isolats, issus des prélèvements de surfaces des coupons (PEHD) en contact avec l'anchois, ont été collectés puis purifiés respectivement les jours 3, 6, 9 et 12 durant la période de conservation dans la glace préparée avec de l'eau distillée et la glace contenant les extraits de plantes aromatiques testées : le thym, l'origan et les clous de girofle. Parmi les isolats purifiés, 75 isolats appartenant au genre *Pseudomonas* et à l'espèce *Shewanella putrefaciens* ont été identifiés.

La répartition des isolats de *Pseudomonas* spp. et *Shewanella putrefaciens* est présentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Répartition du pourcentage d'isolats issus des prélèvements de surfaces des coupons (PEHD) en contact avec l'anchois durant toute sa période de conservation dans les différentes conditions de glaçage.

Groupes	Pourcentage des espèces par rapport aux isolats identifiés				
	<i>P. fluorescens</i> (%)	<i>P. putida</i> (%)	<i>P. stutzeri</i> (%)	<i>Shewanella putrefaciens</i> (%)	Autres <i>Pseudomonas</i> spp. (%)
Lot témoin	26.13	47.36	10.52	5.26	10.52
Thym	41.17	35.29	5.88	5.88	11.76
Origan	35.29	29.41	23.52	0	11.76
Clous de girofle	44.44	44.44	11.11	0	0

Nos résultats ont permis d'obtenir une image globale des espèces majoritaires du genre *Pseudomonas* adhérees aux surfaces en contact avec l'anchois. Les principales espèces retrouvées sont *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. stutzeri*, ces espèces font partie de la flore indigène et exogène du poisson frais conservé sous glace (Tableau 5). Ces résultats sont en accord avec une étude menée par Guðbjörnsdóttir et al. (2005). Cette dernière a montré que parmi les espèces du genre *Pseudomonas* : *P. putida* et *P. fluorescens* ont été les principales espèces isolées à partir des surfaces de travail dans les usines de transformation des produits de la mer.

Nous pouvons quasiment affirmer que les espèces dominantes dans les deux lots traités par les extraits d'origan et de clous de girofle sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* par rapport à l'espèce *Shewanella putrefaciens*. En effet, ces espèces pourraient être considérées comme «persistantes» sur les surfaces des coupons même après un traitement de la glace par les extraits de plantes utilisés. Cette résistance aux effets antimicrobiens d'extraits de plantes peut être expliquée par le fait que les espèces du genre *Pseudomonas* possèdent un avantage écologique à basses températures où elles se développent plus rapidement que d'autres flores. En outre, *Pseudomonas* spp peuvent avoir certains mécanismes de résistance contre les antimicrobiens couramment utilisés (Langsrud et al., 2003 ; Sundheim et al., 1998). En ce qui concerne *P. stutzeri*, les caractères de cette dernière en font une espèce ubiquitaire et il n'est guère surprenant qu'elle fasse partie de la flore dominante des surfaces en contact avec les poissons puisqu'elle est couramment rencontrée dans divers habitats, y compris les milieux marins, le sol et les eaux usées (Ward & Cockcroft, 1993).

A la lumière des pourcentages figurant dans le tableau 5, nous avons constaté que les isolats de *Pseudomonas* spp. sont les plus nombreux et représentent $\simeq 97$ % de la totalité des isolats pour les quatre lots, alors que les isolats de *Shewanella putrefaciens* ne dépassent pas les 3 %. Par ailleurs, il a été démontré que la flore bactérienne d'altération du poisson frais conservé sous glace est représentée par *S. putrefaciens*, suivie des espèces de *Pseudomonas* (Gennari et al., 1999). En outre, il est connu que la microflore de poissons fraîchement pêchés reflète la microflore présente dans le milieu environnant (Shewan, 1977; Liston, 1980 ; Gram et al., 1987) et les différents microorganismes isolés à partir des surfaces de travail des usines de transformation du poisson sont des éléments typiques de la microflore indigène du poisson (Gram et Huss, 2000). Dans notre étude, la réduction du nombre de *S. putrefaciens* isolées pourrait être due à la compétition microbienne entre cette espèce et les espèces du genre *Pseudomonas* au sein du biofilm. Bagge-Ravn et al. (2001) ont montré que la présence de *P. fluorescens* réduit le nombre de *S. putrefaciens* adhérents aux surfaces inertes. De plus, les espèces du genre *Pseudomonas* possèdent un spectre d'assimilation des substrats carbonés large (sucres, acides gras, acides aminés) et n'ont pas besoin de facteurs de croissance, ce qui leur confère un avantage compétitif vis-à-vis d'autres genres au spectre nutritionnel plus réduit (*B. thermosphacta* par exemple) (Garcia Lopez et al., 1998).

2.1.3.3. Détermination du rendement d'extraction et teneur en composés phénoliques totaux

Les résultats de la détermination du rendement d'extraction rapportés en pourcentage (g d'extrait pour 100 g de plantes sèches) ont montré que l'extrait de clous de girofle présentait le rendement le plus élevé à raison de 9,05 % (poids/poids) suivi de l'extrait de thym, qui était de 1,72 %. Le plus faible rendement d'extraction a été trouvé pour l'extrait d'origan : 0,71 %.

La teneur en composés phénoliques totaux des différents extraits de plantes a été déterminée par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et exprimée en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par g d'extraits (GAE mg/g d'extrait). Cette méthode a été largement utilisée pour la détermination des composés phénoliques. Cependant, la détermination de leur teneur selon cette méthode ne permet pas de faire des mesures absolues de la quantité de composés phénoliques (Sengul et al., 2009).

Dans cette étude, les composés phénoliques totaux dans les extraits sont obtenus à partir des parties aériennes du thym, d'origan et de clous de girofle. Nous pouvons remarquer, d'après les résultats des phénols totaux des différents types d'extraits, que l'extrait éthanolique de clous de

girofle est celui qui en contient le taux le plus élevé avec (637,35±24,29 mg d'extrait GAE/g), suivi par l'extrait d'origan (325,56±19,49 mg d'extrait GAE/g) et l'extrait de thym (139,74±9,71 mg d'extrait GAE/g).

La teneur en composés phénoliques totaux qui peuvent être extraits à partir d'un matériel végétal est principalement affectée par la technique d'extraction et l'efficacité du solvant extracteur pour dissoudre les composés endogènes avec un déplacement de constituants de la matrice végétale vers le solvant (Siddhuraju et Becker, 2003 ; Sultana et al., 2007). Des solvants tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, etc. ont été utilisés pour l'extraction de polyphénols à partir de matières végétales (Xu et Chang, 2007). Dans notre étude, l'éthanol a été choisi pour l'extraction, du fait de sa moindre toxicité pour la consommation humaine (Shi et al., 2005).

Des corrélations ont aussi été observées entre le rapport (le taux de réduction du nombre de cellules au sein du biofilm /la concentration de la glace pour chaque extrait) et la teneur en composés phénoliques totaux. La teneur en composés phénoliques totaux a montré une bonne corrélation avec l'activité anti-biofilm de chaque extrait, comme pour les bactéries aérobies mésophiles dans les biofilms de 6^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jours ($r = 0,77$, $r = 0,5$ et $r = 0,58$, respectivement), et les *pseudomonas* spp. dans les biofilms de 6^{ème} et 12^{ème} jours ($r = 0,8$ et $r = 0,73$, respectivement). Ces résultats sont conformes aux études antérieures suggérant que les activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits de plantes augmentent de manière significative avec la présence d'une forte concentration de composés phénoliques totaux (Lim et al., 2009; Edziri et al., 2012).

Les résultats obtenus à partir de ce travail ont montré que les bourgeons de clou de girofle, qui ont donné le meilleur rendement d'extraction et de récupération de composés phénoliques totaux, peuvent être exploitables comme une source potentielle de composés phénoliques pour une utilisation possible comme agents antimicrobiens.

2.1.3.4. Effet des extraits de plantes sur la stabilité de la glace

La figure 11 montre le volume de liquide recueilli pour chaque traitement de glace à 30 minutes d'intervalle. Les analyses par la méthode d'ANOVA et de Duncan ont été effectuées pour déterminer l'importance de la différence entre la glace préparée avec de l'eau distillée et la glace contenant des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle. Les résultats ont montré que, initialement, la glace préparée avec de l'eau distillée a fondu plus rapidement que la glace contenant des extraits de plantes ($p < 0,05$) pendant les 120 premières minutes. Par exemple, après

30 minutes de temps de stockage à 25°C, le volume de liquide recueilli de la glace préparée avec de l'eau distillée était de 130,33 ml alors que respectivement 42,33, 68, et 71 ml ont été recueillis à partir de la glace contenant les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle. Cependant, après les 120 premières minutes et pour la plupart des prélèvements, le volume collecté pour tous les traitements de la glace semble être relativement similaire ($p>0,05$). En général, les analyses statistiques ont montré que les extraits de plantes utilisés n'ont pas eu d'effet significatif ($p>0,05$) sur la vitesse de fusion de la glace en comparaison avec la glace préparée uniquement avec de l'eau distillée.

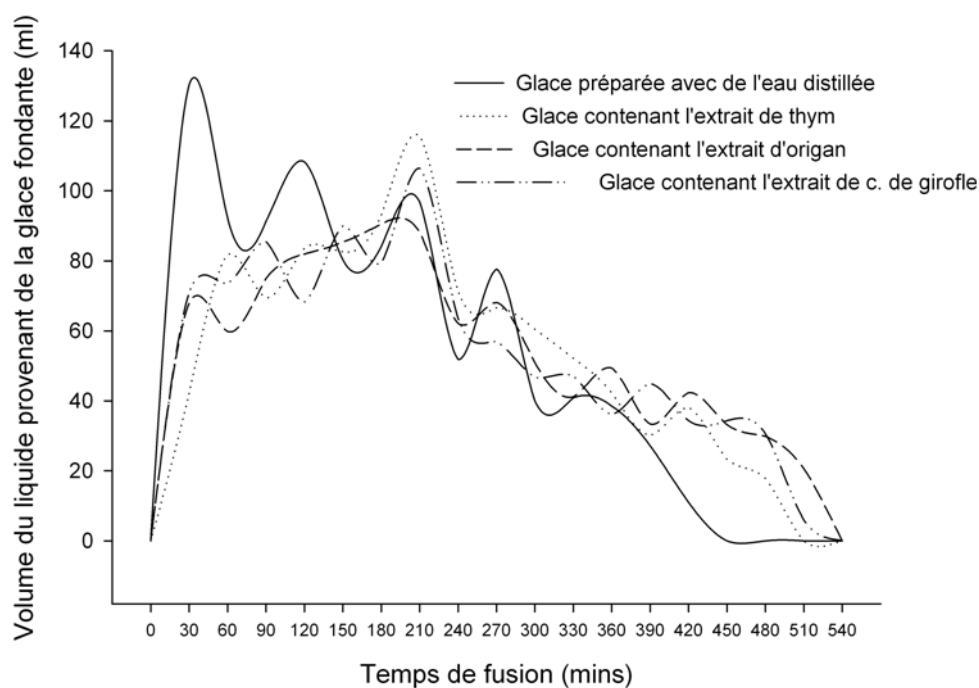


Figure 11: Volume des liquides recueillis à partir de la glace traitée au cours de la période de fusion.

2.2. Effet de la glace préparée avec les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sur les paramètres de la qualité des anchois méditerranéens conservés sous froid

2.2.1. Objectifs

Les anchois sont de petits poissons pélagiques et constituent l'une des principales ressources de la pêche dans le monde. Ils sont consommés à l'état frais, congelés, salés, en semi-conserves, marinés ou sous forme de pâte d'anchois (Pons-Sanchez-Cascado et al., 2006). Les poissons contiennent un nombre élevé de bactéries dans le système digestif et les enzymes digestives ainsi produites provoquent une autolyse post-mortem accrue, ce qui peut provoquer une flaveur désagréable de la chair. L'opération d'éviscération-étêtage, qui consiste à éliminer la tête, les branchies et les viscères, réduit l'autolyse et la charge bactérienne responsable de la détérioration du poisson (Cakli et al., 2007).

La durée de vie de l'anchois conservé sous glace est relativement courte, elle est d'environ 5-7 jours (Massa, et al., 2012). Les anchois, comme de nombreuses autres espèces marines, sont très sensibles à la détérioration causée par des réactions chimiques et des microorganismes d'altération (Ólafsdóttir et al., 1997). L'hydrolyse et l'oxydation dans la chair des produits de la mer s'installent rapidement et limitent la durée de conservation du poisson pendant le stockage.

L'effet conservateur des extraits de plantes est principalement dû à leurs propriétés antimicrobiennes et à l'inhibition de certaines activités enzymatiques, ainsi que la capacité de piégeage des radicaux libres et donc la prévention de l'oxydation des lipides (Tajkarimi et al., 2010).

La présente étude propose une nouvelle technique pour la commercialisation de l'anchois comme un produit réfrigéré. Pour cette raison, l'effet de la glace préparée avec les extraits du thym, d'origan et de clous de girofle sur les paramètres de qualité d'anchois (*Engraulis encrasicolus*) étêtés, éviscérés et conservés sous froid a été étudiée comparativement à la glace préparée avec de l'eau distillée qui a été utilisée comme témoin. Les modifications microbiologiques, chimiques et sensorielles liées à des critères de qualité ont été mesurées dans le but de trouver les extraits de plantes les plus efficaces pour la conservation de l'anchois.

2.2.2. Matériel et méthodes

2.2.2.1. Présentation du matériel animal

L'anchois méditerranéen (*Engraulis encrasicolus*) est une espèce de poissons marins appartenant à l'ordre des Clupeiformes de la famille des *Engraulidae*. La taille moyenne adulte des anchois varie de 11 à 14 cm. D'un corps bleuté allongé et cylindrique, l'anchois se trouve dans l'Atlantique nord-est, la mer du Nord et en Méditerranée. Sa nourriture est composée de zooplancton ainsi que de phytoplancton. En Méditerranée, la pêche est traditionnelle et moins contrôlable. Une part de la production est destinée aux conserveries pour préparer les fameux anchois au sel ou à l'huile (Ibrahima Samba, 1988).

L'anchois largement pourvu en lipides (Tableau 6), fait partie de la famille des poissons gras. Ses graisses constituées d'acides gras poly-insaturés, réputées pour entretenir le système cardiovasculaire, sont très bonnes pour la santé. L'anchois apporte aussi des vitamines précieuses en quantité non négligeable (Oehlenschläger et Rehbein, 2009).

Tableau 6 : Analyse nutritionnelle moyenne pour 100 g d'anchois cru (partie consommable).
(Oehlenschläger et Rehbein, 2009)

Composants	Composition
Eau (g/100g)	73
Protéines (g/100g)	20
Lipides totaux (g/100g)	5
Cholestérol (mg/100g)	36
Phosphore (mg/100g)	188
Magnésium (mg/100g)	0.03
Calcium (mg/100g)	33
Sodium (mg/100g)	68
Vitamine A (µg/100g)	19
Vitamine B2 (µg /100g)	120-270
Vitamine B6 (µg/100g)	143-180
Vitamine B12 (µg/100g)	0,3-3.3
Vitamine D (µg /100g)	20
Vitamine E (µg/100g)	500
Vitamine C (µg/100g)	500
Energie (Kcal/100g)	131

2.2.2.2. Conditions d'entreposage

Les anchois étêtés, éviscérés et lavés à l'eau potable ont été répartis en quatre lots et conservés selon les mêmes conditions d'entreposage décrites précédemment. Tout d'abord, les échantillons de poissons ont été mis dans des caisses en polystyrène désinfectées et perforées pour permettre le drainage du liquide résultant de la fonte de la glace. Ensuite, ils ont été recouverts d'une couche de chacune des glaces traitées, avec un rapport poisson/glace de 2:1 (poids/poids). Un lot témoin a été recouvert de glace préparée avec de l'eau distillée ; tandis que dans les trois autres lots, la glace est traitée par 0,04% (p/v), 0,03% (p/v) et 0,02% (p/v) d'extraits de thym, d'origan et de clous de girofle, respectivement. Au cours de l'entreposage, la glace fondue est remplacée afin de respecter le ratio glace/poisson désiré.

Les quatre lots sont placés dans une chambre froide ($+3\pm 1^{\circ}\text{C}$), les prélèvements d'échantillons de poissons sont effectués le 3, 6, 9, et 12^{ème} jour de conservation. Toutes les analyses ont été effectuées en triple.

2.2.2.3. Analyse sensorielle des anchois

L'analyse sensorielle est un outil indispensable pour le contrôle de la qualité des produits de la mer. Elle repose sur l'évaluation de la fraîcheur, la dégustation des produits cuits et sur l'analyse statistique des réponses sensorielles données par le jury de dégustation.

Le jury est composé de 7 individus sélectionnés pour leur intérêt, leur disponibilité et leurs capacités à discriminer ou à mémoriser les intensités sensorielles. Chaque membre est volontaire et participe à des sessions d'entraînement afin de développer les performances sensorielles et les connaissances des produits de la mer.

2.2.2.3.1. Anchois crus

L'évaluation sensorielle de l'anchois cru, conservé dans la glace préparée avec de l'eau distillée et la glace contenant des extraits de plantes choisis (thym, origan et clous de girofle), a été réalisée selon la méthode d'index de qualité (QIM) développée par Pons-Sanchez-Cascado et al. (2006) avec quelques modifications personnelles pour les anchois éviscérés et étêtés. Elle est effectuée sur un échantillon prélevé selon les recommandations du tableau 7.

Tableau 7 : Méthode de l'index de qualité pour les anchois crus.

Paramètres de qualité	Description	Note
<i>Aspect Général</i>		
❖ Pigmentation	• Vive et chatoyante, iridescente, violet-bleuâtre	0
	• Vive sans lustre, iridescente, non bleuâtre	1
	• Légèrement mate, ternie	2
❖ Mucus	• Transparent, mucus aqueux	0
	• Mucus trouble, abondant	1
	• Abondant (glissant), mucus jaune-brunâtre	2
❖ Peau	• Intacte	0
	• Facile à déchirer	1
	• Déchirée et endommagée	2
<i>Chair</i>		
❖ Texture	• Ferme	0
	• Légèrement flasque	1
	• Flasque	2
❖ Odeur	• Algue marine fraîche	0
	• Neutre	1
	• Légèrement putride, de lard rance	2
	• Odeur de fruits pourris, aigre	3
❖ Odeur de l'extrait	• Aucune odeur	0
	• Légèrement perceptible	1
	• Intensive	2
❖ Aspect et couleur	• Claire	0
	• Rose	1
	• Rouge-foncé	2
<i>Couleur le long de la colonne vertébrale</i>	• Pas de coloration	0
	• Rose	1
	• Rouge	2
<i>Colonne vertébrale</i>	• Se brise au lieu de se détacher	0
	• Peu adhérente	1
	• Non adhérente	2
Note globale	0-19	

Cette appréciation a concerné l'observation de neuf caractères relatifs à l'aspect général (la pigmentation, le mucus et la peau), la chair (la texture, l'odeur, l'odeur de l'extrait et la couleur et aspect), la couleur le long de la colonne vertébrale et le degré d'adhérence de la colonne vertébrale.

L'évaluation de chaque caractère nous a permis également de définir le degré de fraîcheur, en lui attribuant une note de 0 à 3, (0 représente une meilleure qualité ; 3 indique une qualité médiocre) pour y représenter dans un ordre décroissant d'intensité la description des divers états de fraîcheur de chacun de ces paramètres. Pour chaque membre de jury, la note de chaque échantillon a été calculée en additionnant les notes obtenues pour chaque caractère. La note définitive a été obtenue en faisant la moyenne arithmétique des notes des sept membres de jury. Cette notation est effectuée afin de déterminer le temps de rejet organoleptique qui correspond au moment où les anchois sont jugés impropres à la consommation.

2.2.2.3.2. Anchois cuits

Les tests sensoriels sur les anchois cuits sont réalisés selon la méthode de Pons-Sanchez-Cascado et al. (2006) sans aucune modification. Les échantillons sont cuits durant 1 min 30 secondes dans un four à micro-ondes dans des assiettes à usage unique. Les échantillons, présentés simultanément sont notés sur une échelle correspondant à une notation de 0 à 10 selon des critères définis dans le tableau 8. La limite d'acceptabilité pour la consommation étant < 6 . Le test choisi est un test de profil, il permet de caractériser et de discriminer les anchois au niveau de la texture, le goût, la succulence et l'odeur. Les critères d'odeur sont immédiatement jugés après avoir sorti l'échantillon du four micro-onde, alors que les critères concernant la texture, le goût et la succulence sont évalués après avoir découpé et goûté l'échantillon.

Tableau 8 : Score d'évaluation sensorielle pour les anchois cuits (Pons-Sanchez-Cascado et al., 2006).

Texture	Goût-succulence	Odeur	Score
Ferme et élastique	Goût caractéristique de l'anchois cuit, très bon goût, très succulent	Odeur caractéristique de l'anchois cuit	10
Semi-ferme et élastique	Bon goût, succulent	Odeur caractéristique de l'anchois cuit, moins forte	9
Elasticité diminuée	Bon goût, succulent	Odeur caractéristique de l'anchois cuit, moins forte	8
Sèche	Neutre, légèrement doux	Neutre, légèrement doux	7
Pâteuse	Légèrement métallique, sec	Douce, fruitée	6
Caractères antérieurs avancés	Légèrement aigre et rance	Légèrement putride	5
	Amer, aigre, rance	Putride, aigre	4
	Ammoniacal, sulfureux	Acidulée, ammoniacale, rance	3

2.2.2.4. Analyses physico-chimiques

2.2.2.4.1. PH

Le pH de la chair des anchois échantillonnés est mesuré par dispersion de la chair hachée dans 10 volumes d'eau distillée avec un pH-mètre (315i, WTW GmbH, Weilheim, Allemagne).

2.2.2.4.2. Dosage de l'Azote basique volatil total (ABVT)

Le dosage de l'Azote Basique Volatil Total (ABVT) est déterminé selon la méthode d'Antonacopoulos et Vyncke (1989). Dans un matras de Kjeldahl, 10 grammes de la chair (avec la peau) des anchois échantillonnés sont homogénéisés avec environ 2-3 g d'oxyde de magnésium (MgO) et 2-3 gouttes de l'émulsion de silicone antimousse. Avant l'analyse de

l'échantillon, 10 ml d'acide borique 3% sont ajoutés avec environ 6-8 gouttes de rouge de méthyle dans un erlenmeyer gradué (collecteur) et le mélange est complété avec de l'eau distillée à 100 ml de volume.

Lorsque la distillation est terminée, 200 ml de distillat sont titrés par une solution étalon d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1 N (changement de couleur du vert au rouge-violet) afin de déterminer la teneur en ABVT. Cette teneur est exprimée en milligrammes d'ABVT pour 100 g de chair selon la formule suivante :

$$\text{ABVT (mg/ 100g)} = \frac{\text{Volume utilisé d'acide 0.1 N (ml)} \times 1.4 \times 100}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

2.2.2.4.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-ATB)

La méthode à l'acide thiobarbiturique est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage des composés secondaires de l'oxydation des lipides à cause de sa simplicité et sa sensibilité. La méthode utilisée pour notre étude est celle de Tarladgis et al. (1960) pour la chair (avec la peau) des anchois échantillonnés.

10 g d'échantillon sont pesés dans des tubes qui sont déposés dans la glace pilée pour limiter l'oxydation. 97.5 ml d'eau distillée et 2.5 ml d'une solution HCl 6 N sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé 3 fois pendant 15 secondes à l'aide d'un homogénéisateur. Ensuite, le mélange est introduit dans l'appareil de Kjeldahl et le processus de distillation est poursuivi jusqu'à 200 ml de distillat.

Dans un tube séparé, 5 ml de distillat sont ajoutés à 5 ml de réactif TBA contenant 0.02 M d'ATB dans l'acide acétique glacial à 90%. Le mélange final est parfaitement agité puis mis au bain-marie à 70°C pendant 35 minutes. A la sortie du bain-marie, les tubes sont placés dans un bain d'eau froide. L'absorbance de la solution rose est lue à 538 nm dans un spectrophotomètre (Lambda 25, Perkin Elmer, Shelton, CT).

La conversion de l'absorbance, mesurée à 538 nm, en équivalents de milligrammes de malondialdéhyde par kg de chair de poisson est obtenue en utilisant la constante 7.8. Le mode de calcul est le suivant :

$$\text{Teneur en acide thiobarbiturique (mg équivalent MDA/Kg de chair)} = \text{Absorbance} \times 7.8$$

2.2.2.4.4. Indice de peroxyde (IP)

Avant de mesurer la concentration en peroxydes, il faut extraire les lipides de l'échantillon à analyser.

2.2.2.4.4.1. Extraction des lipides

L'extraction des lipides totaux est effectuée conformément à la méthode appliquée par Bligh et Dyer (1959). Environ dix grammes d'échantillon sont mélangés avec 80 ml de chloroforme et 40 ml de méthanol dans un homogénéisateur du type Ultra-Turax pendant 2 minutes. Le mélange est filtré avec du papier filtre (Sleicher & Schuell, 5951/2 185 mm) puis transféré dans des fioles jaugées avec l'ajout de 20 ml de solution à 0.4% de CaCl_2 . Ensuite, ce mélange est gardé hermétiquement fermé dans l'obscurité pendant une nuit. Le lendemain et après la séparation des deux phases, la phase supérieure composée de méthanol-eau est prise avec une ampoule à décanter et la phase inférieure composée du chloroforme-lipides est récupérée dans un ballon en verre, puis le solvant est évaporé dans l'évaporateur rotatif à 60°C pour obtenir la masse de lipides.

2.2.2.4.4.2. Concentration en peroxydes

L'indice de peroxyde (IP) est une mesure des produits d'oxydation primaires, les hydroperoxydes (ROOH). Ces derniers sont des produits intermédiaires instables qui sont rapidement dégradés pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. L'indice de peroxyde est réalisé selon le protocole décrit dans la méthode de l'AOCS (1994).

Pour chaque dosage, 1 g de lipides (extraits de Bligh et Dyer (1959)) est solubilisé dans 20 ml de chloroforme suivi de 50 ml de solution d'acide acétique/chloroforme (60:40). Après agitation, la réaction est initiée par l'ajout d'un millilitre d'une solution aqueuse d'iodure de potassium saturé. L'ensemble est agité puis placé 30 minutes à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 100 ml d'eau distillée avec 4-5 gouttes d'amidon à 1%. La titration est réalisée par une solution de thiosulfate de sodium à 0,02 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dans un endroit sombre. Le volume correspondant au virage de l'indicateur coloré jusqu'à la disparition de la couleur bleue permet de déterminer la concentration en peroxydes.

L'indice de peroxyde, exprimé en milliéquivalents de peroxyde d'oxygène par kilogramme de matière grasse, est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Indice de peroxide (mEq/kg)} = \frac{2 (V_1 - V_0)}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

Où:

V_0 = volume (ml) de thiosulfate de sodium 0.002 M utilisé dans l'essai à blanc

V_1 = volume (ml) de thiosulfate de sodium 0.002 M utilisé dans la prise d'essai.

2.2.2.4.5. Analyse des acides gras libres (AGL)

La teneur en acides gras libres (AGL) est déterminée selon le protocole décrit dans la méthode de l'AOCS (1994) par titration acidimétrique des extraits de Bligh et Dyer (1959), addition d'éthanol et utilisation de la phénolphthaléine comme indicateur.

Pour chaque dosage, 0.5 g de lipides est solubilisé dans 50 ml d'éther diéthylique/éthanol (25:25). Après agitation, 1 ml de l'indicateur coloré (phénolphthaléine 1%) est additionné. Ensuite, la titration est réalisée par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M jusqu'à la persistance d'une couleur rose pour plus de 15 secondes.

La teneur en acides gras libres (AGL), exprimée en % d'acide oléique, est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur en acides gras libres (\% d'acide oléique)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 2.805}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

où:

V_0 = volume (ml) d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M utilisé dans la prise d'essai,

2.805 = facteur de conversion.

2.2.2.5. Analyses microbiologiques

Les échantillons provenant de chacun des quatre lots d'anchois et destinés aux analyses microbiologiques sont préparés en homogénéisant 5 g de la chair des anchois (avec la peau), prélevés avec du matériel stérile, dans 45 ml de solution de Ringer pendant 2 min à l'aide d'un Stomacher. Le broyat est alors utilisé pour préparer des dilutions décimales successives jusqu'à la dilution 10^{-6} , en utilisant le même diluant. Le dénombrement respectivement de la flore aérobie

mésophile totale (FAMT) et les bactéries psychrotrophes a été déterminé selon la norme NF V08-011 (Anonyme, 1998) et la norme ISO 17410 (Anonyme, 2001) en utilisant le milieu de culture « Plate Count Agar : PCA » (Fluka 70152, Suisse). Des aliquotes de 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions décimales ont étéensemencées en surface. Les boîtes sont par la suite incubées à 30°C pendant 72 heures pour la flore aérobie mésophile totale et 7°C pendant 10 jours pour les bactéries psychrotrophes. Les résultats sont exprimés en UFC/g puis transformés en log (UFC/g).

2.2.2.6. Traitement statistique des données

Les analyses statistiques de l'évaluation sensorielle, chimique, microbiologique ont été réalisées par le logiciel SPSS (SPSS 17.0 pour Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) et le niveau statistique de significativité est fixé à 95% soit : $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été réalisées en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ Ecart-type.

Les résultats sont traités par analyse de variance (Scherrer, 1984) suivie d'une comparaison des moyennes entre les différents traitements de glace par le test de Duncan.

2.2.3. Résultats et discussion

2.2.3.1. L'analyse sensorielle

La qualité sensorielle des anchois crus et cuits a été évaluée à l'arrivée au laboratoire et après 3, 6, 9 et 12 jours de conservation.

2.2.3.1.1. Anchois crus

Les scores sensoriels de démerite des anchois crus conservés dans la glace préparée avec de l'eau distillée et des extraits de plantes sont présentés dans la figure 12. Les scores dans les quatre groupes ont diminué au cours des 12 jours de stockage au froid. En utilisant un score sensoriel de 12 comme une limite d'acceptabilité, la durée de vie observée était de 9 jours dans le groupe témoin (score de démerite : 13,43) et 12 jours pour les groupes conservés dans la glace contenant des extraits de thym , d'origan et de clous de girofle (scores de démerite, 12.57, 13.29 et 11.71, respectivement) , où une différence de 3 jours de la durée de vie a été notée. Les résultats de l'analyse sensorielle ont montré que la durée de conservation des anchois étêtés et éviscérés est affectée par le stockage dans la glace avec des extraits de plantes utilisés. Özyurt et al. (2011) ont étudié la durée de vie de la sardine (*Sardinella aurita*) conservée dans la glace contenant du

romarin, leurs résultats ont montré que l'ajout de l'extrait naturel a amélioré la qualité sensorielle des poissons et a prolongé leur durée de vie de 3 jours par rapport au lot témoin.

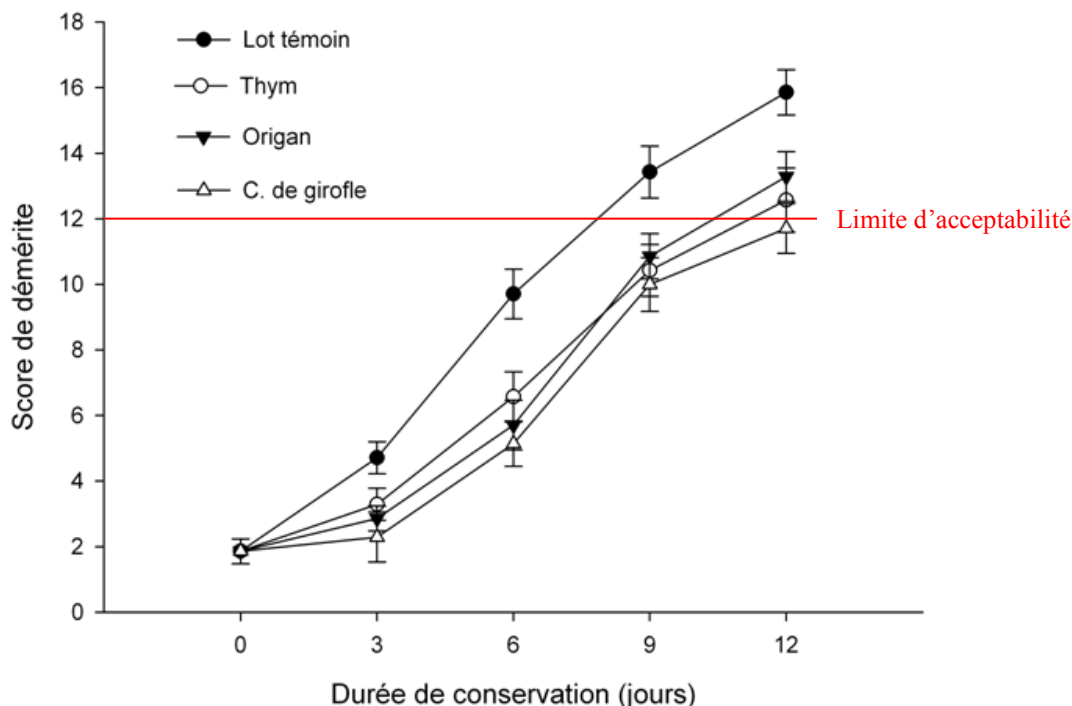


Figure 12 : Evaluation sensorielle des anchois crus conservés sous différentes conditions de glaçage : glace préparée avec de l'eau distillée (Lot témoin), glace contenant l'extrait de thym (Thym), glace contenant l'extrait d'origan (Origan) et glace contenant l'extrait de clous de girofle (C. de girofle). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ Ecart-type, $n = 7$.

2.2.3.1.2. Anchois cuits

Les scores sensoriels des filets d'anchois cuits sont présentés dans la figure 13. A chaque jour de prélèvement en cours de conservation, des différences significatives ($p < 0,05$) entre le groupe témoin et les groupes traités ont été relevées. Le seuil d'acceptabilité a été défini comme ayant un score de 6. La limite d'acceptabilité a été atteinte après 9 jours pour le groupe témoin (5,29) et après 12 jours pour les groupes conservés dans la glace contenant les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle (scores de démerite, 5,43, 5,00, et 5,86, respectivement). Les groupes traités ont été hautement préférés par le jury d'analyses en raison de leur saveur appétissante. Par conséquent, les extraits de thym, d'origan et de clous de girofle pourraient être utilisés comme sources naturelles de conservation facilement accessibles et ayant une meilleure acceptation par les consommateurs comparativement aux additifs chimiques.

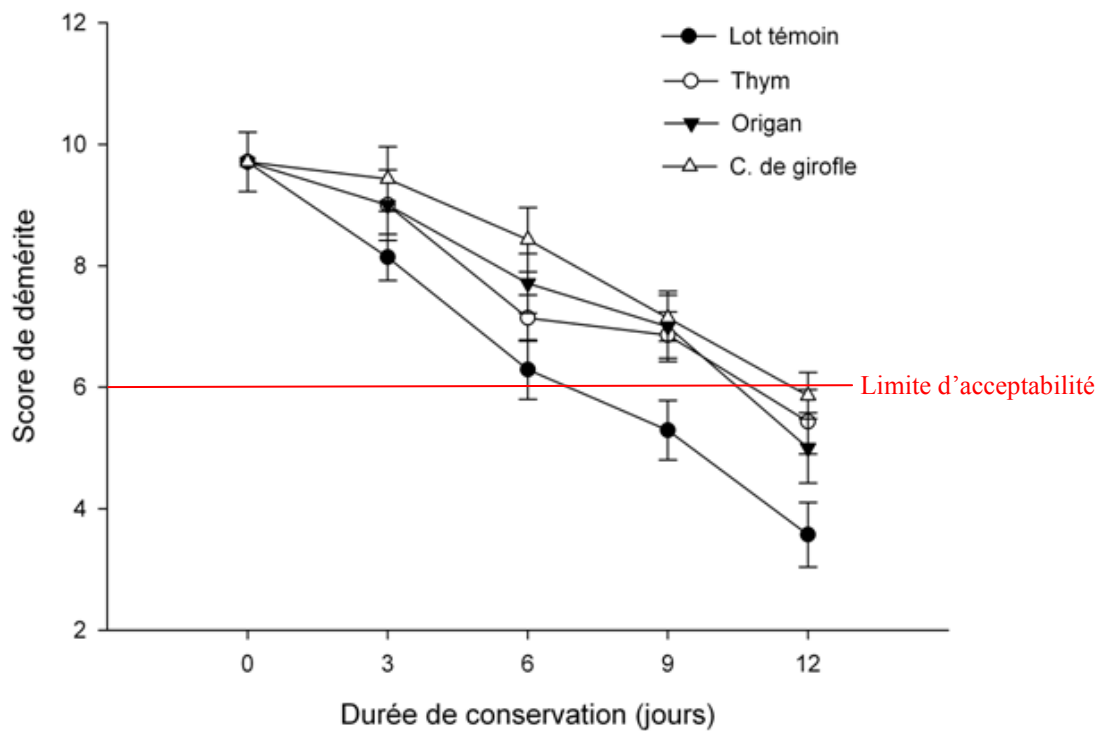


Figure 13 : Evaluation sensorielle des anchois cuits conservés sous différentes conditions de glaçage : glace préparée avec de l'eau distillée (Lot témoin), glace contenant l'extrait de thym (Thym), glace contenant l'extrait d'origan (Origan) et glace contenant l'extrait de clous de girofle (C. de girofle). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ Ecart-type, $n = 7$.

2.2.3.2. Analyses physico-chimiques

2.2.3.2.1. Variations du pH et évaluation de la teneur en ABVT

Le tableau 9 résume les moyennes et les écarts-types des valeurs du pH et de l'azote basique volatil total analysées pour chaque jour de prélèvement.

Tableau 9: Variations du pH et évolution de l'azote basique volatil total (mg/100g d'échantillon) sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois sous froid.

Paramètres	Groupes	Durée de conservation (jours)				
		0	3	6	9	12
pH	Lot témoin	5.93±0.23	6.41±0.04 ^a	6.44±0.16 ^a	6.93±0.28 ^a	7.30±0.02 ^a
	Thym	5.93±0.23	6.40±0.02 ^a	6.42±0.05 ^a	6.52±0.15 ^b	7.00±0.02 ^b
	Origan	5.93±0.23	6.44±0.01 ^a	6.41±0.05 ^a	7.13±0.04 ^a	6.93±0.13 ^b
	C. de girofle	5.93±0.23	6.42±0.01 ^a	6.43±0.03 ^a	6.91±0.01 ^a	6.89±0.02 ^b
ABVT	Lot témoin	9.50±1.07	11.11±0.70 ^b	13.87±0.79 ^a	30.93±2.73 ^a	60.23±5.59 ^a
	Thym	9.50±1.07	15.30±3.48 ^a	8.84±1.43 ^b	20.89±4.18 ^b	31.56±2.90 ^{bc}
	Origan	9.50±1.07	12.04±1.45 ^{ab}	10.93±1.03 ^b	29.43±4.76 ^a	38.10±3.00 ^b
	C. de girofle	9.50±1.07	11.84±1.16 ^{ab}	9.31±1.78 ^b	25.30±0.38 ^{ab}	28.10±1.50 ^c

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type, n = 3. ^{a-c} Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes (p<0.05).

Le pH initial des échantillons de poissons était de 5,93. Dans le cas d'anchois conservés dans la glace préparée avec de l'eau distillée, le pH a augmenté de façon significative avec le temps de conservation, pour atteindre une valeur de 7,3 à J 12. L'augmentation des valeurs de pH au cours de la période de stockage peut être attribuée à l'accumulation de composés alcalins, tels que les composés d'ammoniac et de triméthylamine, principalement provenant de l'action microbienne (Schormüller, 1968). La comparaison entre les systèmes de glaçage utilisés a montré que les poissons conservés sous glace préparée avec de l'eau distillée n'ont présenté un pH plus élevé (p<0,05) que dans le 12^{ème} jour du prélèvement, par rapport aux poissons conservés sous glace préparée avec les trois extraits de plantes. Aucune différence (p>0,05) n'a été observée tout au long de la période de conservation entre les anchois conservés dans la glace contenant les extraits

de plantes. L'analyse statistique a montré que les valeurs de pH des anchois n'ont pas été affectées ($p < 0,05$) par l'utilisation de glaces contenant les extraits de plantes.

L'azote basique volatil total résulte de la dégradation des protéines par l'action de bactéries d'altération ou d'enzymes endogènes présentes dans le poisson, sa détermination est souvent utilisée comme un indicateur de la détérioration de la chair du poisson cru (Erkan et al., 2007). Divers auteurs ont signalé que la limite d'acceptabilité pour le poisson frais était de 30 mg ABVT/100 g de chair (El-Marrakchi et al., 1990 ; Harpaz et al., 2003). Au début de la conservation, la teneur en ABVT enregistrée est de 9,50 mg/100 g de chair, cette teneur a augmenté avec le temps de stockage pour les quatre groupes (Tableau 9). L'analyse statistique a montré que des différences significatives ($p < 0,05$) ont été trouvées entre les anchois conservés dans la glace préparée avec de l'eau distillée et ceux conservés dans la glace préparée avec des extraits de plantes, le 6^{ème} et le 12^{ème} jour de stockage. Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre les quatre groupes pour les valeurs en ABVT le 3^{ème} et 9^{ème} jour de stockage. La réduction significative ($p < 0,05$) des valeurs en ABVT dans les trois groupes d'échantillons conservés dans la glace contenant des extraits de plantes peut être attribuée à des propriétés antibactériennes des composés phénoliques: carvacrol, thymol et eugénol (Tajkarimi et al., 2010). Dans la présente étude, la valeur en ABVT de l'anchois conservé dans la glace préparée avec de l'eau distillée a dépassé la limite d'acceptabilité de 30 mg/100 g de chair au temps de rejet sensoriel (9^{ème} jour). Les valeurs en ABVT de l'anchois conservé dans la glace contenant des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle sont restées en dessous de la limite d'acceptabilité après 12 jours de stockage (Figure 14). Lorsque le poisson a été considéré comme inacceptable par le jury d'analyses sensorielles, les valeurs en ABVT correspondantes étaient de 30,93 mg/100 g pour le groupe témoin, 31,56 mg/100 g pour le lot traité au thym, 38,10 mg/100 g pour celui de l'origan et 28,10 mg/100 g pour le lot traité aux clous de girofle. Ces résultats indiquent que l'ABVT est un indice approprié pour mesurer la détérioration de l'anchois étêté, éviscéré et conservé à 4 °C.

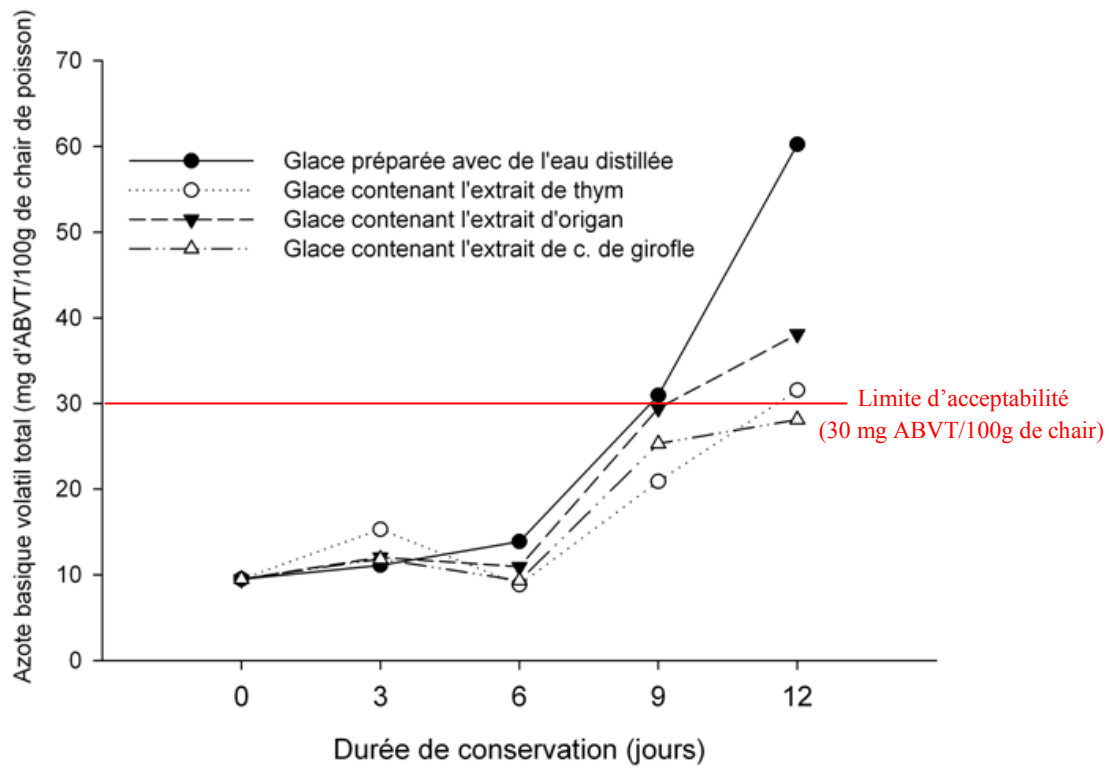


Figure 14: Effet de différentes conditions de glaçage sur la teneur en azote basique volatil total dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid
La ligne horizontale représente la limite d'acceptabilité

2.2.3.2.2. Oxydation des lipides

Le tableau 10 résume les teneurs de l'indice de peroxyde et l'acide thiobarbiturique pour chaque jour de prélèvement.

Tableau 10: Evolution de l'indice de peroxyde (meq/kg de graisses) et l'acide thiobarbiturique (mg malondialdehyde/kg d'échantillon), sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois.

Paramètres	Groupes	Durée de conservation (jours)				
		0	3	6	9	12
IP	Lot témoin	4.29±1.07	4.09±0.74 ^a	4.14±0.56 ^a	7.26±0.74 ^a	16.20±0.31 ^a
	Thym	4.29±1.07	4.02±0.50 ^a	3.13±0.14 ^b	4.04±0.39 ^b	7.76±1.44 ^c
	Origan	4.29±1.07	3.78±0.29 ^a	4.40±0.57 ^a	4.74±1.08 ^b	10.87±0.49 ^b
	C. de girofle	4.29±1.07	3.42±0.87 ^a	2.20±0.24 ^c	4.66±0.30 ^b	6.44±0.83 ^c
ATB	Lot témoin	3.08±0.92	8.54±0.06 ^a	14.38±1.69 ^a	9.59±1.66 ^a	8.77±0.41 ^a
	Thym	3.08±0.92	7.83±1.31 ^{ab}	13.33±1.40 ^a	9.18±0.43 ^a	8.78±0.60 ^a
	Origan	3.08±0.92	7.52±0.70 ^b	11.73±0.83 ^b	7.55±0.41 ^b	4.81±2.00 ^b
	C. de girofle	3.08±0.92	8.63±0.21 ^a	8.10±0.78 ^c	5.71±0.25 ^c	9.73±0.48 ^a

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart-type, n = 3. ^{a-c} Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes (p<0.05).

L'indice de peroxyde (IP) a été employé pour déterminer les premiers stades de l'oxydation des graisses (Melton, 1983). La valeur initiale de l'indice de peroxyde des échantillons de poissons était 4.29 mEq/kg de graisse. Comme indiqué dans le tableau 10, le glaçage avec des extraits de plantes réduit la formation de peroxyde (p<0,05) le 6^{ème}, le 9^{ème} et le 12^{ème} jour de conservation. Toutefois, aucune différence significative (p>0,05) ne pourrait être décrite entre les quatre groupes le 3^{ème} jour de prélèvement. Nous pouvons conclure que la présence d'extraits de plantes dans la glace conduit à une inhibition partielle de la formation de peroxyde. En outre, l'extrait de clous de girofle a montré un meilleur effet antioxydant sur le poisson et a abouti à une faible teneur de l'indice de peroxyde (IP) (Figure 15). Les résultats de la présente étude indiquent que les extraits de plantes utilisés sont efficaces pour retarder la peroxydation des lipides dans les anchois stockés sous froid. La capacité de ces extraits de plantes pour inhiber l'oxydation des lipides est probablement liée à leur teneur totale en composés phénoliques. Les antioxydants phénoliques préviennent la formation de radicaux libres, ils absorbent ou réagissent avec

l'oxygène dans un processus d'auto-oxydation, ce qui retarde le déclenchement du processus auto-oxydatif des matières grasses (Sherwin, 1990).

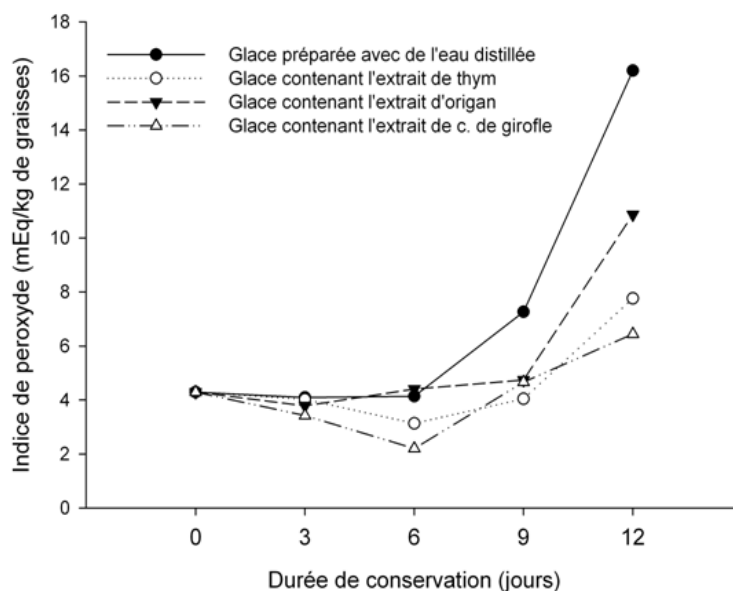


Figure 15: Effet de différentes conditions de glaçage sur l'indice de peroxyde dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.

La valeur en acide thiobarbiturique (ATB) est un indice secondaire de l'oxydation des lipides par la détermination du malondialdéhyde (MDA). Le MDA est un composé secondaire d'oxydation résultant de la dégradation des hydroperoxydes lipidiques formés au cours du procédé d'oxydation des acides gras polyinsaturés (Fernandez et al., 1997). Au début de la conservation des échantillons de poissons, la valeur initiale en ATB était 3,08 mg malonaldéhyde (MA)/kg de chair (Tableau 10). Les valeurs en ATB de l'ensemble des quatre groupes échantillons ont montré d'abord une augmentation puis ensuite une diminution durant toute la période de conservation (Figure 16). L'augmentation des valeurs en ATB indique la formation de produits secondaires d'oxydation lipidique, tandis que la baisse de ces valeurs peut être due à la transformation du malonaldehyde par la dégradation tertiaire (Pezeshk et al., 2011). Tout au long de la période de conservation, une plus grande valeur en ATB ($p < 0,05$) dans le groupe témoin a été constaté par rapport au groupe conservé dans la glace contenant l'extrait d'origan. Les mêmes différences sont obtenues entre le groupe témoin et le groupe conservé dans la glace contenant l'extrait de clous de girofle les jours 6 et 12 de prélèvement. En revanche, aucune différence

($p > 0,05$) n'a été observée pendant toute la période de conservation entre le groupe témoin et le groupe conservé dans la glace contenant l'extrait de thym. En conséquence des résultats du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique, il peut être conclu que l'utilisation d'extraits d'origan et de clous de girofle dans la glace a été efficace sur les valeurs des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (ATB) dans les anchois méditerranéens. Les extraits d'origan et de clous de girofle contenant une teneur élevée en composés phénoliques totaux peuvent contribuer à un retard de la peroxydation lipidique et donc une concentration basse en ATB. Ces résultats sont en accord avec ceux de Quitral et al. (2009), qui ont déclaré que le système de glaçage utilisant l'extrait d'origan a montré généralement une valeur inférieure en ATB par rapport au lot témoin pour le chinchard (*Trachurus murphyi*).

Nunes et al. (1992) ont rapporté que les limites d'acceptabilité de la valeur des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (ATB) pour les poissons conservés dans la glace traditionnelle étaient de 5-8 mg MA/kg de chair, alors que le niveau de 8 mg malondialdéhydes/kg de chair est généralement considéré comme la limite d'acceptabilité pour la plupart des espèces (Schormüller, 1968). Les valeurs en ATB des quatre groupes ont dépassé la valeur de 8 mg/kg de MDA au 6^{ème} jour de conservation. Cependant, à cette même période à J 6, le jury d'analyses sensorielles n'a détecté aucune odeur ou goût désagréable dans les échantillons de poissons. Selon ces résultats, il serait difficile de fixer des limites pour les niveaux en ATB, et les valeurs en ATB ne peuvent pas donner un taux réel de l'oxydation des lipides depuis le malondialdéhyde, parce que ce dernier peut interagir avec d'autres composants de poissons tels que les nucléosides, les acides nucléiques, les protéines, les acides aminés et les phospholipides (Aubourg, 1993), et produire des métabolites secondaires qui incluent les hydrates de carbone, le furfural, les alcénals, les alkadiénals et d'autres aldéhydes et cétones (Botsoglou et al., 1994).

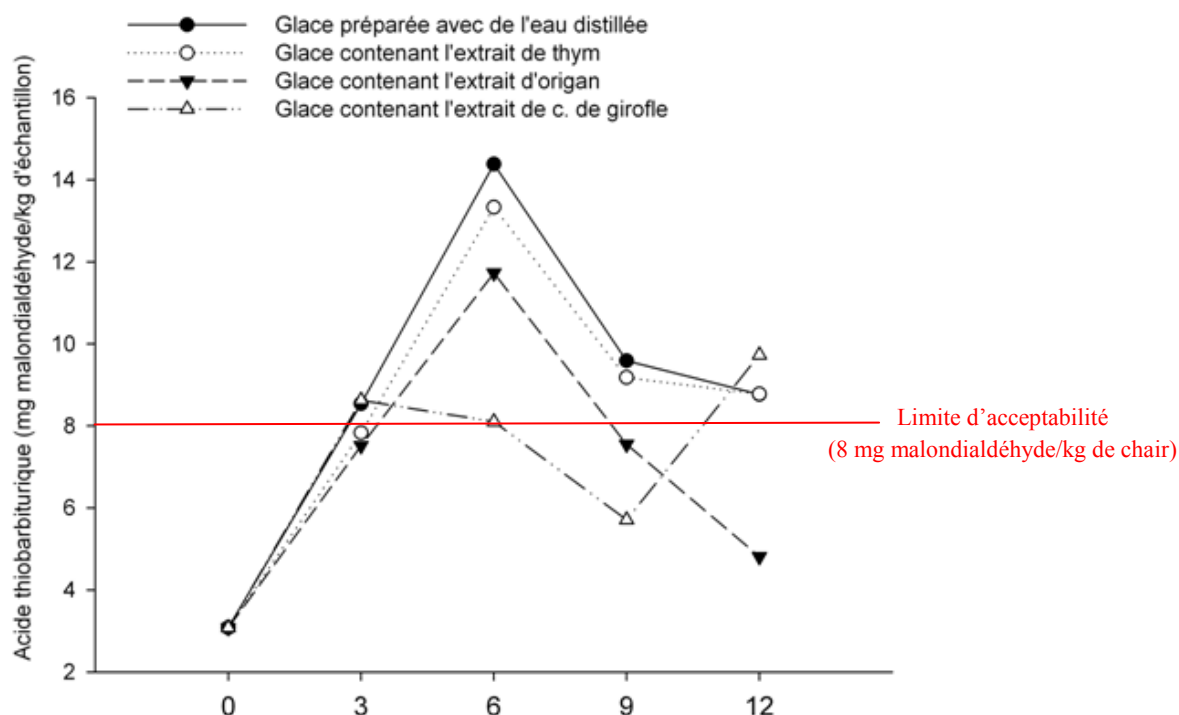


Figure 16: Effet de différentes conditions de glaçage sur la teneur en acide thiobarbiturique dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid. La ligne horizontale représente la limite d'acceptabilité

2.2.3.2.3. Hydrolyse des lipides

Au début de la conservation des échantillons de poissons, la valeur initiale en acides gras libres (AGL) était de 2,72 (% acide oléique) (Tableau 11). Une augmentation marquée de la teneur en AGL de l'ensemble des quatre groupes durant toute la période de conservation a été constatée (Figure 17). Cette activité hydrolytique élevée pourrait être expliquée par l'augmentation marquée du pH, ces valeurs atteintes représentent une plage optimale de pH pour l'activité des lipases (Lopez- Amaya et al., 2000a) et des phospholipases (Lopez- Amaya et Marangoni, 2000b). Dans la présente étude, aucune différence ($p > 0,05$) en AGL n'a été observée entre les groupes aux jours 6 et 9 de prélèvement (Tableau 11). D'autre part, le développement de l'hydrolyse des lipides s'est avéré plus élevé ($p < 0,05$) chez les anchois conservés sous glace préparée avec de l'eau distillée (aux jours 3 et 12) que ceux conservés sous glace contenant des extraits de plantes. Ces résultats pourraient être attribués à l'effet de composés phénoliques provenant des extraits de plantes qui inhibent l'action enzymatique à l'origine de la libération d'acides gras libres.

Tableau 11: Evolution des acides gras libres (acide oléique %), sous différentes conditions de glaçage au cours de la conservation des anchois sous froid.

Paramètre	Groupes	Durée de conservation (jours)				
		0	3	6	9	12
AGL	Lot témoin	1.78±0.23	2.38±0.25 ^a	2.19±0.41 ^a	2.94±0.42 ^a	5.98±0.49 ^a
	Thym	1.78±0.23	1.79±0.19 ^b	1.70±0.40 ^a	2.51±0.17 ^a	3.78±0.18 ^c
	Origan	1.78±0.23	1.79±0.35 ^b	1.95±0.09 ^a	2.88±0.80 ^a	5.39±0.39 ^{ab}
	C. de girofle	1.78±0.23	1.64±0.12 ^b	2.26±0.43 ^a	2.60±0.27 ^a	4.78±0.07 ^b

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart-type, n = 3. ^{a-c} Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes (p<0.05).

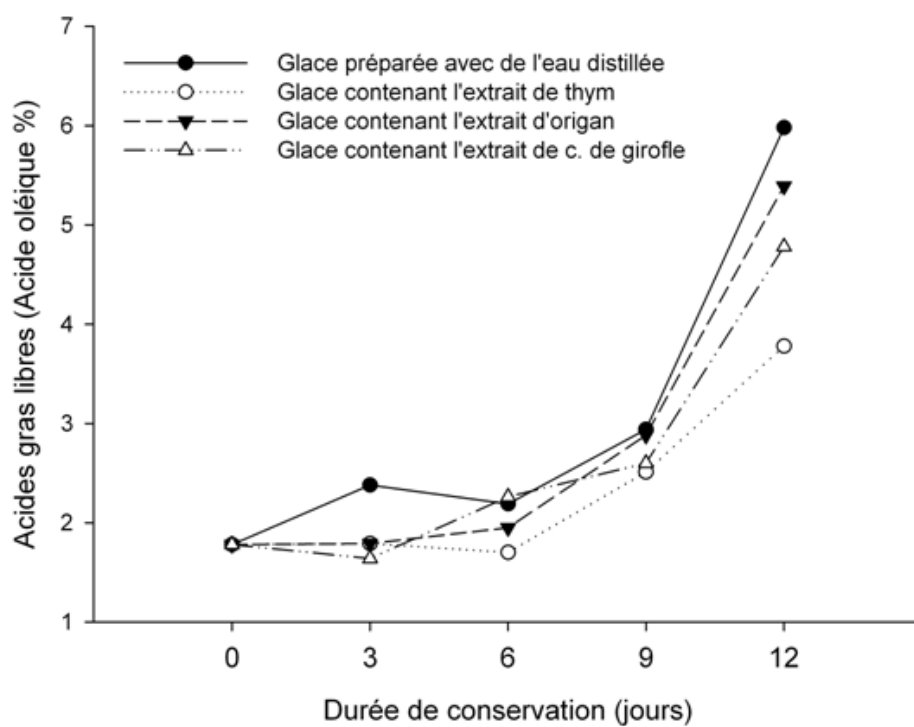


Figure 17 : Effet de différentes conditions de glaçage sur la formation d'acides gras libres dans la chair des anchois au cours de leur conservation sous froid.

2.2.3.3. Evaluation microbiologique

Dans les produits de la pêche, le taux de bactéries aérobies mésophiles est un précieux indicateur pour l'évaluation de la fraîcheur, de la durée de conservation et de la contamination du produit durant son traitement. Les bactéries psychrotrophes sont particulièrement responsables de l'altération des produits de la mer frais (Huss, 1994). L'évolution de la croissance microbienne dans la chair d'anchois (avec la peau) pendant le stockage sous froid dans les quatre conditions de glaçage est présentée dans le tableau 12.

Tableau 12: Evolution des bactéries aérobies mésophiles et des bactéries psychrotrophes, sous différentes conditions de glaçage, au cours de la conservation des anchois sous froid.

Groupes		Durée de conservation (jours)				
		0	3	6	9	12
Bactéries aérobies mésophiles (log UFC/g)	Lot témoin	4.33±0.17	5.82±0.12 ^{ab}	7.66±0.17 ^a	8.76±0.48 ^a	9.51±0.06 ^a
	Thym	4.33±0.17	5.60±0.34 ^b	6.57±0.01 ^b	8.45±0.08 ^a	8.14±0.41 ^c
	Origan	4.33±0.17	6.04±0.18 ^a	7.55±0.05 ^a	8.47±0.07 ^a	8.83±0.27 ^b
	C. de girofle	4.33±0.17	5.53±0.13 ^b	6.95±0.59 ^b	7.75±0.31 ^b	8.38±0.18 ^{bc}
Bactéries psychrotrophes (log UFC/g)	Lot témoin	4.47±0.13	6.27±0.15 ^a	8.28±0.04 ^a	9.13±0.46 ^a	10.26±0.18 ^a
	Thym	4.47±0.13	5.55±0.03 ^b	6.84±0.30 ^b	8.58±0.01 ^b	8.34±0.37 ^c
	Origan	4.47±0.13	6.15±0.41 ^a	8.06±0.06 ^a	9.23±0.05 ^a	9.47±0.08 ^b
	C. de girofle	4.47±0.13	5.67±0.02 ^b	6.62±0.03 ^b	8.37±0.10 ^b	9.13±0.43 ^b

Les résultats sont exprimés en moyenne ± Ecart-type, n = 3. ^{a-c} Les données sur une même colonne affectées d'une lettre différente sont significativement différentes (p<0.05).

La charge initiale relevée des bactéries aérobies mésophiles de tous les échantillons des quatre groupes était de 4,33 log UFC/g, ce qui indique que la qualité des anchois était acceptable, compte tenu de la limite d'acceptabilité des bactéries aérobies mésophiles proposée qui est de 10⁷ UFC/g de chair (7 log UFC/g) pour le poisson frais (ICMSF, 1986). Le taux des bactéries mésophiles dans les anchois conservés dans la glace préparée avec de l'eau distillée et dans la glace préparée avec de l'extrait d'origan a dépassé la valeur de 7 log UFC/g de chair au 6^{ème} jour de stockage. D'autre part, ce taux dans les anchois conservés dans la glace préparée avec l'extrait du thym et de clous de girofle a atteint 7 logs UFC/g de chair trois jours plus tard soit le 9^{ème} jour de stockage (Tableau 12).

Le faible taux initial des bactéries psychrotrophes de 4,47 log UFC/g indique une bonne qualité des anchois échantillonnés. Dans le groupe témoin et le groupe d'origan, le taux des bactéries psychrotrophes a dépassé la valeur de 6 log UFC/g de chair à J3, ce qui est considérée comme la limite d'acceptabilité pour les espèces marines (Erkan, 2007). D'autre part, dans les groupes de thym et de clous de girofle, le taux de bactéries psychrotrophes a dépassé la limite d'acceptabilité le 6^{ème} jour de stockage. La durée de vie des anchois déterminée par le jury d'analyses sensorielles a indiqué que les poissons n'étaient plus acceptables le 9^{ème} jour pour le groupe témoin et le 12^{ème} jour pour les groupes traités (Figures 12 et 13).

Ces résultats indiquent que l'évaluation sensorielle a montré une durée de vie plus longue des anchois conservés dans les quatre conditions de glaçage en rapport avec l'évaluation microbiologique.

Ainsi, certains auteurs ont suggéré que le thym, l'origan et les clous de girofle ont des propriétés bactéricides et bactériostatiques très importantes contre les microorganismes pathogènes et d'altération (Tajkarimi et al., 2010), alors que les résultats de la présente étude ont montré que les extraits de plantes utilisés étaient moins efficaces comme agents antibactériens pour la conservation des anchois. Cela peut être attribué à l'utilisation de faibles concentrations de ces extraits pour la préparation de la glace. L'efficacité réduite peut également être attribuée à l'utilisation d'extraits bruts qui contiennent des flavonoïdes sous forme glycosidique, où le sucre présent diminue l'efficacité contre certaines bactéries (Negi, 2012).

Conclusion générale

Les industries de production et de transformation des produits de la mer sont confrontées à l'adhésion des microorganismes sur les parois des équipements et sur les surfaces de travail malgré des procédures de nettoyage/désinfection systématiques. Ces microorganismes peuvent non seulement entraîner l'altération des propriétés organoleptiques des produits en cours de fabrication, mais également favoriser le développement de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Dans le cadre de cette problématique, l'amélioration de la sécurité alimentaire, ainsi que la durée de vie des produits est nécessairement couplée à la maîtrise de l'hygiène des surfaces en contact avec les produits de la mer. Le développement d'approches préventives basées sur l'incorporation des extraits bruts de plantes dans la glace utilisée pour la conservation des produits de la pêche, cible les phases précoces de la formation du biofilm sur les surfaces, et par conséquent la qualité organoleptique des produits conservés, et constitue donc une alternative intéressante.

Notre travail a été consacré à l'évaluation du degré de contamination des surfaces en contact avec les produits de la mer qui nous a permis de contrôler les conditions d'utilisation (concentrations, temps de contact et fréquence d'utilisation) des produits préconisés pour la détergence et la désinfection des surfaces à bord des navires et dans la halle à marée du port de Zemmouri (W. de Boumerdes). Les résultats obtenus au cours de cette partie ont permis de constater que ces conditions n'étaient pas réunies pour éliminer les microorganismes des surfaces contrôlées, en particulier, les biofilms. En effet, les concentrations en flore totale étaient significativement supérieures à la limite d'acceptabilité sur l'ensemble des surfaces contrôlées. Nos résultats montrent bien la sous-estimation de la contamination des surfaces de travail et d'équipements par les pêcheurs. Ils illustrent l'importance d'évaluer, de valider et de surveiller périodiquement les protocoles de nettoyage-désinfection, comme les recommandent les règles d'hygiène. Afin d'améliorer les protocoles de nettoyage-désinfection, il est nécessaire de proposer des seuils d'interprétation des résultats qui permettent de contrôler le niveau de propreté de chaque type de surface. Par ailleurs, nos travaux ont permis de comparer le niveau de contamination entre les quatre surfaces contrôlées, les résultats ont montré que la charge microbienne sur les surfaces des caisses à poissons est plus importante que sur les surfaces du parc à poissons, du pavois et du pont du navire de pêche. Nous avons confirmé qu'un temps de contact élevé entre une surface inerte et un produit de la mer favorise un développement considérable des microorganismes du biofilm. Il est également noté qu'il n'existe aucune

différence significative entre le niveau de contamination des surfaces des caisses en bois est celui des caisses en plastique, ce qui suggère qu'il est inutile d'exiger l'utilisation des caisses en plastique pour le transport et la conservation des produits de la mer sans une application rigoureuse et systématique d'un protocole de nettoyage-désinfection adéquat. Cette étude a présenté l'avantage d'intégrer plusieurs paramètres pouvant être à l'origine des échecs du protocole de nettoyage et de désinfection des surfaces en contact avec les produits de la mer.

Il a été également proposé un dispositif de prélèvement par écouvillonnage pour le contrôle de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des surfaces inertes et planes des équipements et des surfaces de travail dans les industries agroalimentaires. Cet écouvillonnage est suivi généralement d'un dénombrement semi-quantitatif de la charge microbienne ou d'une mesure d'ATP (Adénosine triphosphate) pour le contrôle microbiologique et physicochimique des surfaces. Ce dispositif présente plusieurs intérêts, le plus intéressant c'est de standardiser les méthodes de prélèvement et de fournir aux investisseurs l'avantage de le produire de façon industrielle étant à usage unique et utilisable par les industries agroalimentaires et même pharmaceutiques. Aujourd'hui, l'amélioration et l'application de ce dispositif passent cependant par une prise en compte de l'intérêt qu'il représente à travers une étroite collaboration entre fournisseurs de matériel, chercheurs et industriels.

Ce travail a aussi montré l'état de nos connaissances sur l'action antimicrobienne des extraits de plantes contre les bactéries du biofilm dans les écosystèmes réels de transformation des aliments. Diverses approches sont actuellement à l'étude pour réduire l'adhérence des micro-organismes sur la surface inerte. Il s'agit notamment de prévenir la fixation initiale sur la surface ou d'inhiber la croissance d'un biofilm établi. Dans notre étude, nous avons montré que la glace préparée avec des extraits de thym, d'origan et de clous de girofle était moins efficace dans la prévention de la formation de biofilm et l'éradication des biofilms matures déjà formés sur des surfaces en polyéthylène haute densité (PEHD). Il serait possible de contrôler la formation et l'accumulation de biofilm en utilisant des concentrations plus élevées, mais l'application pratique de ces extraits de plantes possède certaines limites (goût amer et une forte odeur de chair de poisson). Par ailleurs, nous avons abordé la diversité des populations de *Pseudomonas* spp. et de *Shewanella putrefaciens* après isolement, purification et identification des souches bactériennes présentes sur les surfaces des coupons (PEHD) en contact avec l'anchois conservé dans la glace préparée avec de l'eau distillée et la glace traitée par les extraits de plantes testées : le thym, l'origan et les clous de girofle sur les cent soixante isolats collectés ; il en ressort que la majorité des isolats obtenus appartenant aux espèces *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. stutzeri*, alors que le nombre de

souches isolées de *Shewanella putrefaciens* était très réduit malgré que la flore du poisson frais conservé sous glace est composée majoritairement de cette espèce. Nous avons conclu que la microflore de poissons fraîchement pêchés ne reflète pas nécessairement la microflore adhérente sur le milieu environnant. Cette partie d'étude montre aussi que le traitement de la glace par les extraits de plantes n'entraîne pas une réduction significative du nombre de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* qui sont incriminées dans l'altération de la chair du poisson frais. Il serait donc intéressant de sélectionner quelques souches bactériennes résistantes et d'étudier in vitro leur comportement à des concentrations différentes d'extraits afin de voir si le phénomène de persistance de ces souches est corrélé à un phénomène de résistance aux extraits s'ils sont utilisés dans l'industrie. En outre, l'extrait éthanolique de girofle possède une teneur en composés phénoliques totaux plus élevée suivie par l'origan et le thym. De plus, il y avait une bonne corrélation entre la capacité anti-biofilm et la teneur en composés phénoliques. Ainsi, nous proposons de nouvelles recherches en utilisant d'autres extraits naturels de plantes contre les biofilms bactériens, il existe peu de travaux sur ce point, mais les travaux déjà menés ont montré des résultats encourageants.

Les anchois éviscérés, étêtés et conservés dans la glace préparée avec les extraits de plantes choisis ont montré une qualité physicochimique et microbiologique satisfaisante en raison des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de ces extraits. L'analyse sensorielle a indiqué que la durée de vie de l'anchois a été de 9 jours pour le groupe témoin et 12 jours pour les groupes traités. Nous pouvons dire que les extraits naturels de plantes peuvent être utilisés par les industriels de l'agroalimentaire pour améliorer la durée de conservation des produits de la mer en raison d'un pouvoir antioxydant et antimicrobien. L'utilisation de glace contenant des extraits de plantes aromatiques à des concentrations plus élevées se traduira probablement par une augmentation plus importante de la durée de vie des poissons, mais l'utilisation de ces extraits de plantes à des concentrations élevées pourrait probablement conférer aux produits de la mer des propriétés sensorielles désagréables (goût amer et forte odeur). En outre, l'utilisation potentielle d'extraits de plantes, comme conservateurs dans les aliments, doit être soigneusement évaluée en fonction de leurs caractéristiques sensorielles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal, V., Lal, P. and Pruthi, V. (2008). Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*. 165, 13-19.
- Aksnes, A. and Brekken, B. (1988). Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 45, 53-60.
- Aksnes, A., Gjerde, B. and Roald, S.O. (1986). Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. 53, 7-20.
- Al-Amoudi, A. and Lovitt, R.W. (2007). Fouling strategies and the cleaning system of NF membranes and factors affecting cleaning. *Journal of Membrane Science*. 303, 4-28.
- Alçiçek, Z. (2011). The effects of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil concentration on liquid smoked vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fillets during chilled storage. *Food Chemistry*. 128, 683-688.
- Allegrucci, M. and Sauer, K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *streptococcus pneumonia* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 189, 2030-2038.
- Alzel, I., Martinez Lopez, F.X., Métailler, R., Stéphan, G., Viau, M., Gandemer, G., and Guillaume, L. (1994). Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salma trutta*) reared in seawater. *Aquaculture*. 123, 361-375.
- Andersson, S. (2009). Characterization of bacterial biofilms for wastewater treatment. Thèse de Doctorat. Stocholm, Royale Istitute of Technology, school of Biotechnology. 63p.
- ANDI (Agence Nationale de Développement de l'Investissement). (2013). Wilaya de Boumerdes. 24p. Disponible: <http://www.andi.dz/PDF/monographies/boumerdes.pdf> (consulté le 08/03/2014).
- Anonyme. (1995). Viandes et produits à base de viande : Dénombrement des *Pseudomonas* spp. ISO 13720/1995.
- Anonyme. (1999a). ISO. Microbiologie des aliments : préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales. ISO 6887-1, Genève : ISO, 1999, 5p.
- Anonyme. (1999b). AFNOR. Microbiologie des aliments : dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30 degrés Celsius – Méthode de routine. NF V08-051. Paris : AFNOR, 8 p.
- Anonyme. (2004). Microbiologie des aliments - Méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. International Standard NF ISO 18593. Association Française de Normalisation, La Plaine Saint Denis, France.
- Anonyme. (2010). Arrêté interministériel du 13 Joumada El Oula 1431 correspondant au 28 avril 2010 portant adoption du règlement technique relatif aux caractéristiques des contenants pour l'entreposage et le transport des produits de la pêche et de l'aquaculture. pp. 21-24.
- Antonocopoulos, N. (1973). Bestmmung des Flüchtigen Basensticktoofs. In: Ludorf, W. and Meyer, V. (Eds.). Fische und Fischerzeugnisse. Aulage Verlag Paul Prey, Berlin. pp. 224-225.

- A.O.C.S. (1994). *The official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society* pp. Ca 5a-40, Cd 8-53. Champaign, IL: The American Oil Chemists' Society.
- Arce, L., Rios, A. and Valcárcel, M. (1997). Selective and rapid determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*. 46, 170-176.
- Arguello, M.A., Alvarez, S., Riera, F.A. and Alvarez, R. (2003). Enzymatic cleaning of inorganic membranes used for whey protein fractionation. *Journal of Membrane Science*. 216, 121-123.
- Ashie, I.N.A., Smith, J.P. and Simpson, B.K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish hand shell fish. *Crit. Rev. Food Science & Nutrition*. 36, 87-121.
- Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I., Savvaidis, I.N. (2009). Combined effect of vacuum packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4°C. *Food Microbiology*. 26, 166-172.
- Aubourg, S.P. (1993). Review: interaction of malondialdehyde with biological molecules – new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology*. 28, 323-335.
- Aubourg, S.P. (2001a). Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78, 857- 862.
- Aubourg, S.P. (2001b). Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 385-390.
- Aubourg, S.P., Sotelo, C.G. and Pérez-Martin, R. (1998a). Assessment of quality changes in frozen sardine (*Sardina pilchardus*) by fluorescence detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75, 575-580.
- Aubourg, S.P., Medina, I. and Gallardo, J.M. (1998b). Quality Assessment of Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) during Chilled Storage by Monitoring Lipid Damages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 3662-3666.
- Bagge-Ravn, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. and Gram, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and environmental Microbiology*. 67, 2319-2325.
- Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*. 83-94.
- Banks, K.M, Bryers, J.D. (1992). Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces. *Biofouling*. 6, 81-86.
- Beaulieu, M.A. and Guderley, H. (1998). Changes in qualitative composition of white muscle with nutritional status of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 121, 135-141.
- Bechmann, I.E. and Jørgensen, B.M. (1998). Rapid Assessment of Quality Parameters for Frozen Cod Using Near Infrared Spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*. 31, 648-652.
- Becker, P., Hufnagle, W., Peters, G. and Hermann, M. (2001). Detection of different gene expression in biofilm forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus*

- using microrepresentational-difference analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 6, 2958-2965.
- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.M. and Henry, N. (2008). A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *Plos Biology*, 6:7, 1549-1558.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorff, K. and Zehnder, A.J.B. (1993) Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 3973-3977.
- Benzie, I.F.F. (1996). Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 47, 223-261.
- Berg, J.D., Matin, A. and Roberts, P.V. (1982). Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Applied and Environmental Microbiology*. 44, 814-818.
- Beveridge, T.J. (2006). Visualizing bacterial cell walls and biofilms. *Microbe*. 1, 279-284.
- Bhosale, S.H., Nagle, V.L. and Jagtap, T.G. (2002). Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine Biotechnology*. 4, 111-118.
- Billot, J., Hartmann, C., Macheix, J.J. and Rateau, J. (1978). Phenolic Compounds During Passe- Crassane Pear Growth. *Physiologie Vegetale*. 16, 693-714.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P., Burmolle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A.J., Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Hoiby, N. and Givskov, M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. *Microbiology*, 151, 373 - 383.
- Blight, E.G., Shaw, S.J. and Woyewoda, A.D. (1988). Effects of drying and smoking on lipids of fish. In: Burt J.R. (Ed.). Fish smoking and drying. Elsevier London : Applied Science. pp. 41-52.
- Blood, R.M. (1975). Lactic acid bacteria in beverages and foods. In: Proc. 4th Long Ashton Symposium (1973). London, Academic Press, 195 p.
- Bodmer, S., Imark, C. and Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research*. 48, 296-300.
- Body, D.R. and Vlieg, P. (1989). Distribution of the lipid classes and eicosapentaenoic (20:5) and docosahexaenoic (22:6) acids in different sites in blue mackerel (*Scomber australasicus*) filets. *Journal of Food Science*. 54, 569-572.
- Boizot, N., and Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. pp. 79-82.
- Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A. and Trakatelis, G. (1994). Rapid, sensitive and specific Thiobarbituric method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1931-1937.

- Botta, J.R. (1991). Instrument for nondestructive texture measurement of raw Atlantic cod (*Gadus morhua*) fillets. *Journal of Food Science*. 56, 962-968.
- Botta, J.R., Kennedy, K.M., Kiceniuk, W. and Legrow, J. (1992). Importance of redfeed level, fish size and roe content to the quality of roe capelin. *International Journal of Food Science & Technology*. 27, 93-98.
- Boulangé-Petermann, L., Rault, J. and Bellon-Fontaine, M.N. (1997). Adhesion of *Streptococcus Thermophilus* to Stainless Steel with Different Surface Topography and Roughness. *Biofouling*. 11, 201-216.
- Bourgeois, C.M. and Larpent, J.P. (1996). Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires. Paris: Lavoisier Technique & documentation, 2ème édition, 523p.
- Boyd, L.C., Green, D.P. and Lepors, L.A. (1992). Quality changes of pond raised hybrid striped bass during chillpack and refrigerated storage. *Journal of Food Science*. 57, 59-62.
- Boyd, R.D., Verran, J., Jones, M.V. and Bhakoo, M. (2002). Use of the atomic force microscope to determine the effect of the substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir*. 18, 2343-2346.
- Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R. and Kolteret, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 98, 11621- 11626.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. and Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13, 20-26.
- Bremner, H.A. and Hallett, I.C. (1985). Muscle fiber-connective tissue junctions in the blue grenadier (*Macruronus novaezelandiae*). *Journal of Food Science*. 50, 975-980.
- Briandet, R., Herry, J. and Bellon-Fontaine, M. (2001). Determination of the van der waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static gram positive microbial biofilms. *Colloids and Surface B : Biointerface*. 21, 299-310.
- Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S. and Briandet, R. (2011). The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *Plos One*. 6,1.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Bouttefroy, A. and Leroi, F. (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 1029-1037.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M. and Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative stain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 104, 309-324.
- Brooks, J.D. and Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*. 43, 2163-2176.
- Brown, M.R.W., Allison, D.G. and Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: A growth-rate related effect. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 22, 777-780.

- Burmolle, M., Hansen, L.H. and Sorensen, S.J. 2007. Establishment and Early Succession of a Multispecies Biofilm Composed of Soil Bacteria. *Microbial Ecology*. 54, 352-362.
- Burt, S.A. (2004a). Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 22-25.
- Burt, S.A. (2004b). Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen. *Journal International de Microbiologie des Aliments*, 94, 223-253.
- Bury- Moné, S. (2007) Les biofilms. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
- Cacace, J.E. and Mazza, G (2003) Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. 59, 379-389.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. and Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*. 18, 391-397.
- Campanac, C., Pineau, L., Payard, A., Baziard-Mouysset, G. and Roques, C. (2002). Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 1469-1474.
- Campos, C.A., Rodriguez, O., Losada, V., Aubourg, S.P. and Barros-Velazquez, J.T. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*. 103, 121-130.
- Cann, D. C., Smith, G.L. and Houston, N.C.. (1983). Further Studies on Marine Fish Storage Under Modified Atmosphere Packaging. Technical report. Torry Research Station, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Aberdeen, Scotland.
- Cann, D.C., Houston, N.C., Taylor, L.Y., Stroud, G., Early, J. and Smith, G.L. (1985). Studies on shellfish packed and stored under a modified atmosphere. Technical report. Torry Research Station, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Aberdeen, Scotland.
- Cann, D.C., Houston, N.C., Taylor, L.Y., Smith, G.L., Thomson, A.B. and Craig, A. (1984). Studies of salmonids packed and stored under a modified atmosphere. Technical report. Torry Research Station, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Aberdeen. Scotland.
- Carpentier, B., Marouani-Gadri, N. and Augier, G. (2009). Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection -Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 133, 62-67.
- Chang, S.T., Chen, P.F. and Chang, S.C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 77, 123-127.
- Characklis, W.G. (1990). Microbial fouling. In: Characklis, W.G. and Marshall K.C. (Eds.). Biofilms. Wiley, New York. pp. 523-584.
- Characklis, W.G. and Cooksey, K.E. (1983). Biofilms and microbial fouling. *Advances in Applied Microbiology*. 29, 93-138.
- Characklis, W.G. (1973). Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*. 7, 1249-1258.

- Characklis, W.G, Turakhia, M.H. and Zilver, N. (1990a). Transport and interfacial transfer phenomena. In: Characklis, W.G and Marshall, K.C (Eds.). *Biofilms*. Willey, New-York. pp. 316–340.
- Characklis, W.G., McFeters, G.A. and Marshall, K.C. (1990b). Physiological Ecology in Biofilm Systems. In: Characklis, W.G and Marshall, K.C (Eds.). *Biofilms*. Willey, New-York. pp. 341-394.
- Chen, X. and Stewart, P.S. (2000). Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research*. 34, 4229-4233.
- Chevallier, I. (2002). Influence des interactions acido-basiques sur l'encrassement et la biocontamination de supports métalliques oxydés. Thèse de Doctorat. Université Paris XI Orsay, 155p.
- Chiba, A., Hamaguchi, M., Kosaka, M., Tokuno, T., Asai, T. and Chichibu, S. (1991). Quality Evaluation of Fish Meat by ³¹ Phosphorus-Nuclear Magnetic Resonance, Blackwell Publishing, Ltd. 56, 660-664.
- Choi, Y.C. and Morgenroth, E. (2003). Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science and Technology*. 47, 69-76.
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A. and Nychas, G.J. (2008) Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*. 104, 1586-1596.
- Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., Knottenbelt, D., Clegg, P.D., Cochrane, C.A. and Percival S.L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 121, 1-17.
- Compère, C., Bellon-Fontaine, M.N., Bertrand, P., Costa, D., Marcus, P., Poleunism, C., Pradier, C.M. Rondot, B. and Walls, M.G., (2001). Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*. 17, 129-145.
- Conway, E.J. (1947). Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood and Sons. London, U.K, 357p.
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G.A., Beucher, E., Saiter, J.M. and Jouenne, T. (2002). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 26, 373-378.
- Corraze, G. and Kaushik, S. (1999). Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *OCL*. 6, 111-115.
- Costerton, J.W. (1999). Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11, 217-221.
- Costerton, J.W. (2004) A short history of the development of the biofilm concept. Methods of studying biofilms. In: Ghannoum, M and O'Toole, G.A (Eds). *Microbial biofilms*, ASM Press. 4-19.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*. 238, 86-95.

- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49, 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284, 1318-1322.
- Courfort, C., Derlon, N., Ochoa-Chaves, J., Liné, A. and Paul, E. (2007). Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. *Water Science and Technology*. 55, 421-428.
- Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A. and Scaife, J.R. (2005). Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and nearinfrared spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology* . 38, 821-828.
- Cristiani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G. and Micieli, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 6300-6308.
- Cuendet, M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie: "*Fagraea blumei*" (*Loganiaceae*) et de trois plantes d'altitude: "*Bartsia alpina*" (*Scrophulariaceae*), "*Loiseleuria procumbens*" (*Ericaceae*) et "*Camp*". Thèse de doctorat, pp. 24.
- Dalgaard, P. (1993). Evaluation and prediction of microbial fish spoilage. Thèse de Doctorat. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and the Royal Veterinary and Agricultural University. Denmark, 169p.
- Dalleau, S., Cateau, E., Berges, T., Berjeaud, J.M. and Imbert, C. (2008). In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31, 572-576.
- Daniel, R., Vanderleyden, J. and Michels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 28, 261-289.
- Davidson, C.A. (2001). An evaluation of some microbiological and ATP bioluminescence methods for the recovery and detection of bacterial contamination from food contact and environmental surfaces. PhD thesis, University of Wales.
- Davidson, P.M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (Eds.). *Food microbiology fundamentals and frontiers*. ASM. New York. pp. 520-556.
- Davies, G. (2000). Physiological events in biofilm formation. In: Allison, D.G, Gilbert, P, Lappin-Scott, H.M, Wilson, M. (Eds). *Community Structure and Co operation in Biofilms*, Society for General Microbiology Symposia. pp 37-52.
- De Beer, D., Srinivasan, R. and Stewart, P.S. (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 4339-44.
- De Koning, A.J. and Mol, T.H. (1990). Rates of free fatty acid formation from phospholipids and neutral lipids in frozen cape hake (*Merluccius* spp.) mince at various temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 50, 391-398.

- De Laubenfels, E. (2001). Control of biofilm in aquatic systems. *Selected paper in Biofilm and Biodiversity, Virtue special reports*. Available from: <http://www.mdsg.umd.edu/wit/paper/htm> [Accessed on 10/03/2010].
- Deberghes, P., Kleiss, T., Cordier, J.L., Vincent, J.P., Hornez, J.-P. and Catteau, M. (1995). Amélioration de l'efficacité du prélèvement de surface par utilisation d'éponges. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. 13, 409-412.
- Decho, A.W. (2010). Overview of biopolymer-induced mineralization: what goes on in biofilms?. *Ecological Engineering*. 36, 137-144.
- Delille, A. (2007). Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy I. pp. 21.
- Dequeiroz, G. A. and Day D. F. (2007). Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 794-802.
- Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N. and Paul, E. (2008). Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research*. 42, 2102-2110.
- Devaraju, A.N. and Setty, T.M.R. (1985). Comparative study of fish bacteria from tropical and cold/temperate marine waters. Spoilage of tropical fish and product development. FAO Fisheries Report.
- Dhar, N. and Mckinney, J.D. (2007). Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Current Opinion in Microbiology*. 10, 30-38.
- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. and Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*. 154, 9-16.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 881-889.
- Donlan, R.M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. 7, 277- 281.
- Donlan, R.M. (2008). Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322: 133-161.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 167- 193.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and MontVile, T.J. (Eds). (1997). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington DC: ASM Press, 94 p.
- Dunajski, E. (1980). Texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*. 10, 301-318.
- Duong, N. T. H. (2005). The Sanitizing Efficiency Of Different Disinfectants Used In The Fish Industry. UNU. Fisheries Training Programme.

- Dyer, W.J. and Fraser, D.I. (1959). Proteins in Fish Muscle. 13. Lipid Hydrolysis. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. 16, 43-52.
- Eberl, H.J., Picioreanu, C., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2000). A three dimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conservation in biofilms. *Chemical Engineering Science*. 55, 6209-6222.
- Edziri, H., Ammar, S., Souad, L., Mahjoub, M.A., Mastouri, M., Aouni, M., Mighric, Z. and Verschaeve, L. (2012). In vitro evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of some Tunisian vegetables. *South African Journal of Botany*. 78, 252-256.
- Einarsson, H. and Lauzon, H.L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 669-676.
- El abed, S., Ibnsouda, k.S., Latrache, H., Zineb, G., Mouradi, H. and Remmal, A. (2011). Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African Journal of Microbiology Research*. 5, 3229-3232.
- El Kalamouni, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. pp. 55.
- El Marrakchi, A., Bennour, B., Bouchriti, N., Hamama, A. and Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*. 53, 600-605.
- Elasri, M.O. and Miller, R.V. (1999). Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2025-2031.
- Erkan, N. (2007). Freshness and quality of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Arch Lebensmittelhyg*. 58, 98-106.
- Erkan, N. and Bilen, G (2010) Effect of essential oils treatment on the frozen storage stability of chub mackerel fillets. *J Verbr Lebensm*. 5,101-110.
- Erkan, N., Özden, Ö. and İnuğur, M. (2007). The effects of modified atmosphere and vacuum packaging on quality of chub mackerel. *International Journal of Food Science & Technology*. 42, 1297-1304.
- Erkan, N., Tosun, S.Y., Ulusoy, S. and Uretener., G. (2011). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *J. Verbr. Lebensm*. 6, 39-48.
- Ertürk, Ö., Kati, H., Yayli, N. and Demirbag, Z. (2003). Antimicrobial activity of *Viscum album* L. *subsp. abietis* (Wiesb). *Turkish Journal of Biology*. 27, 255-258.
- Escribano-Bailon, M.T. and Santos-Buelga, C (2003). Polyphenol extraction from foods. In: Santos Buelga, C. and Williamson, G. (eds). *Methods in polyphenol analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom. pp. 1-16.
- Evans, R.J. and Reynhout, G.S. (1992) "Alternates to synthetic antioxidants." . *Food Science and human Nutrition*. 29, 27-42.

- Eymard, S. (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de Doctorat. Ecole polytechnique de l'Université de Nantes. pp. 33.
- Feier, U. and Goetsch, P.H. (1993). Inter-laboratory studies on precision characteristics of analytical methods. Determination of biogenic amines in fish and fish products - HPLC method. *Archive fur Lebensmittelhygiene*. 44, 134-135.
- Feliciano, L., Lee, J., Lopes, J.A. and Pascall, M.A. (2010). Efficacy of sanitized ice in reducing bacterial load on fish fillet and in the water collected from the melted Ice. *Journal of food science*. 75, 231-238.
- Fellows, P. (1997). Traditionnal foods processing for Profits. In Fellow, P. (ed.). Meat, Fish and dairy products, Chap 6. London: Intermediate Technology Publication. pp. 163-191.
- Fernandez, J., Perez-Alvarez, J.A. and Fernandez-Lopez, J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*. 59, 345-353.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Griebe, T. and Mayer, C. (2000). Physico-chemical properties of Biofilms. Biofilms: Recent advances in their study and controle. L. V. Evans, Harwood Academic Publishers.
- Flemming, H.C., Neu, T. and Wozniak, D. (2007). The EPS matrix: The "House of biofilm cells. *Journal of bacteriology*. 189, 7945-7947.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 623-633.
- Flemming, H.C. and Geesey, G.G. (1991). Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, 220p.
- Fletcher, M. (1976). Physicochemical aspects of marine bacterial attachment to solid-surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*. 41:3, R17.
- Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium substratum separation distance. *Journal of Bacteriology*. 170, 2027-2030.
- Fletcher, M. and Loeb, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 37, 67-72.
- Fletcher, S.A. and Csonka, L.N. (1998) Characterization of induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Food Microbiology*. 15, 307-317.
- Franco, D.J.S., Rubilar, M., Sanchez, M., Jerez, M., Pinelo, M.N.C. and Nunez, M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 7, 3210-3216.
- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. (2010). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology*. 27, 115-121.
- Frank, J.F. and Koffi, R.A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*. 53, 550-554.
- Frankel, E.N. (1998). Lipid oxidation. The Oily Press (vol. 10). Dundee, Scotland.

- Frankel, E.N. and Meyer, A.S. (2000). "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." *Journal of science of food and agriculture*. 80, 1925-1941.
- Fuhrman, B., Lavy, A. and Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 61, 549-554.
- Fujioka, R.S., Tenno, K. and Kansako, S. (1988). Naturally occurring fecal coliforms and fecal streptococci in Hawaii's freshwater streams. *Toxicity Assessment*. 3, 613-630.
- Fuqua, C. and Greenberg, E.P. (2002). Listening in on bacteria acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. 3, 685-695.
- Garcia-Lopez, M. L., Prieto, M., & Otero, A. (1998). The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. In: Board, R. G. and Davies, A. R. (Eds.). *The microbiology of meat and poultry*. Blackie Academic and Professional, London. pp. 1-34.
- Gardner, H.W. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27, 220-229.
- Gauthier, M.J, Munro, P.M. and Breittmayer, V.A. (1989). Influence of prior growth-conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Canadian Journal of Microbiology*. 35, 379-383.
- Geesey, G.G., (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *American Society for Microbiology News*. 48, 9-14.
- Gennari, M., Tormaselli, S. and Cotrona, V. (1999). The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. *Food Microbiology*. 16, 15-28.
- Genot, C. (2000). Congélation et qualité de la viande. Techniques et pratiques, INRA Editions, Paris, 98p.
- Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A. and Chobert, J.M. (2003). Protein Alterations Due to Lipid Oxidation in Multiphase Systems. In: Kamal-Eldin, A. (Ed.). *Lipid oxidation pathways*, AOACS, Press Champaign. pp. 265-292.
- Genzer, J. and Efimenko, K. (2006). Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling*. 22, 339-360.
- Gérard, P. (1989). Méthode moderne de séchage du poisson. *Nouv. Sci. Technol*. 7, 127-130.
- German, J.B., Chen, S.E. and Kinsella, J.E. (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic initiation via lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33, 680- 683.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S. and Brooks, M.S. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *Brooks American Journal of Applied Sciences*. 7, 859-877.
- Ghigo, J.M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 412, 442-445.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*. 7, 894-906.

- Goller, C. and Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322, 37-66.
- Gomez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Medale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S. and Perez-Sanchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- Gonzales, R. (1995). Etude comparative des différentes techniques manuelles de contrôle de l'état microbiologique des surfaces, Université de Paris XII-Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires, Paris.
- Goulas, A. E. and Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. 100, 287-296.
- Gram, L. (1990). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice and at ambient temperature. Paper presented at SEAFOOD 2000 in Halifax, Canada. 12-16 May 1990.
- Gram, L. and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 33, 121-131.
- Gram, L. and Huss, H.H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. In: Lund, B. M., Baird-Parker, A. C. and Gould, G. W. (Eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Foods*. Chapman & Hall, London. pp. 472- 506.
- Gram, L., Oundo, J. and Bon, J. (1989). Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on storage temperature and initial bacteria load. *Tropical Science*. 29, 221-236.
- Gram, L., Trolle, G. and Huss, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0j) and high (20j) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 4, 65- 72.
- Greaser, M.L. and Pearson, A.M. (1999). Flesh foods and their analogues. In: Food texture measurement and perception. A. J. Rosenthal. Aspen Publication, Gaithersburg. pp. 236- 246.
- GRET (Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques) et CTA (Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale). (1993). Paris : le Point Sur. 286 p.
- Griffith, C. (2005). Improving surface sampling and detection of contamination. In: Lelieveld, H. L. M., Mostert, M. A. and Holah, J. (Eds.). *Handbook of hygiene control in the food industry*, chap 36. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. 714p.
- Griffith, C. J. and Moore, G. (2004). An evaluation of new microbiological surface sampling kits. International Association for Food Protection Conference in Phoenix, Arizona, August.
- Gunasekera, R.M., Shim, K.F. and Lam, T.J. (1997). Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. 152, 205-221.
- Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H. and Thorkelsson, G., (2005). Microbial Adhesion to Processing lines for Fish Fillets and Cooked Shrimp: Influence of Stainless Steel Surface Finish and Presence of Gram-Negative bacteria on the Attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technological Biotechnology*. 43, 55-61.

- Guðbjörnsdóttir, B., Lauzon, H.L., Guðmundsdóttir, S. and Þorkellson, G. (2004). Adhesion of Bacteria to Processing Surfaces of Sea catch. *Project Report 09-04*. Icelandic Fisheries Laboratories, Reykjavík, Iceland.
- Haard, N. (2002). The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. In: H.A. Bremner (Ed.). *Safety and quality issues in fish processing*. Cambridge, UK, Woodhead Publishing in Food Science and Technology. pp. 221-254.
- Haard, N.F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*. 25, 289-307.
- Hakkinen, S.H. and Torronen, A.R. (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*. 33, 517-524.
- Halliwell, B. (1995). Antioxydant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 49: 1341-1348.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. and Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*. 66, 410-417.
- Harbron, R.S. and Kent, C.A. (1988). Aspects of cell adhesion. In Melo, L.F., Bott, T.R. and Bernardo, C. A. (Eds.). NATOASI series, Vol. 145. pp. 125–140.
- Harrigan, W.F. and McCance, M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press Inc. London. 464 p.
- Harrison, J.J., Turner, R.J. and Ceri, H. (2005). Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 7, 981-994.
- Haugen, J.E., Chanie, E., Westad, F., Jonsdottir, R., Bazzo, S., Labreche, S., Marcq, P., Lundby, F. and Olafsdottir, G. (2006). Rapid control of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) quality by electronic nose: Correlation with classical evaluation methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 116, 72-77.
- Hebard, C.E., Flick, G.J. and Martin, R.E. (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In: Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E. and Ward, D.R. (Eds). *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. pp.149-304.
- Heimeur, N., Idrissi Hassani, L.M. and Amine-Serghini, M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*. 3, 37-42.
- Himelbloom, B. H., Crapo, C., Brown, E. K., Babitt, J. and Repond, K. (1994). Pink salmon (*Onchorynchus gorbusha*) quality during ice and chilled seawater storage. *Journal of Food Quality*. 17, 197-210.
- Holah, J.T. (2003). Cleaning and disinfection. In : Lelieveld, H.L.M., Mostert, M.A., Holah, J. and White, B. (Eds.). *Hygiene in food processing*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. pp. 335-378
- Holah, J.T. and Thome, R.H.. (1990). Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 599-608.

- Horner, W.F.A. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In: Hall, G.M. (Ed.). *Fish Processing Technology*. London: Blackie Academic & Professional, 2nd ed., 32 p.
- Houari, A. (2009). Caractérisation de biofilms formés à la surface de membranes de nanofiltration dans un processus de production d'eau potable et stratégies de lutte anti-biofilm. Thèse de Doctorat. Université de Cergy-Pontoise (France). pp. 68.
- Howgate, P. (1994). Proposed draft Guideline for the Sensory Evaluation of Fish and Shellfish. CX/FFP 94110. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Fish and Fishery Products. Twenty first session, Bergen, Norway.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J. and Costerton, J.W., (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36, 2054-2056.
- Hsieh, R.J., Kinsella, J.E. and John, E.K. (1989). Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish. *Advances in Food and Nutrition Research*. 33, 233-341.
- Hsieh, R.J. and Kinsella, J.E. (1989). Lipxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37, 279-286.
- Hsieh, T.C., Williams, S.S., Vejaphan, W. and Meyers, S.P. (1989). Characterization of volatile components of menhaden fish (*Brevoortia tyrannus*) oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 66, 114-117.
- Hultin, H.O. (1994). Oxidation of lipids in seafoods. In: Shahidi, F. and Botta, J.R. (Eds) *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality*. Blackie Academic & Professional. New York. pp. 49-74.
- Huss, H.H. (1994). Assurance of seafood quality, Rome: FAO Fisheries Technical Paper No. 334.
- Huss, H.H. (1999). La qualité et son évolution dans le poisson frais. Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, 206 p.
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. Rome, FAO.
- Huss, H.H., Dalsgaard, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen, A. and Zittan, L. (1974). The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice. *Journal of Food Technology*. 9, 213-221.
- Huss, H.H. and Asenjo, L. (1976). 1. Storage life of gutted and unsoiled white fish. In: Annu. Rep. Technological Laboratory, Danish Ministry of Fisheries, Technical University, Lullaby, Denmark.
- Hussain, M., Collins, C., Hastings, J.G. M. and White, P.J. (1992). Radiochemical assay to measure the biofilm produced by coagulase- negative staphylococci on solid surfaces and its use to quantitate the effects of various antibacterial compounds on the formation of biofilm. *Journal of Medical Microbiology*. 37, 62-69.
- Hwang, D.F., Chang, S.H., Shiua, C.Y. and Tuu-jyi, C. (1997). High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 693, 23-30.

- Hwang, K.T. and Regenstien, J.M. (1993). Characteristics of Mackerel Mince Lipid Hydrolysis. *Journal of Food Science*. 58, 79-83.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1986). Sampling plans for fish and shellfish. In: ICMSF. Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications (2nd ed., Vol. 2). University of Toronto Press, Toronto. pp. 181-196.
- Irie, Y. and Parsek, M.R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322, 67- 84.
- Irkin, R. and Korukluoglu, M. (2009) Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *Journal of Medicinal Food*. 12, 193-197.
- Ivleva, N., Wagner, M., Szkola, A., Horn, H., Neissner, R. and Haisch, C. (2010). Label-Free in situ SERS imaging of biofilms. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114, 10184-10194.
- Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. and Kaplan, J.B. (2008). Different roles of poly-N acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 470-476.
- Jacquot, R. (1962). Organic constituents of fish and other aquatic animal food. In: Borgstrom, G. (Ed.). Fish as food", Acad. Press, New-York, vol.n°1. pp. 146-192.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology. (7th edition). Springer, New York. pp. 226-229.
- Jeong, D.K, Frank, J.F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 degrees C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*. 57, 576-586.
- Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. (2006) Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*. 94, 406-414.
- Joffraud, J.J., Leroi, F, Roy, C., Berdague, J.L. (2001) Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 66, 175-184.
- Johansen, C., Falholt, P. and Gram, L. (1997). Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 3724-3728.
- Jorgensen, L.V., Huss, H.H. and Dalgaard, P. (2001). Significance of volatile compounds produced by spoilage bacteria in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC-MS and multivariate regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2376-2381.
- Josephson, D.B. and Lindsay, R.C. (1986). Enzymic Generation of Volatile Aroma Compounds from Fresh Fish. Biogeneration of aroma in ACS Symposium Series. 317, 201-219.
- Josephson, D.B., Lindsay, R.C. and Stuibler, D.A. (1984). Variations in the Occurrences of Enzymically Derived Volatile Aroma Compounds in salt and freshwater Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32, 1347-1352.

- Jürgen R., Paul .S., Ulrike S. and Reinhard S. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed*.16: 79-90.
- Kamal-Eldin, A. and Yanishlieva, N.V. (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: Stability considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104, 825-836.
- Kanazawa, A., Sawa, T., Akaik, T. and Maeda, H. (2000). Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Letters*. 156, 51-55.
- Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E. and Hultin, H.O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 25, 317-364.
- Karatan, E. and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73, 310-347.
- Karube, I., Matsuoka, H., Suzuki, S., Watanabe, E. and Toyama, K. (1984). Determination of Fish Freshness with an Enzyme Sensor System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32, 314-319.
- Kaushik, S.I. (1997). Nutrition-Alimentation et composition corporelle chez le poisson. *Cah. Nutr. Diet*. 32, 100-106.
- Ke, P.J., Ackman, R.G., Linke, B.A. and Nash, D.M. (1977) Differential lipid oxidation in various part of frozen mackerel. *Journal of Food Technology*. 12, 37-47.
- Kerr, A., Beveridge, C.M., Cowling, M.J., Hodgkiess, T., Parr, A.C.S. and Smith, M.J. (1999). Some physical factors affecting the accumulation of biofouling. *Journal of marine biology Ass. U.K.* 79, 357-359.
- Khayat, A. and Schwall, D. (1983). Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*. 37, 130-140.
- Khodabux, K., L'Omelette, M.S.S., Jhaumeer-Laulloo, S., Ramasami, P. and Rondeau, P. (2007). Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes. *Food Chemistry*, 102, 669-675.
- Kirtley, S.A. and McGuire, J. (1989). On differences in surface constitution of dairy product contact materials. *Journal of Dairy Science*. 72, 1748-1753.
- Klein, G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne occidentale. pp. 22-24.
- Ko, M.J., Cheigh, C.I., Cho, S.W. and Chung, M.S. (2010) Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin. *Journal of Food Engineering*. 102, 327-333.
- Kodo, J.L. (1990). L'ionisation des produits de la pêche. In Ifemer (France), 172p.
- Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P. and Lindroth, S. (1989). Shelf-life of vacuum-Packed cooked ring sausage at different chill temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 9, 237-247.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*. 26, 475-482.

- Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C. and Beumer, R.R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 85, 227-236.
- Kykkidou, S., Giatrakov, V., Papavergou, A., Kontominas, M.G. and Savvaidis, I.N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*. 115, 169-175.
- Labadie, J. (2001). Les biofilms microbiens dans les ateliers de transformation de la filière viande : inconvénients et intérêts potentiels. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*. 8, 65-69.
- Ladikos, D. and Lougovois, V. (1990). Lipid oxidation in muscle foods: a review. *Food Chemistry*. 35, 295-314.
- Langsrud, S., Sundheim, G. and Borgmann-Strahsen, R. (2003). Intrinsic and acquired resistance quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 874-882.
- Laroche, M., (1996). Caractéristiques physiques et biochimiques de la chair de poisson. *Pisciculture Française*. 124, 30-35.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T. and Cardinali, A (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: Imperato, F (Ed.). *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, Kerala, Inde. pp. 23-67.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W. and Caldwell, D.E., (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*. 173, 6558-6567.
- LeBlanc, R.J. and Gill, T.A. (1984). Ammonia as an objective quality index in squid. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 17, 195- 201.
- Lee, W.C. and de Beer, D. (1995). Oxygen and pH microprofiles above corroding mild-steel covered with a biofilm. *Biofouling*. 8, 273-280.
- Lee, H., Amy, G., Cho, J., Yoon, Y., Moon, S. H. and Kim, I. S. (2001). Cleaning strategies for flux recovery of an ultrafiltration membrane fouled by natural organic matter. *Water Research*. 35, 3301-3308.
- Lee, S.F., Li, Y.H. and Bowden, G.H. (1996). Detachment of *streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infection and Immunity*. 64, 1035-1038.
- Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Lampola, T., Hirvonen, A., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J. (2005). Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. *Water Research*. 39, 1962-1971.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R. and Jeffers, A.K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma mediated macrophage killing. *Journal of Immunology*. 175, 7512-7518.
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C. and Kolter, R. (2008). Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322, 1-16.
- Leroi, F, Joffraud, J.J. and Chevalier, F. (2000) Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5 °C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*. 63,502-508.

- Leroy, C. (2006). Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp : 36.
- Lewandowski, Z. (2000). 1- Structure and Functions of Biofilms. In: Evans, L.V. (Ed.). Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control., Harwood Academic Pub.
- Lim, T.Y., Lim, Y.Y. and Yule, C.M. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*. 114, 594-599.
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: Connell, J.J. (Ed.). Advances in fishery science and technology. Farnham, England, Fishing News Books Ltd. pp. 138-157.
- López-Amaya, C. and Marangoni, A. (2000a). Lipases. In: Haard, N. and Simpson, B. (Eds.). Seafood enzymes. Marcel Dekker, New York (USA). pp. 121-146.
- López-Amaya, C. and Marangoni, A. (2000b). Phospholipases. In N. Haard, & B. Simpson (Eds.). Seafood enzymes. Marcel Dekker, New York (USA). pp. 91-119.
- Love, R.M. (1973). Gaping of fillets. Torry Advis. Note n°. 61, Torry Research Station, Aberdeen.
- Love, R.M. (1975). Variability in Atlantic Cod (*Gadus morhua*) from the Northeast Atlantic: a Review of Seasonal and Environmental Influences on Various Attributes of the Flesh. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 32, 2333-2342.
- Love, R.M. (1980). The Chemical Biology of Fishes. Vol.2. Academic Press London. pp. 1968-1977.
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Huynh, M.D. (1991). Applications of Polarography for Assessment of Fish Freshness. Blackwell Publishing Ltd. 56, 335-337.
- MacLean, R.J.C., Bates, C.L., Barnes, M.B., McGowin, C.L. and Aron, G.M. (2004) Methods of studying biofilms. In: Ghannoum, M and O'Toole, G.A (Eds). Microbial biofilms. ASM Press. pp. 379-413.
- Malle, P. and Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/Total Volatile Basic Nitrogen (%). *Journal of Food Protection*. 52: 419-423.
- Malle, P., Valle M. and Bouquelet S. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 79, 43-49.
- Marshall, K.C. (1992). Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *ASM News*. 58, 202-207.
- Martinez, L.R. and Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 4592- 4601.
- Martowitono, N. (2011). Efficiency of cleaning and disinfection on fish contact surfaces. Final Project. Fisheries Training Programme, UNU. 25p.
- Massa, A.E., Manca, E. and Yeannes, M.I. (2012). Development of quality index method for anchovy (*Engraulis anchoita*) stored in ice: Assessment of its shelf-life by chemical and sensory methods. *Food Science and Technology International*. 18, 339-351.
- Mathis, N., Feidt, C. and Brun-Bellut, J. (2003). Influence of protein/energy ratio on carcass quality during the growing period of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquaculture* 217, 453-464.

- May, T, Ito, A. and Okabe, S. (2009). Induction of Multidrug Resistance Mechanism in *Escherichia coli* Biofilms by Interplay between Tetracycline and Ampicillin Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 4628-4639.
- May, T. and Okabe, S. (2008). *Escherichia coli* harboring a natural Incf conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colonic acid and curli. *Journal of Bacteriology*. 190, 7479-7490.
- McEldowney, S. and Fletcher, M., (1986). Effect of Growth Conditions and Surface Characteristics of Aquatic Bacteria on Their Attachment to Solid Surfaces. *Journal of General Microbiology*. 132, 513-523.
- McFeters, G.A., Yu, F.P., Pyle, B.H. and Stewart, P.S. (1995). Physiological methods to study biofilm disinfection. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 333-338.
- Mejlholm, O. and Dalgaard P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34, 27-31.
- Melin, C., Billot J. and Dupin, J.F (1979) Phenolic-Compounds in Bigarreau Napoleon Cherries .1. Hydroxycinnamic Derivatives. *Physiologie Végétale*. 17, 557-572.
- Melton, S.L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food technology*. 37, 105–111.
- Miller, A., Scanlan, R.A., Lee, J.S. and Libbey L.M. (1973b) Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species. *Applied Microbiology*. 26, 18-21.
- Mitsubayashi, K., Kubotera, Y., Yano, K., Hashimoto, Y., Kon, T., Nakakura, S., Nishi, Y. and Endo, H. (2004). Trimethylamine biosensor with flavin-containing monooxygenase type 3 (FMO3) for fish-freshness analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 103, 463-467.
- Mohammadi, T., Madaeni, S.S. and Moghadam, M.K. (2002). Investigation of membrane fouling. *Desalination*. 153, 155-160.
- Moore, G. and Griffith, C.J. (2002a). Factors influencing the recovery of microorganisms from surfaces using traditional hygiene swabbing. *Dairy Food and Environmental Sanitation*. 22, 14-24.
- Moore, G. and Griffith, C.J. (2002b). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*. 19, 65-73.
- Moore, G. and Griffith, C.J. (2007). Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 1090-103.
- Moore, G., Griffith, C. J. and Fielding, L. (2001) A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: a laboratory study. *Dairy Food and Environmental Sanitation*. 21, 478-488.
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.H., Hassett, D.J. and Sauer K. (2006). Bd1A, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188, 7335-7343.
- Morrow, J.D., Margolies, G.R., Rowland, J. and Roberts, L.J. (1991). Evidence That Histamine Is the Causative Toxin of Scombroid-Fish Poisoning. *New England Journal of Medicine*. 324, 716-720.

- Morzel, M. and Van De Vis, H. (2003). Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.). Blackwell Science Ltd. 34, 1-11.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M. et Sineiro, J. (2001). Natural antioxydants from residual sources. *Food Chemistry*. 72, 145-171.
- Muramoto, M., Yamamoto, Y. and Seki, N. (1989). Comparison of calpain of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 55, 917-923.
- Murata, M. and Sakaguchi, M. (1986). Storage of Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) White and Dark Muscles in Ice: Changes in Content of Adenine Nucleotides and Related Compounds. Blackwell Publishing Ltd. 51, 321-326.
- Murray, C.K. and Shewan, J.M. (1979). The microbial spoilage of fish with special reference to the role of psychrotrophs. In: Russell, A.D. and Fuller, R. (Eds.). Cold tolerant microbes in spoilage and the environment. Academic Press. pp. 117-136.
- Murray, C.K. and Fletcher, T.C. (1976). The immunohistochemical location of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology*. 9, 329-334.
- Negi, P.S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*. 156, 7-17.
- Neu, T.R. (2000). Confocal Laser scanning microscopy (CLSM) of biofilms. In: Flemming, H.C., Szewzyk, U. and Griebe, T. (Eds.). Biofilms, investigative methods and applications. Technomic Publishers, Lancaster, PA, USA. pp. 211-224.
- Neu, T.R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*. 151-166.
- Nilsen, H. and Esaiassen, M. (2005). Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 38, 95-99.
- Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F. and Blanco, A.R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*. 56, 519-523.
- Nunes, M.L., Cardinal, M., Mendes, R., Morao Campos, R., Bandarra, N.M., Lourenço, H. and Jerome, M. (1992). Effect of season and storage on proteins and lipids of Sardine (*Sardine pilchardus*) minces and surimi. In: Huss, H.H., Jakobsen, M. and Liston, J. (Eds.). Quality Assurance in the Fish Industry. Elsevier, Amsterdam. pp. 73-81.
- Oehlenschläger, J. and Rehbein, H. (2009). Basic facts and figures. In: Oehlenschläger, J. and Rehbein, H. (Eds.). Fishery products: Quality, safety and authenticity. Wiley Blackwell. pp. 1-18.
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E. and Jonsson, E.H. (1997a). Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). In: Luten, J.B., Børresen, T. and Oehlenschläger, J. (Eds.). Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Amsterdam, Elsevier. pp. 507-520.
- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., and Jonsson, E.H. (1997b). Rapid Gas Sensor Measurements To Determine Spoilage of Capelin (*Mallotus villosus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 2654-2659.

- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Hennehan, G., Nielsen, J. and Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*. 8, 258-265.
- Olley, J. and Quarmby, A.R. (1981). Spoilage of fish from Hong Kong at different storage temperatures. 3. Prediction of storage life at higher temperatures, based on storage behaviour at 0°C, and a simple visual technique for comparing taste panel and objective assessments of deterioration. *Tropical Science*. 23, 147-153.
- Omidbaigi, R., Yahyazadeh, M., Zare, R. and Taheri, H. (2007) The in vitro action of essential oils on *Aspergillus flavus*. *Journal of essential oil-bearing plants*. 10, 46-52.
- Oral, N., Gülmez, M., Vatansever, L. and Güven, A. (2008). Application of antimicrobial ice for extending shelf life of fish. *Journal of Food Protection*. 71, 218-222.
- Ortega-Morales, B., Chan-Bacab, M., Miranda-Tello, E., Fardeau, M. L., Carrero, J. and Stein, T. (2008). Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*. 35, 9-15.
- OSU (Oregon State University Extension Service). (1993). Fish pickling for home use : PNW 183. http://content.wsulibs.wsu.edu/cahe_arch/html/pnw0183/pnw0183.html (visited December 20th, 2013).
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 30, 295-304.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. and Kolter, R., (1999). Genetic approaches to study biofilms. *Methods in enzymology*. 310, 91-109.
- Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M. and Blum, L. J. (2003). « *Escherichia coli* milk » biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes. *Biofouling*. 19, 159-168.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69, 1046-1055.
- Özogul, F. and Özogul, Y. (2006). Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*. 99, 574-578.
- Özogul, F., Taylor, K.D.A., Quantick, P. and Özogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science & Technology*. 37, 515-522.
- Özogul, Y., Özogul, F., Kuley, E., Özkutuk, A.S., Gökbulut, C. and Köse, S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry*. 99, 752- 758.
- Özogul, Y., Özyurt, G., Özogul, F., Kuley, E. and Polat, A. (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chemistry*. 92, 745-751.

- Özyurt, G., Kuley, E., Balıkçı, E., Kaçar, Ç., Gökdoğan, S., Etyemez, M. and Özogul, F. (2011). Effect of the icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella aurita*) during chilled storage. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-011-0586-7.
- Pacquit, A., Lau, K.T., McLaughlin, H., Frisby, J., Quilty, B. and Diamond, D. (2006). Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage. *Talanta*. 69, 515-520.
- Palma, M. and Taylor, L.T. (1999) Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*. 849, 117-124.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gramnegative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97, 8789-8793.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13, 27–33.
- Pauli, A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*. 11, 126-133.
- Pedersen, K., Holmström, C., Olsson, A.K. and Pedersen, A (1986). Statistic evaluation of the influence of species variation, culture conditions, surface wettability and fluid shear on attachment and biofilm development of marine bacteria. *Ach. Microbiology*. 145, 1-8.
- Pérez-Conesa, D., McLandsborough, L. and Weiss, J. (2006). Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *Journal of Food Protection*. 69, 2947-2954.
- Pezeshk, S., Rezaei, M. and Hosseini, H. (2011). Effects of Turmeric, shallot extracts, and their combination on quality characteristics of vacuum-packaged Rainbow trout stored at $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. *Journal of Food Science*. 76, 387-391.
- Phuvasate, S. and Su, Y.C. (2010). Effects of electrolyzed oxidizing water and ice treatments on reducing histamine-producing bacteria on fish skin and food contact surface. *Food Control*. 21, 286-291.
- Pibiri, M.C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctoral. Polytechniques Fédérale de Lausanne.
- Piclet, G. (1987). Le poisson aliment. Composition-intérêt nutritionnel. *Cah. Nutr. Diet*. XXII, 317336.
- Pietta, P.G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." *Journal of natural products*, 63: 1035-1042.
- Pokorny, J. (1977). Interactions of oxidized lipids with protein. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*. 4, 389-393.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, H. (2001). Antioxydants in food: Practical applications. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre, 288p.
- Poli, B.M., Zampacavallo, G., Parisi, G., Poli, A. and Mascini, M. (2000). Biosensors applied to biochemical fish quality indicators in refrigerated and frozen sea bass reared in aerated or hyperoxic conditions. *Aquaculture International*. 8, 335-348.

- Pons-Sanchez-Cascado, S., Vidal-Carou, M.C., Nunes, M.L. and Veciana-Nogués, M.T. (2006). Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. *Food Control*. 17, 564-569.
- Prigent-Combaret, C. and Lejeune, P. (1999). Monitoring gene expression in biofilms. *Biofilms. Methods in Enzymology*. 310, 56-79.
- Puppo, A. (1992). Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*. 31, 85-88.
- Qian, Z., Stoodley, P. and Pitt, W.G. (1996). Effect of low-intensity ultrasound upon biofilm structure from confocal scanning laser microscopy observation. *Biomaterials*. 17, 1975-1980.
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T. and Bennett, B.C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 118, 418-428.
- Queck, S.Y., Weitere, M., Moreno, A.M., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. 2006. The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology*. 8, 1017-1025.
- Quitral, V., Donoso, M.L., Ortiz, J., Herrera, M.V., Araya, H. and Aubourg, S.P. (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant-extract icing system. *LWT Food Science and Technology*. 42, 1450-1454.
- Ramousse, R., Le Berre, M. and Le Guelte, L. (1996). Introduction aux Statistiques, 3. Choisir le test statistique approprié. Accessible sur www.cons-dev.org/elearning/stat/St2b.html. (Consulté le 08/02/2014).
- Rasooli, I., Shayegh, S., Taghizadeh, M. and Astaneh, S.D.A. (2008) Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. *Phytotherapy Research*. 22, 1162–1167.
- Rawles, D.D., Flick, G.J., Martin, R.E. and Steve, L.T. (1996). Biogenic Amines in Fish and Shellfish. *Advances in Food and Nutrition Research, Academic Press*. 39, 329-365.
- Reddi, P.K., Constantanides, M.M. and Dymaza, H.A. (1972). Catheptic activity of fish muscle. *Journal of Food Science*. 37, 643-48.
- Regenstein, L.M., (1996). Assuring the freshness and quality of aquacultured fish. Proceedings «Refrigeration Science and Technology », Refrigeration and Aquaculture, Bordeaux, France. pp. 343-355.
- Relibein, H. and Oehlenschläger, J. (1982). Zur Zusammensetzung der TVB-N fraktion (fluchtige Basen) in sauren Extrakten und alkalischen Destillaten von Seefischfilet. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 33, 44-48.
- Reverchon, E. and De Marco, I. (2006) Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*. 38, 146-166.
- Reynisson, E., Guðbjörnsdóttir, B., Marteinsson, V. Þ. and Hreggviðsson, G. Ó. (2009). Decontamination Efficiency of Fish Bacterial Flora from Processing Surfaces. *Food Technology and Biotechnology*. 47, 75-82.
- Rhee, K.S. (1988) Enzymic and nonenzymic catalysis of lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology*. 42, 127-132.

- Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23, 127-149.
- Robards, M.D., Anthony, J.A., Rose, G.A. and Piatt, J.F. (1999). Changes in proximate composition and somatic energy content for Pacific sand lance (*Ammodytes hexapterus*) from Kachemak Bay, Alaska relative to maturity and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 242, 245-258.
- Rodríguez, C.J., Besteiro, I. and Pascual, C. (1999). Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage, John Wiley & Sons, Ltd. 79, 1473-1480.
- Ronner, U., Husmark, U. and Henriksson, A., (1990). Adhesion of *Bacillus* species in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 550-556.
- Rubio, C. (2002). Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, 213p.
- Sahu, S.C. and Gray, G.C. (1993) "Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin." *Cancer Letters*. 70, 73-79.
- Sainclivier, M. (1983). L'industrie alimentaire halieutique: le poisson matière première. Premier volume. Bulletin scientifique et technique de l'école nationale supérieure agronomique et du centre de recherches de Rennes, 263p.
- Saito, T., Arai, K. and Matsuyoshi, M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 24, 749-750.
- Saleem, A., Husheem, M., Harkonen, P. and Pihlaja, K (2002) Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*. 81, 327-336.
- Samelis, J. (2006). Managing microbial spoilage in the meat industry. In: Clive de W. Blackburn (Ed.). Food spoilage microorganisms. CRC Press, England. pp. 213-286.
- Sandasi, M., Leonard, C.M. and Viljoen, A.M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. 19, 1070-1075.
- Sargent, J., Henderson, R.J. and Tocher, D.R., (1989). The lipids. In: Halver, L.E. (Ed.). Fish Nutrition., Academic Press, Inc., 153-218.
- Scherrer, B. (1984). Biostatistique. Gaetan Morin éditeur. Chicoutimi, Québec. 850 p.
- Scheuerman, T.R., Camper, A.K. and Hamilton, M.A. (1998), Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *Journal of colloid and interface science*. 208, 23-33.
- Schneider, R.P., Chadwick, B.R., Jankowski, J. and Acworth, I. (1997). "Determination of physicochemical parameters of solids covered with conditioning films from groundwaters using contact angles. Comparative analysis of different thermodynamic approaches utilizing a range of diagnostic liquids." *Colloids Surfaces A*. 126, 1-23.
- Schormüller, J., (1968). *Handbuch der Lebensmittelchemie (Band III/2)*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

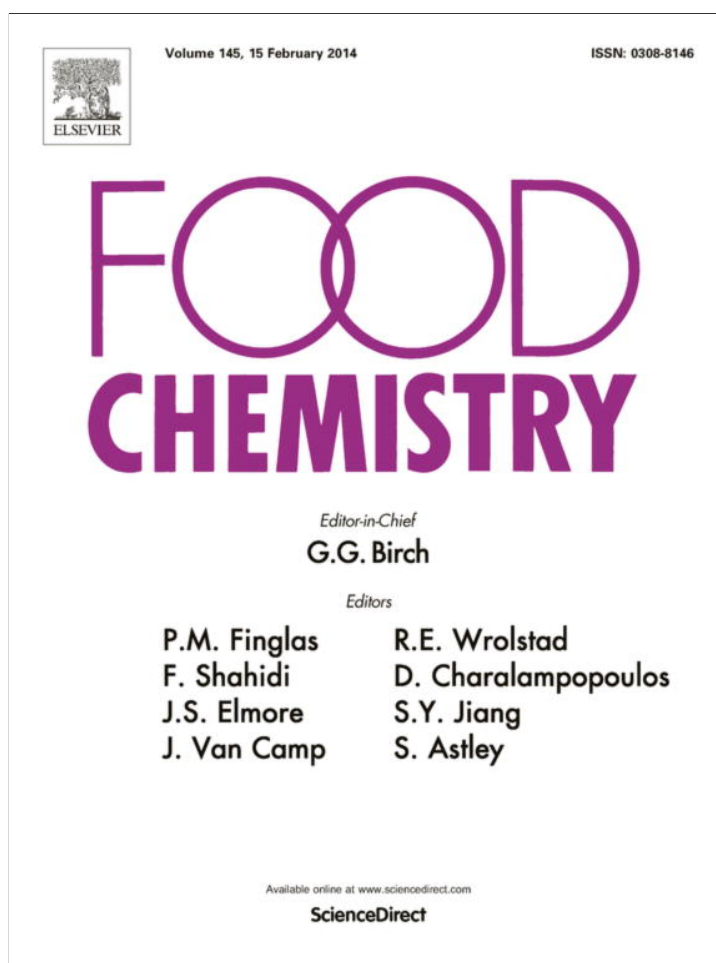
- Schulz, M., Liese, A.D., Mayer-Davis, E.J., D'Agostino, R.B. Fang, F., Sparks, K.C. and Wolever T.M. (2005). Nutritional correlates of dietary glycaemic index: New aspects from a population perspective. *British Journal of Nutrition*. 94, 397-406.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z. and Ercisli, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22, 102-106.
- Shalaby, A.R. (1995). Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 52, 367-372.
- Sharma, N. and Tripathi, A. (2008) Effects of *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck* epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiology Research*. 163, 337-344.
- Shearer, K.D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*. 119, 63-88.
- Sheridan, M.A. (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilisation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90B, 679-690.
- Sherwin, E.R. (1990). Antioxidants. In: Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S. (Eds.). Food Additives. Marcel Decker Inc, New York, NY. pp. 139-191.
- Shewan, J. (1951). Food Invest. Misccl. Paper n° 22, pp. 16.
- Shewan, J.M. (1977). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes induced by bacterial action. In: Sutcliffe, P. and Disney, J. (Eds.). Handling processing and marketing of tropical fish. Tropical products Institute, London. pp. 51-66.
- Shewan, J.M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. *Recent Advances in Food Science*. 1, 167-193.
- Shewfelt, R.L. (1981). Fish muscle lipolysis - A review. *Journal of Food Biochemistry*. 5, 79-100.
- Shi, J., Nawaz, H., Pohorly, J., Mittal, G., Kakuda, Y. and Jiang, Y. (2005). Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Reviews International*. 21, 139-166.
- Shirai, N., Terayama, M., Takeda, H. (2002). Effect of season on the fatty acid composition and free amino acid content of the sardine *Sardinops melanostictus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology*. 131, 387-393.
- Siddhuraju, P. and Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 2144-2155.
- Simões, M. (2011). Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Current Medicinal Chemistry*. 18, 2129-2145.
- Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 43, 573-583.
- Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Packer,

- L. (Ed.). Oxidants and antioxidants, part A, methods in enzymology. Academic Press. New York. pp. 152-178.
- Sipailiene, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiene, R. and Sarkinas, A. (2006) "Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and marjoram oils." *Journal of Essential Oil Research*. 18, 698-703.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. *Journal of Food Science and Technology*. 37, 107-127.
- Sommer, P., Martin-Rouas, C. and Mettler, E. (1999). Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiology*. 16, 503-515.
- Soudan, F., Anquez, H. and Babezit, A (1965). La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 646-653.
- Spormann, A.M. (2008). Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 322, 17-36.
- Steinberger, RE. and Holden, PA. (2005). Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 5404-5410.
- Stepanovic, S., Vulcovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40, 175-179.
- Stewart P.S. and Costerton J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 358, 135-138.
- Stewart, PS. and Franklin, MJ. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 6, 199-210.
- Suci, P.A. and Tyler, B.J. (2003). A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. *Journal of Microbiological Methods*. 53, 313-325.
- Sultana, B., Anwar, F. and Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*. 104, 1106-1114.
- Sundheim, G., Langsrud, S., Heir, E. and Holck, A. L. (1998). Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41, 235-239.
- Surette, M.E., Gill, T.A. and LeBlanc, P.J.J. (1988) Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36, 19-22.
- Surman, S.B., Walker, J.T., Goddard, D.T., Morton, L.H.G, Keevil, C.W., Weaver, W. , Skinner, A., Hanson, K., Caldwell, D. and Kurtz, J. (1996). Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*. 25, 57-70.
- Sutherland, I.W. (1999). Biofilm exopolysaccharides. In: Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming H.C. (Eds.). Microbial extracellular polymeric substances. Springer, Berlin. pp. 73-92.

- Sutherland, I.W. (2001). The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 9, 222-227.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147, 3-9.
- Sveier, H., Wathne, E. and Lied, E. (1999). Growth, feed and nutrient utilisation and gastrointestinal evacuation time in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): the effect of dietary fish meal particle size and protein concentration. *Aquaculture*. 180, 265-282.
- Tahiri, I. (2007). Isolement, caractérisation et étude du potentiel de la divergicine M35, pour la bio-conservation des produits marins prêts à consommer. Thèse de Doctorat. Université Laval. pp. 8.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21, 1199-1218.
- Tang, H., Cao, T., Liang, X., Wang, A., Salley, S.O., McAllister, J. and Ng, K.Y. (2009). Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biomedical Materials Research (Part A)*. 88, 454-463.
- Tanner, D.K., Brazner, J.C. and Brady, V.J. (2000). Factors influencing carbon, nitrogen and phosphorus content of fish from a Lake Superior coastal wetland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47, 1243-1251.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.G. and Mathé, G. (2002). Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies?. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56, 200-207.
- Tarladgis, B., Watts, B.M. and Yonathan, M. (1960). Distillation method for determination of malonaldehyde in rancid food. *Journal of American Oil and Chemists' Society*. 37, 44-48.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H. and Nychas, G.J.E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, 593-600.
- Taylor G.T., Zheng D., Lee M., Troy P.J., Gyananath G. and Sharma S.K. (1997). Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling*. 11, 31-57.
- Thar, R. and Köhl, M. (2005). Complex pattern formation of marine gradient bacteria explained by a simple computer model. *FEMS Microbiology Letters*, 246, 75-79.
- Thoman, E.S., Davis, D.A. and Arnold, C.R. (1999). Evaluation of growout diets with varying protein and energy levels for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 176, 343-353.
- Thormann, K.M., Duttler, S.A., Saville, R., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y. and Spormann, A.M. (2006). Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic-di-GMP. *Journal of Bacteriology*. 188, 2681-2691.
- Timm, M. and Jørgensen, B.M. (2002). Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine--oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*. 76, 509-518.

- Tolker-Nielsen, T. and Molin, S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*. 40, 75-84.
- Toyohara, H., Sakata, T., Yamashita, K., Kinoshita, M. and Shimizu, Y. (1990). Degradation of Oval-Filefish Meat Gel Caused by Myofibrillar Proteinase(s). *Journal of Food Science*. 55, 364-368.
- Tryggvadottir, S.V. and Olaafsdottir, G. (2000). Multisensor for fish. Questionnaire on quality attributes and control methods, Texture and Electronic Nose to Evaluate Fish Freshness. Project Report Fair ct-98-4076. Reykjavik, Iceland.
- Van Acker, S., Tromp, M., Haenen, G.R.M.M., van der Vijgh, W. and Bast, A. (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 214, 755-9.
- Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F. and Bast, A., (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. 20, 331-342.
- Van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.
- Vasseur, P., Vallet-Gely, L., Soscia, C., Genin, S and Filloux, A. (2005). The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology*. 151, 985-997.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. and Waites, W.M. (2000). Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 860-863.
- Veciana-Nogues, M.T., Albala-Hurtado, M.S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. (1996). Validation of a gas-chromatographic method for volatile amine determination in fish samples. *Food Chemistry*. 57, 569-573.
- Verran, J. and Whitehead, K.A. (2006). Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. *Food and Bioprocess Processing*. 84:C4, 260-264.
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M. and Lejeune, P. (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*, 180, 2442-2449.
- Videla, H.A., de Mele, M.F.L. and Brankevich, G. (1988). Assessment of corrosion and microfouling of several metals in polluted seawater. *Corrosion*. 44, 423-426.
- Vogel, B. F., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. and Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2586-2595.
- Vyncke, W. (1970). Determination of the ammonia content of fish as an objective quality assessment method. *Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*. 35, 1033-1046.

- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O.J., Sandvin, A. and Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry*. 46, 361- 366.
- Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine ecology progress series*. 58, 175-189.
- Walker, J.T., Verran, J., Boyd, R.D. and Percival, S. (2001). Microscopy Methods to Investigate Structure of Potable Water Biofilms. *Methods in Enzymology*. 337, 243-255.
- Wang, L., Yen, J.H., Liang, H.L. and Wu, M.J. (2003). Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of Food and Drug Analysis*. 11, 60-66.
- Wanner, O. and Bauchrowitz, M. (2006) Les biofilms sont omniprésents. EAWAG News 60 f. pp. 4-7.
- Ward, B. B. and Cockcroft, A. R. (1993). Immunofluorescence detection of the denitrifying strain *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 14405) in seawater and intertidal sediment environments. *Microbial Ecology*. 25, 233-246.
- Whittaker, C., Ridgway, H. and Olson, B.H. (1984). Evaluation of cleaning strategies for removal of biofilms from reverse-osmosis membranes. *Applied and Environmental Microbiology*. 48, 395-403.
- Wilson, E.P. (2002). Amino acids and proteins. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W. (Eds.). *Fish nutrition*". Academic Press, Elsevier Science. pp. 143-179.
- Wong, A.C.L. and Cerf, O. (1995). Biofilms: Implications for hygiene monitoring of dairy surfaces. *IDF Bull.* 302, 40–44.
- Xu, B.J., and Chang, S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*. 72, 159-166.
- Xu, Q., Barrios, C., Cutright, T., and Newby, B. Z. (2005). Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria. *Environment Science and Pollution Research*. 12, 278-284.
- Yamanaka, H., Shiomi, K. and Kikuchi, T. (1989). Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonid fishes. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 30, 170-174.
- Yano, Y., Satomi, M., and Oikawa, H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*. 111, 6–11.
- Yoshinaka, R., Sato, K., Anbe, H., Sato, M. and Shimizu, Y. (1988). Distribution of collagen body muscle of fishes with different swimming modes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 89B, 147-151.
- Zhi, Z.L., Rios, A. and Valcarcel, M. (1995). Direct Determination of Trimethylamine in Fish in the Flow-Reversal Injection Mode Using a Gas Extraction Sampling Device. *Analytical Chemistry*. 67, 871-877.
- Zuggaramurdi, A. (1976) A model to explain observed behavior on fish salting. *Journal of Food Science*. 45, 1305-1311.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage

Abdelkader Bensid^{a,*}, Yilmaz Ucar^b, Badis Bendeddouche^a, Fatih Özogul^b^a High National Veterinary School, BP 161, El Harrach, 16000 Algiers, Algeria^b Department of Seafood Processing Technology, Faculty of Fisheries, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2013

Received in revised form 25 August 2013

Accepted 27 August 2013

Available online 4 September 2013

Keywords:

Icing

Engraulis encrasicolus

Aromatic plant extracts

Quality parameters

Antioxidant

Antimicrobial

ABSTRACT

The effect of ice containing thyme (0.04% w/v), oregano (0.03% w/v) and clove (0.02% w/v) extracts on the quality parameters of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) was assessed through the chemical, sensory and microbiological methods. According to sensory analyses, anchovy stored in ice prepared with each plant extracts had a shelf life of 12 days, while batch stored in traditional ice had a shelf life of 9 days. pH were not significantly affected by the presence of plant extracts in the ice. However, a marked antioxidant effect ($P < 0.05$) could be detected with fish kept under plant extract icing systems, according to peroxide (PV) and thiobarbituric acid (TBA) values. Moreover, the employment of such icing systems led to lower ($P < 0.05$) total volatile base-nitrogen (TVB-N) value and free fatty acid (FFA) formation. Thus, TVB-N proved to be a suitable index for the spoilage of anchovies during chilled storage. The employment of such icing systems also led to significantly lower counts of aerobic mesophiles and psychrotrophic bacteria in anchovy muscle with skin, as compared with the traditional ice batch. This work demonstrates that the use of ice with plant extracts for the storage of gutted and beheaded anchovy can be recommended to improve the quality and extend the shelf life.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anchovies are small pelagic fishes and constitute one of the main fishing resources in the world. They are consumed as fresh but ripening in saturated brines and marinating in vinegar are also traditional preservation methods (Pons-Sanchez-Cascado, Vidal-Carou, Nunes, & Veciana-Nogués, 2006). The fish contain many bacteria in the digestive system and the strong digestive enzymes produced will be able to cause a violent autolysis post mortem, which may give rise to strong off-flavour. The removal of gut material and head reduces autolysis and the bacterial load responsible for the deterioration of fish (Cakli, Kilinc, Cadun, Dincer, & Tolasa, 2007).

The shelf life of the whole anchovy stored in ice is relatively short; it is of about 5–7 days (Massa, Manca, & Yeannes, 2012). Anchovies, as for other marine species, are very susceptible to spoilage caused by chemical reactions and post-mortem changes in pH which potentiate microbial growth (Ólafsdóttir et al., 1997). Hydrolytic and oxidative rancidities in fish flesh easily take place and limit the shelf-life of fish during storage. The presence of highly unsaturated lipids in fish flesh and its high content in

pro-oxidant molecules may lead to rancidity oxidation (Benzie, 1996). The enzymatic hydrolysis of fats, induced by lipid-degrading enzymes (lipases and phospholipases), produces free fatty acids that undergo further oxidation to produce low-molecular weight compounds, such as aldehydes and ketones, that are responsible for off-flavour or off-odours of fish (López-Amaya, & Marangoni, 2000a).

Various methods for retarding the development of undesirable rancidity and extending the shelf life of fish include storage in low temperature, appropriate packaging, icing with various chemicals and the incorporation of synthetic or natural antioxidants. Recent studies have reported significant inhibitory effects of ice prepared with antimicrobials and antioxidants on the microbiological and biochemical mechanisms involved in fish spoilage, as compared to traditional icing. As pre-preservation methods, ozonised slurry ice (Campos, Rodriguez, Losada, Aubourg, & Barros-Velazquez, 2005), electrolysed oxidising ice (Phuvasate & Su, 2010) and ice containing plant extracts (Oral, Gülmez, Vatansever, & Güven, 2008; Quitral et al., 2009; Özyurt et al., 2011) have been studied.

Plant extracts, which are called bio-preservatives or green chemicals, are now being viewed as potential alternatives to chemical preservatives. Özyurt et al. (2011) studied the preserving effect of ice containing rosemary extract for extending the shelf life of

* Corresponding author. Tel.: +213 55 468 7010; fax: +213 2121 5953.

E-mail address: bensidvet@laposte.net (A. Bensid).

sardines (*Sardinella aurita*). Sensory, microbiological and chemical analyses indicated that the storage of the fish on ice with rosemary extract had a significant increase in shelf life and a positive effect, causing low biogenic amine content, especially histamine and putrescine. In another study, [Quitral et al. \(2009\)](#) found that ice prepared from aqueous extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and oregano (*Origanum vulgare*) leaves improved the chemical changes of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*) when compared to traditional ice. [Oral et al. \(2008\)](#) studied changes in shelf-life of fish (*Capoeta capoeta capoeta*) stored in ice prepared with wild-thyme hydrosol. Results of sensory, microbiological and chemical analyses showed that the shelf life of stored fish in ice with wild-thyme hydrosol has extended by 15–20 days compared to the control samples.

Thyme, oregano and clove extracts have increasingly gained the interest of researchers and food processors as potential natural antimicrobial and antioxidant agents. They contain high concentrations of phenolic compounds including carvacrol, thymol and eugenol. The preservative effect of polyphenols is mainly due to their antimicrobial properties and to the inhibition of some enzymes activities, as well as the free radical scavenging ability and therefore prevention of lipid oxidation ([Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010](#)).

The present study includes a novel technology for the commercialisation of anchovy as a chilled product for direct consumption. For this reason, effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage were investigated as a pre-preservation system and compared to traditional ice that was employed as control. Therefore, microbiological, chemical and sensory changes related to quality criteria were determined in order to find out the best effective plant extracts.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and preparation of extracts

Dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) were purchased from a local market in Algeria. Wild-oregano (*Origanum glandulosum*) was collected from the mountains surrounding Djelfa City (Algeria), whereas thyme (*Thymus vulgaris*) was obtained at spring harvest from local cultivation. The plants were botanically identified.

Fresh aerial parts of oregano and thyme were dried in the dark at ambient temperature (<30 °C). The plant materials (clove, oregano and thyme) were individually ground using a grinder into a fine powder. Extraction was carried out as reported previously ([Ertürk, Kati, Yayli, & Demirbag, 2003](#)) with some modifications. Each dry sample was macerated in absolute ethanol in a ration of 1:5 for 24 h. The extract was filtered through Whatman No. 1 filter paper. After filtration, activated carbon was added to filtrate (10 g of activated carbon/50 g of plant material) and immediately was removed from the filtrate using Whatman filtration paper. Then, the filtrate was concentrated on a rotary evaporator at 50 °C.

The extracts were weighed and treated by UV-light (30 W, 50 cm irradiation distance) for 30 min to reduce the naturally existing microflora. Then, they were re-dissolved in a small volume of absolute ethanol (to dissolve liposoluble components) and stored in amber flasks in the dark at 4 °C until utilization.

2.2. Sample and ice preparation

Thyme, oregano and clove extracts (400, 300 and 200 mg, respectively) dissolved in 1-l distilled water, sealed in polyethylene bags and kept frozen (−18 °C) until use. Traditional ice was prepared by using distilled water, sealed and kept frozen as other three ice treatments. Before use, all treatments of ice crushed using an iron hammer to obtain flake ice.

Concentration of plant extracts was chosen according to preliminary trials (100–1000 mg plant extract/l distilled water) where the resulting fish was visually analysed; thus, a concentration where the best appearance of fish with less presence of odour and colour of the plant extract in fish was chosen.

Anchovies (*E. encrasicolus*) caught from the Black Sea in Turkey, had been stored in ice for 2 days post-capture on arrival at the laboratory. They were immediately gutted, beheaded and washed with tap water. Individual anchovies had an average weight of approximately 10 g and an average length of 9–11 cm.

The fish were divided into four lots, placed in a self-draining polystyrene box and covered with a layer of each of the ice treatments at a fish-to-ice ratio of 2:1 (w/w). One lot surrounded by traditional ice (control), the remaining three lots was treated as 0.04% (w/v), 0.03% (w/v) and 0.02% (w/v) ice with thyme, oregano and clove extracts, respectively. Ice was renewed during storage when required. All boxes were stored in the same hold kept throughout the whole storage period at a temperature of 3 °C with a fluctuation of ±1 °C. Anchovies were sampled two days after being caught and after 3, 6, 9 and 12 days of storage. All analyses were performed in triplicate.

2.3. Sensory analysis

The sensory assessment of raw anchovy stored in ice and in ice with plant extracts, was conducted using the Quality Index Method (QIM) developed by [Pons-Sanchez-Cascado et al. \(2006\)](#) with some modifications for gutted and beheaded fish. The scheme consisted of nine quality parameters (e.g. surface, slime and skin appearance; texture, odour and colour of flesh; colour along the vertebral column; degree of adherence to the vertebral column and plant extract odour). A demerit score, which ranges generally from 0 to a maximum of 3, where 0 represented best quality and higher score (3) indicated poorer quality. The total sum of demerit points was 19. The panel consisted of seven trained assessors. The panel members were asked to state whether the fish were acceptable or not for the determination of shelf life of anchovies.

The sensory evaluations of cooked anchovy were assessed according to the same method of [Pons-Sanchez-Cascado et al. \(2006\)](#) without any modification. A scale from 10 to 3 was used, 10 denoting absolutely fresh and 3 completely spoiled. The rejection threshold set at ≤6. To prepare the cooked fish sample, fish from each of the storage conditions were filleted, cooked in a microwave oven for 1 min 30 s and served hot to panellists.

2.4. Chemical analysis and pH

The pH values were recorded by using a digital pH metre (WTW, 315i, Germany) after homogenization of each 10 g fish muscle with skin in 90 ml of distilled water. The total volatile base-nitrogen (TVB-N) content of anchovy, expressed as mg TVB-N per 100 g of sample, was determined after steam distillation according to the method of [Antonocopoulos \(1973\)](#). The value of thiobarbituric acid (TBA) was determined according to [Tarladgis, Watts, and Yonathan \(1960\)](#) to evaluate the oxidation stability during storage and the results expressed as milligrams of malondialdehyde per kg of sample. Free fatty acid (FFA) analysis was done by the [AOCS \(1994\)](#) method and the results expressed as percentage of oleic acid. The peroxide value (PV) was determined according to [AOCS \(1994\)](#) procedure and expressed in milliequivalents of peroxide oxygen per kilogramme of fat.

2.5. Microbiological analysis

Triplicate samples were taken from each of four different groups. Fish muscle with skin (5 g) were mixed with 45 ml of

ringer solution and stomached for 2 min. From the 10^{-1} dilution, other decimal dilutions were prepared and then 0.1 ml of each dilution was pipetted onto the surface of plate count agar (Fluka 70152, Switzerland). Aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria were investigated after incubation at 30 °C for 24 h or at 7 °C for 10 days, respectively. Microbiological data are expressed as a logarithm of colony forming units per gram of sample.

2.6. Statistical analysis

Statistical evaluations of the chemical, microbiological and sensory analysis were made by using a SPSS package (SPSS 17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A one-way ANOVA (analysis of variance) method followed by Duncan's multiple range tests was used to evaluate the significant difference ($P < 0.05$) among the different icing treatments.

3. Results and discussion

3.1. Sensory analysis

The sensory quality of raw and cooked anchovy was evaluated 2 days after being caught and after 3, 6, 9 and 12 days of storage. The total demerit points of raw anchovy stored in traditional ice and ice with plant extracts are presented in Fig. 1. The sensory scores in both control and treated groups declined throughout the 12 days of chilled storage. Using a sensory score of 12 as the limit of acceptability, the observed shelf-life was 9 days in the control group (demerit score, 13.43) and 12 days for the groups in ice with thyme, oregano and clove extracts (demerit scores, 12.57, 13.29 and 11.71, respectively), where a difference of 3 days in shelf-life was noted. In addition, treated groups were highly preferred by panelist because of their desirable odour. The results of the sensory analysis indicated that the storage life of gutted and beheaded anchovy is affected by the storage in ice with used plant extracts. Özyurt et al. (2011) studied shelf life of Sardine (*S. aurita*) stored in ice with rosemary, which their results showed that the addition of natural extract improved the sensory quality of fish and extended the shelf life by 3 days compared with the control samples.

Sensory scores of cooked anchovy fillets were shown in Fig. 2. At each day of testing throughout storage, there were significant

differences ($P < 0.05$) between the control and the treatment groups. Acceptability was defined as having a score of >6 . The limit of acceptability was reached after 9 days for the control group (5.29) and after 12 days for thyme, oregano and clove group (demerit scores, 5.43, 5.00, and 5.86, respectively). Treated groups were highly preferred by panellist because of their desirable flavour. It can be indicated that thyme, oregano and clove extracts could be used as easily accessible natural source since they have better consumer acceptance.

3.2. Chemical analysis and pH

Table 1 summarises the average values and standard deviations for the chemical parameters analysed on each sampling day. The initial pH of the fish samples was pH 5.93. In the case of anchovies stored in traditional ice (control), pH increased significantly with storage time, reaching a value of 7.3 by the end of storage. The increase of pH values during the storage period may be attributed to the accumulation of alkaline compounds, such as ammonia compounds and trimethylamine, mainly derived from microbial action (Schormüller, 1968). Comparison among icing systems showed that fishes kept under traditional ice developed, only on day 12, a higher ($P < 0.05$) pH value than their corresponding individuals kept under ice prepared from plant extracts. No differences ($P > 0.05$) were observed throughout the storage period between individuals kept under plant extract icing systems. Statistical analysis indicated that the pH values of anchovies were not affected ($P < 0.05$) by icing with plant extracts.

Total volatile basic nitrogen is a product of bacterial spoilage and endogenous enzymes action and its content is often used as an indicator for fish deterioration (Erkan, Özden, & İnuğur, 2007). Various authors have reported that the limit of acceptability for fresh fish was 30 mg TVB-N/100 g of flesh (El-Marrakchi, Bennour, Bouchriti, Hamama, & Tagafait, 1990; Harpaz, Glatman, Drabkin, & Gelman, 2003). At the beginning of the storage, TVBN values were determined as 9.50 mg/100 g flesh and increased with time of storage in all groups (Table 1). The statistical analysis of the TVB-N data showed that significant differences ($P < 0.05$) were found between anchovy stored in traditional ice and in ice with plant extracts, at 6 and 12 days of storage. However, there were no significant differences for TVB-N values of samples stored in different

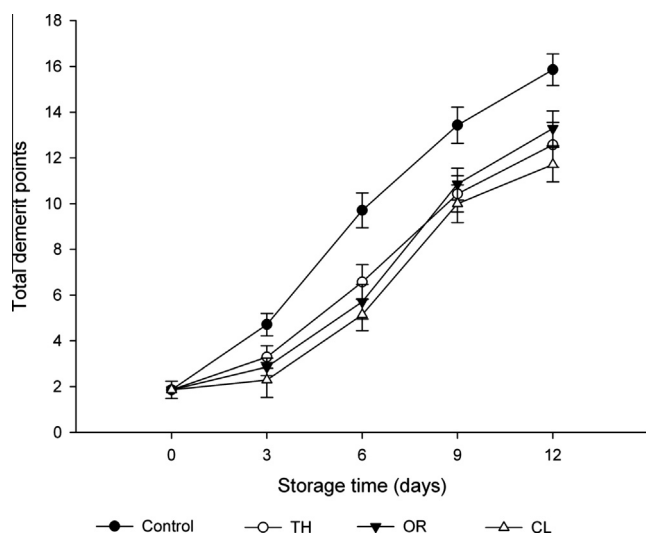


Fig. 1. Sensory assessment of raw anchovy during chilling storage under different icing conditions: traditional ice (control), thyme-extract ice (TH), oregano-extract ice (OR) and clove-extract ice (CL). Mean scores of sensory assessment ($n = 7$). Standard deviations are indicated by bars.

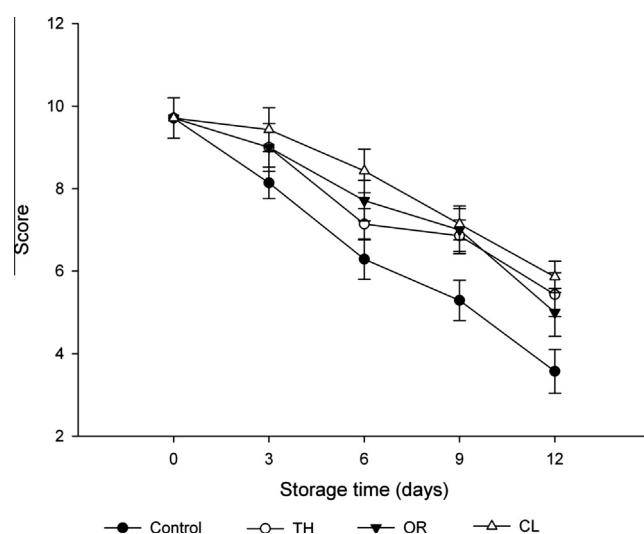


Fig. 2. Sensory score of cooked anchovy during chilling storage under different icing conditions: traditional ice (control), thyme-extract ice (TH), oregano-extract ice (OR) and clove-extract ice (CL). Mean scores of sensory assessment ($n = 7$). Standard deviations are indicated by bars.

Table 1
Changes in pH, TVB-N (mg/100 g of sample), PV (meq/kg of fat), TBA (mg malonaldehyde/kg of sample) and FFA (oleic acid%) of anchovy during chilling storage under different icing conditions.

Parameters	Groups	Storage time (days)				
		0	3	6	9	12
pH	Control	5.93 ± 0.23	6.41 ± 0.04 ^a	6.44 ± 0.16 ^a	6.93 ± 0.28 ^a	7.30 ± 0.02 ^a
	Thyme	5.93 ± 0.23	6.40 ± 0.02 ^a	6.42 ± 0.05 ^a	6.52 ± 0.15 ^b	7.00 ± 0.02 ^b
	Oregano	5.93 ± 0.23	6.44 ± 0.01 ^a	6.41 ± 0.05 ^a	7.13 ± 0.04 ^a	6.93 ± 0.13 ^b
	Clove	5.93 ± 0.23	6.42 ± 0.01 ^a	6.43 ± 0.03 ^a	6.91 ± 0.01 ^a	6.89 ± 0.02 ^b
TVB-N	Control	9.50 ± 1.07	11.11 ± 0.70 ^b	13.87 ± 0.79 ^a	30.93 ± 2.73 ^a	60.23 ± 5.59 ^a
	Thyme	9.50 ± 1.07	15.30 ± 3.48 ^a	8.84 ± 1.43 ^b	20.89 ± 4.18 ^b	31.56 ± 2.90 ^{b,c}
	Oregano	9.50 ± 1.07	12.04 ± 1.45 ^{a,b}	10.93 ± 1.03 ^b	29.43 ± 4.76 ^a	38.10 ± 3.00 ^b
	Clove	9.50 ± 1.07	11.84 ± 1.16 ^{a,b}	9.31 ± 1.78 ^b	25.30 ± 0.38 ^{a,b}	28.10 ± 1.50 ^c
PV	Control	4.29 ± 1.07	4.09 ± 0.74 ^a	4.14 ± 0.56 ^a	7.26 ± 0.74 ^a	16.20 ± 0.31 ^a
	Thyme	4.29 ± 1.07	4.02 ± 0.50 ^a	3.13 ± 0.14 ^b	4.04 ± 0.39 ^b	7.76 ± 1.44 ^c
	Oregano	4.29 ± 1.07	3.78 ± 0.29 ^a	4.40 ± 0.57 ^a	4.74 ± 1.08 ^b	10.87 ± 0.49 ^b
	Clove	4.29 ± 1.07	3.42 ± 0.87 ^a	2.20 ± 0.24 ^c	4.66 ± 0.30 ^b	6.44 ± 0.83 ^c
TBA	Control	3.08 ± 0.92	8.54 ± 0.06 ^a	14.38 ± 1.69 ^a	9.59 ± 1.66 ^a	8.77 ± 0.41 ^a
	Thyme	3.08 ± 0.92	7.83 ± 1.31 ^{a,b}	13.33 ± 1.40 ^a	9.18 ± 0.43 ^a	8.78 ± 0.60 ^a
	Oregano	3.08 ± 0.92	7.52 ± 0.70 ^b	11.73 ± 0.83 ^b	7.55 ± 0.41 ^b	4.81 ± 2.00 ^b
	Clove	3.08 ± 0.92	8.63 ± 0.21 ^a	8.10 ± 0.78 ^c	5.71 ± 0.25 ^c	9.73 ± 0.48 ^a
FFA	Control	1.78 ± 0.23	2.38 ± 0.25 ^a	2.19 ± 0.41 ^a	2.94 ± 0.42 ^a	5.98 ± 0.49 ^a
	Thyme	1.78 ± 0.23	1.79 ± 0.19 ^a	1.70 ± 0.40 ^a	2.51 ± 0.17 ^a	3.78 ± 0.18 ^c
	Oregano	1.78 ± 0.23	1.79 ± 0.35 ^a	1.95 ± 0.09 ^a	2.88 ± 0.80 ^a	5.39 ± 0.39 ^{a,b}
	Clove	1.78 ± 0.23	1.64 ± 0.12 ^a	2.26 ± 0.43 ^a	2.60 ± 0.27 ^a	4.78 ± 0.07 ^b

The values are expressed as mean ± standard deviation, $n = 3$.

^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) during storage periods.

icing conditions at 3 and 9 days of storage. The significantly ($P < 0.05$) lower TVBN values of three groups of samples stored in ice with plant extracts may be attributed to the antibacterial properties of the phenolic constituents: carvacrol, thymol, eugenol (Tajkarimi et al., 2010). In the present study, TVB-N value for anchovy stored in traditional ice exceeded limit of acceptability of 30 mg/100 g of flesh at the time of sensory rejection (9th day). TVB-N values for anchovy stored in ice with thyme, oregano and clove extracts were remained below the upper limit of acceptability after 12 days. When fish was unacceptable for panellist, TVB-N values were 30.93 mg/100 g for control group, 31.56 mg/100 g for thyme group, 38.10 mg/100 g for oregano group and 28.10 mg/100 g for clove group. These results indicate that TVB-N is a suitable index for the spoilage of gutted and beheaded anchovy stored at 4 °C.

The peroxide value (PV) was employed for determining the early stages of fat oxidation (Melton, 1983). Initial peroxide values of fish samples were determined as 4.29 meq/kg of fat. As indicated in Table 1, icing with plant extracts reduced peroxide formation ($P < 0.05$) on 6, 9 and 12 days of storage. However, no significant differences ($P > 0.05$) could be outlined among the groups on day 3. It is concluded that the presence of plant extracts in the ice led to a partial inhibition of peroxide formation. Also, clove showed the best antioxidant effect in fish and yielded the lowest PV. The results of the present study indicate that the used plant extracts are effective at delaying lipid peroxidation in anchovy stored under refrigeration. The ability of these plant extracts to inhibit lipid oxidation is probably related to their total phenolic compounds content. Phenolic antioxidants prevent formation of fatty free radicals, which do react with or absorb oxygen in the autoxidation process, thus delaying the onset of the autoxidative process in fat (Sherwin, 1990).

The TBA value is an index of secondary lipid oxidation measuring malondialdehyde (MDA) content. MDA is a secondary product of oxidation resulting from the degradation of lipid hydroperoxides formed during the oxidation process of polyunsaturated fatty acids (Fernandez, Perez-Alvarez, & Fernandez-Lopez, 1997). At the beginning of the storage period TBA values of fish samples were found to be 3.08 mg malonaldehyde (MA)/kg (Table 1). TBA values

of all group samples showed first increase and afterwards decrease during the storage. The increase in TBARS indicated formation of secondary lipid oxidation products, while the decrease in TBA values may represent the breakdown of the malonaldehyde because of tertiary degradation (Pezeshk, Rezaei, & Hosseini, 2011). At each day of testing throughout storage, higher TBA value ($P < 0.05$) in the control group was found in comparison to anchovy stored in ice with oregano extract. The same differences are obtained between control group and clove group at days 6 and 12 of the storage period. On the other hand, no differences ($P > 0.05$) were observed throughout the storage period between control group and thyme group. As a consequence of TBA-i results, it can be concluded that the use of oregano and clove extracts in ice was effective on TBA values of anchovy. So, oregano and clove extracts containing high level of total phenolic compounds content (Negi, 2012) can contribute in retardation of lipid peroxidation and hence for gaining low TBA concentration. These results are in agreement with those of Quitral et al. (2009), who reported that icing system with oregano extract generally showed lower TBA value for jack mackerel (*T. murphyi*). Nunes et al. (1992) reported that the acceptability limits of TBA value for fish stored in ice were 5–8 mg MA/kg flesh. The TBA values of all groups exceeded the value of 8 mg MDA/kg on the 6th day of storage. However, for this same 6 day period, the panellists did not detect any off-odour or taste in these samples. According to these results, it would be difficult to set limits for TBA levels, and TBA values may not give actual rate of lipid oxidation since malonaldehyde can interact with other components of fish such as nucleosides, nucleic acid, proteins and amino acids of phospholipids (Aubourg, 1993), and produce secondary metabolites that include carbohydrates, furfural, alkenals, alkadienals and other aldehydes and ketones (Botsoglou et al., 1994).

Initial FFA values of fish samples were found to be 2.72 (oleic acid%). There was a marked increase in FFA content of all groups during storage (Table 1). This higher hydrolytic activity could be explained on the basis of the marked pH increase, so that an approach towards the optimum activity pH range for lipases (Lopez-Amaya and Marangoni, 2000a) and phospholipases (Lopez-Amaya and Marangoni, 2000b) takes place. In the present study, no differences ($P > 0.05$) in FFA concentrations were found between groups at days

Table 2

Changes in the counts of mesophilic and psychrophilic bacteria of anchovy during chilling storage under different icing conditions.

	Groups	Storage time (days)				
		0	3	6	9	12
Mesophilic aerobic bacteria (log cfu/g)	Control	4.33 ± 0.17	5.82 ± 0.12 ^{a,b}	7.66 ± 0.17 ^a	8.76 ± 0.48 ^a	9.51 ± 0.06 ^a
	Thyme	4.33 ± 0.17	5.60 ± 0.34 ^b	6.57 ± 0.01 ^b	8.45 ± 0.08 ^a	8.14 ± 0.41 ^c
	Oregano	4.33 ± 0.17	6.04 ± 0.18 ^a	7.55 ± 0.05 ^a	8.47 ± 0.07 ^a	8.83 ± 0.27 ^b
	Clove	4.33 ± 0.17	5.53 ± 0.13 ^b	6.95 ± 0.59 ^b	7.75 ± 0.31 ^b	8.38 ± 0.18 ^{b,c}
Psychrotrophic bacteria (log cfu/g)	Control	4.47 ± 0.13	6.27 ± 0.15 ^a	8.28 ± 0.04 ^a	9.13 ± 0.46 ^a	10.26 ± 0.18 ^a
	Thyme	4.47 ± 0.13	5.55 ± 0.03 ^a	6.84 ± 0.30 ^a	8.58 ± 0.01 ^b	8.34 ± 0.37 ^c
	Oregano	4.47 ± 0.13	6.15 ± 0.41 ^a	8.06 ± 0.06 ^a	9.23 ± 0.05 ^a	9.47 ± 0.08 ^b
	Clove	4.47 ± 0.13	5.67 ± 0.02 ^b	6.62 ± 0.03 ^b	8.37 ± 0.10 ^b	9.13 ± 0.43 ^b

The values are expressed as mean ± standard deviation, $n = 3$.^{a,b,c} Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$) during storage periods.

6 and 9. On the other hand, lipid hydrolysis development was shown to be higher ($P < 0.05$) in individual fishes kept under traditional ice (at days 3 and 12) than in their counterparts where a plant-extract icing was employed. These results might be attributed to the effect of phenolic compounds of used plant extracts which inhibit enzymatic action liberating free fatty acids.

3.3. Microbiological assessment

Mesophilic bacteria in the fishery products are the useful tool for quality evaluation of shelf-life and post-processing contamination, while psychrotrophic bacteria are particularly the major group of microorganisms responsible for spoilage of fresh seafood (Huss, 1994). The evolution of microbial growth in anchovy flesh with skin during chilling storage under different icing conditions is shown in Table 2. The initial mesophilic bacteria count of all group samples (4.33 log cfu/g) indicates acceptable fish quality, considering the proposed upper limit for aerobic plate count of 10^7 cfu/g (7 log cfu/g) for fresh fish (ICMSF, 1986). Mesophilic bacteria of anchovies stored in traditional ice and in ice prepared with oregano extract exceeded the value of 7 log cfu/g on day 6 of storage. On the other hand, anchovy stored in ice prepared with thyme and clove reached 7 log cfu/g 3 days later (day 9 of storage). The low initial psychrotrophic bacteria count (4.47 log cfu/g) indicates good fish quality. In control and oregano group samples psychrotrophic bacteria counts exceeded the value of 6 log cfu/g, considered as the upper acceptability limit for marine species (Erkan, 2007) on 3rd storage day. On the other hand, in thyme and clove group samples psychrotrophic bacteria counts exhibited a growth over the 6 log cfu/g on the 6th storage day. The observed shelf life of anchovy, as determined by panellists who indicated that the fish were not acceptable, was 9 days in the control group and 12 days for the treated groups (Fig. 1). These results indicated that sensory evaluation showed a longer shelf life in anchovy stored under different icing conditions when compared with microbiological assessment.

Thus, while some authors have suggested that thyme, oregano and clove have significant bacteriostatic/inhibition properties for pathogenic and spoilage micro-organisms (Tajkarimi et al. 2010), results of the present study showed that the used plant extracts were less effective as an antibacterial agent for the preservation of anchovies. This may be attributed to the use of low concentrations of these extracts for preparing ice. The reduced effectiveness may be also attributed to the use of crude extracts which contain flavonoids in glycosidic form, where the sugar present in them decreases effectiveness against some bacteria (Negi, 2012).

4. Conclusion

Gutted and beheaded anchovies stored in ice prepared with thyme, oregano and clove extracts showed lower microbiological

and chemical indices because of the antimicrobial and antioxidant properties of the extracts. The sensory evolution indicated that the shelf life of anchovy was 9 days for the control group and 12 days for the treated groups. It can be concluded that natural plant extracts can be used by the food industry to extend the shelf life because they exhibited promising antioxidant and antimicrobial effect.

The use of ice containing extracts of aromatic plants at higher concentrations would probably result in a further increase of shelf-life of fish, but such plant extracts concentrations would probably impart unpleasant sensorial attributes (bitter taste and strong odour) on the quality of fish flesh. Moreover, potential use of plant extracts, as preservative in foods, needs to be carefully evaluated in terms of its sensorial acceptability.

References

- AOCS (1994). *The official methods and recommended practices of the American Oil Chemists'*. Champaign, IL: The American Oil Chemists' Society, pp. Ca 5a–40, Cd 8–53.
- Antonopoulos, N. (1973). Bestimmung des Flüchtigen Basenstickstoffs. In W. Ludorf & V. Meyer (Eds.), *Fische und Fischerzeugnisse* (pp. 224–225). Berlin: Aulage Verlag Paul Prey.
- Aubourg, S. P. (1993). Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules – New trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 323–335.
- Benzie, I. F. F. (1996). Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47, 223–261.
- Botsoglou, N. A., Fletouris, D. J., Papageorgiou, G. E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A., & Trakatelis, G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T., & Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole gutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18, 391–397.
- Campos, C. A., Rodriguez, O., Losada, V., Aubourg, S. P., & Barros-Velazquez, J. T. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*, 103, 121–130.
- El-Marrakchi, A., Bennour, B., Bouchriti, N., Hamama, A., & Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 53, 600–605.
- Erkan, N. (2007). Freshness and quality of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Arch Lebensmittelhyg*, 58, 98–106.
- Erkan, N., Özden, Ö., & İnuğur, M. (2007). The effects of modified atmosphere and vacuum packaging on quality of chub mackerel. *International Journal of Food Science & Technology*, 42, 1297–1304.
- Ertürk, Ö., Kati, H., Yayli, N., & Demirbag, Z. (2003). Antimicrobial activity of *Viscum album* L. subsp. *abietis* (Wiesb). *Turkish Journal of Biology*, 27, 255–258.
- Fernandez, J., Perez-Alvarez, J. A., & Fernandez-Lopez, J. A. (1997). Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, 59, 345–353.
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., & Gelman, A. (2003). Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66, 410–417.
- Huss, H. H. (1994). Assurance of seafood quality, Rome: FAO Fisheries Technical Paper No. 334. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). Sampling plans for fish and shellfish. In H. H. Huss (Ed.), *ICMSF, Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and*

- scientific applications (2nd ed., pp. 181–196). Toronto: University of Toronto Press. vol. 2.
- López-Amaya, C., & Marangoni, A. (2000a). Lipases. In N. Haard & B. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes* (pp. 121–146). New York (USA): Marcel Dekker.
- López-Amaya, C., & Marangoni, A. (2000b). Phospholipases. In N. Haard & B. Simpson (Eds.), *Seafood enzymes* (pp. 91–119). New York (USA): Marcel Dekker.
- Massa, A. E., Manca, E., & Yeannes, M. I. (2012). Development of quality index method for anchovy (*Engraulis anchoita*) stored in ice. Assessment of its shelf-life by chemical and sensory methods. *Food Science and Technology International*, 18, 339–351.
- Melton, S. L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology*, 37, 105–111.
- Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 7–17.
- Nunes, M. L., Cardinal, M., Mendes, R., Morao Campos, R., Bandarra, N. M., Lourenço, H., et al. (1992). Effect of season and storage on proteins and lipids of Sardine (*Sardine pilchardus*) minces and surimi. In H. H. Huss, M. Jakobsen, & J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the Fish Industry* (pp. 73–81). Amsterdam: Elsevier.
- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, L., et al. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 258–265.
- Oral, N., Gülmez, M., Vatansever, L., & Güven, A. (2008). Application of antimicrobial ice for extending shelf life of fish. *Journal of Food Protection*, 71, 218–222.
- Özyurt, G., Kuley, E., Balıkçı, E., Kaçar, Ç., Gökdoğan, S., Etyemez, M., et al. (2011). Effect of the icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella aurita*) during chilled storage. *Food and Bioprocess Technology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0586-7>.
- Pezeshk, S., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2011). Effects of Turmeric, shallot extracts, and their combination on quality characteristics of vacuum-packaged Rainbow trout stored at 4 ± 1 °C. *Journal of Food Science*, 76, 387–391.
- Phuvasate, S., & Su, Y. C. (2010). Effects of electrolyzed oxidizing water and ice treatments on reducing histamine-producing bacteria on fish skin and food contact surface. *Food Control*, 21, 286–291.
- Pons-Sanchez-Cascado, S., Vidal-Carou, M. C., Nunes, M. L., & Veciana-Nogués, M. T. (2006). Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored in ice. *Food Control*, 17, 564–569.
- Quitral, V., Donoso, M. L., Ortiz, J., Herrera, M. V., Araya, H., & Aubourg, S. P. (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant-extract icing system. *LWT Food Science and Technology*, 42, 1450–1454.
- Sherwin, E. R. (1990). Antioxidants. In A. L. Branen, P. M. Davidson, & S. Salminen (Eds.), *Food additives* (pp. 139–191). New York, NY: Marcel Decker Inc..
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.
- Tarladgis, B., Watts, B. M., & Yonathan, M. (1960). Distillation method for determination of malonaldehyde in rancid food. *Journal of American Oil and Chemists' Society*, 37, 44–48.