

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

BENYOUB Asmae

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Impact du Colorant **E129 (Rouge Allura AC)
sur la Microflore intestinale
humaine.**

Soutenu le 21/Juin/2026

Devant le Jury composé de :

Président	DJIBAOUI Rachid	Pr	U. Mostaganem
Examinatrice	BOUABSA Foufa	MCB	U. Mostaganem
Encadrant	ARABI Abed	MCA	U. Mostaganem

Année universitaire 2025/2026

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes très chers parents, pour m'avoir fait grandir avec le désir du savoir et l'envie de découvrir. Vous m'avez donné le goût de l'effort sans quoi je ne serai là aujourd'hui.

***Mon père**, l'homme de ma vie, mon exemple éternel et mon soutien c'est toi qui as toujours sacrifié pour me voir réussir, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.*

***Ma mère**, quoi je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton amour et ta présence à mes coté ont toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*À ma très chère grand-mère, **Maya** Que Dieu te protège, te garde en bonne santé et t'accorde une longue vie remplie de bonheur.*

*À vous mes sœurs **Romaissa, Rahma, Timoucha et Khadidja***

*À mon frère, **Chemsou** que dieux garde à nous .*

*À mes chers cousines **Sarah, Rachida, Hiba, Farah et Rokaya.***

*À toutes ma famille paternelle **Benyoub** et maternelle **Guerrach.***

*Sans oublier mes amies **Aicha, Wissal, Ghizlane, Fatima Zohra, Sarah et Ikhlass.***

À celui qui partage ma vie, Merci pour ton soutien, ta confiance et tes encouragements. Cette réussite est aussi la tienne ♥

À tous les enseignants qui ont contribué à mon cursus et ma formation.

À mes camarades de promotion Master Biochimie appliquée 2026.

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce
Projet soit possible, je vous dis merci*

BENYOUB ASMAE

Remerciements

Avant tout, je remercie Allah le Tout-Puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadrant **Mr ARABI Abed** pour son encadrement, ses précieux conseils, sa disponibilité et son soutien tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions particulièrement Monsieur **DJIBAOUI Rachid** Professeur à l'université de Mostaganem qui nous fait l'honneur de présider ce jury, ainsi que Madame **BOUABSA Foufa** Docteur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Je remercie aussi l'ensemble des enseignants du département de biologie pour la qualité de leur formation et leurs efforts durant tout mon parcours universitaire. J'adresse une pensée reconnaissante à toute la personne du laboratoire pour leur aide technique, leur accueil et leur disponibilité.

*Enfin, je remercie chaleureusement ma famille, particulièrement **mes parents**, pour leur amour, leurs sacrifices, leurs encouragements et leur soutien moral permanent.*

*Mes remerciements vont également à **mes amis** et à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce mémoire.*



الملخص

يأتي هذا العمل في سياق دراسة التفاعلات بين التغذية والميكروبيوتا المعوية، التي تُعتبر عنصراً أساسياً في عملية الأيض وصحة الإنسان. وقد تركز الاهتمام العلمي على المواد المضافة الغذائية، وخاصة الأصباغ الاصطناعية الأزوية، ومن بينها اللون الأحمر ألو را (E129) AC ، المستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية. وعلى الرغم من ترخيص استخدامها، إلا أن هذه المركبات تثير قلقاً بسبب احتمال استقلالها من طرف الميكروبيوتا المعوية وتكوين نواتج ثانوية قد تؤثر على التوازن الميكروبي وبعض الوظائف الفسيولوجية.

كان الهدف من هذه الدراسة تقييم وجود E129 في مختلف المنتجات الغذائية، ودراسة تحلله بواسطة عمليات كيميائية (فنتون) وبيولوجية، وتحليل خصائص وتأثير النواتج الثانوية المتكونة على بعض الكائنات الدقيقة الممثلة للفلورا المعوية. تم قياس تركيز الصبغة بواسطة مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية، في حين أظهر نشاطها المضاد للأكسدة (اختبار DPPH) ضعفاً شديداً. كما لم تُظهر الصبغة النقية أي نشاط مضاد للميكروبات تجاه السلالات المختبرة.

أظهرت النتائج تراكيز تراوحت بين 8.45 و 65.92 ملغ/لتر في المنتجات الغذائية المدروسة، وهي ضمن حدود الجرعة اليومية المسموح بها (ADI) وقد بلغت نسبة التحلل القصوى 80.86%، وأكدت التحاليل الكروماتوغرافية (CCM) و (HPLC) تكوين نواتج ثانوية للتحلل. وقد أظهرت هذه النواتج نشاطاً مضاداً للميكروبات بدرجة متوسطة مع أقطار تثبيط تتراوح بين 7.4 و 10.7 مم.

وبشكل عام، رغم أن الصبغة النقية غير نشطة بيولوجياً وأن التراكيز المقاسة ضمن الحدود المسموح بها، إلا أن تحولها قد يؤدي إلى تكوين مستقلبات قد تؤثر على الميكروبيوتا المعوية وتساهم في اضطرابات هضمية وأيضية وسلوكية.

الكلمات المفتاحية: الميكروبيوتا المعوية، اللون الأحمر ألو را (E129) AC ، المضافات الغذائية، التحلل الحيوي، نواتج التحلل، النشاط المضاد للميكروبات، الجرعة اليومية المسموح بها (ADI).

Abstract

This work is situated within the context of studying the interactions between diet and the intestinal microbiota, which is considered a key actor in human metabolism and health. Scientific interest has focused on food additives, particularly azo synthetic dyes, including Allura Red AC (E129), which is widely used in the food industry. Despite their regulated use, these compounds raise concerns due to their potential metabolism by the intestinal microbiota and the formation of by-products that may influence microbial balance and certain physiological functions.

The aim of this study was to evaluate the presence of E129 in different food products, to investigate its degradation through chemical (Fenton) and biological processes, and to analyze the properties and impact of the resulting by-products on representative intestinal microbiota microorganisms. The dye quantification was performed using UV-Visible spectrophotometry, while its antioxidant activity (DPPH assay) was found to be very weak. The pure dye showed no antimicrobial activity against the tested strains.

The results showed concentrations ranging from 8.45 to 65.92 mg/L in the analyzed food products, remaining compliant with the acceptable daily intake (ADI). The degradation of the dye reached a maximum rate of 80.86%, and chromatographic analyses (TLC, HPLC) confirmed the formation of degradation by-products. These by-products exhibited moderate antimicrobial activity, with inhibition zones ranging from 7.4 to 10.7 mm.

Overall, although the pure dye is biologically inactive and the measured concentrations comply with safety standards, its transformation may generate metabolites capable of affecting the intestinal microbiota and being involved in digestive, metabolic, and behavioral disorders.

Keywords: Intestinal microbiota, Allura Red AC (E129), food additives, biodegradation, degradation by-products, antimicrobial activity, ADI.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le contexte de l'étude des interactions entre l'alimentation et le microbiote intestinal, considéré comme un acteur essentiel du métabolisme et de la santé humaine. L'intérêt scientifique s'est porté sur les additifs alimentaires, en particulier les colorants synthétiques azoïques, dont le Rouge Allura AC (E129), largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire. Malgré leur utilisation réglementée, ces composés suscitent des préoccupations en raison de leur métabolisme potentiel par le microbiote intestinal et de la formation de sous-produits pouvant influencer l'équilibre microbien et certaines fonctions physiologiques.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la présence du E129 dans différents produits alimentaires, d'étudier sa dégradation par des procédés chimiques (Fenton) et biologiques, et d'analyser les propriétés et l'impact des sous-produits formés sur des microorganismes représentatifs de la flore intestinale. Le dosage du colorant a été réalisé par spectrophotométrie UV-Visible, tandis que son activité antioxydante (test DPPH) s'est révélée très faible. L'activité antimicrobienne du colorant pur a montré une absence d'effet sur les souches testées.

Les résultats ont montré des concentrations variant entre 8,45 et 65,92 mg/L dans les produits alimentaires analysés, restant conformes à la DJA. La dégradation du colorant a atteint un taux maximal de 80,86 %, et les analyses chromatographiques (CCM, HPLC) ont confirmé la formation de sous-produits. Ces derniers ont présenté une activité antimicrobienne modérée avec des zones d'inhibition comprises entre 7,4 et 10,7 mm.

Globalement, bien que le colorant pur soit biologiquement inactif et que les concentrations mesurées respectent les normes de sécurité, sa transformation peut générer des métabolites susceptibles d'affecter le microbiote intestinal et d'être impliqués dans des désordres digestifs, métaboliques et comportementaux.

Mots-clés : Microbiote intestinal, Rouge Allura AC (E129), additifs alimentaires, biodégradation, sous-produits de dégradation, activité antimicrobienne, DJA.

Liste des Abréviations

A : Absorbance
AC : Acid Colour
AGCC : Acides gras à chaîne courte
CCM : Chromatographie sur couche mince
CE : Commission Européenne
CEE : Communauté Économique Européenne
CI : Colour Index
DJA : Dose journalière admissible
DMSO : Diméthyle sulfoxyde
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E : Europe
EDTA : Éthyle Diamine Tétracétate
EFSA : European Food Safety Authority
ES : Extrêmement sensible
FAO : Food and Agriculture
FD : Food Dyes
GC : Gaz chromatography
GEA : Gastro-entérite aigue
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
INES : Institut National des Études Supérieures
JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LC : Liquide chromatography
LiP : Lignine peroxydases
LPS : Lipopolysaccharides
mAU.s : milli-Absorbance Units × seconde
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MnP : Manganèse peroxydases
MS : Masse spectroscopy
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
POA : Procédés d'oxydation avancée
R : Résistant
Rf : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
S : Sensible
SCCS : Scientific Committee on Consumer Safety
SCF : Scientific Committee on Food
SIN : Système International de Numérotation
spp : plusieurs espèces
TDAH : Trouble Déficitaire de l'Attention avec Hyperactivité
tpm : Tour par minute
TS : Très sensible
UFC : Unité formant colonie
UV : Ultra-violet

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01	Codes des grandes familles d'additifs alimentaires	16
Tableau 02	Liste des souches microbiennes utilisées	32
Tableau 03	Dosage du colorant E129 dans différents produits alimentaires et leur DJA	45
Tableau 04	Résultats des examens microscopique et biochimiques des souches étudiées	52
Tableau 05	Cinétique de la dégradation chimique du colorant E129 en fonction du temps	54
Tableau 06	Cinétique de la biodégradation du colorant E129 en fonction du temps	56
Tableau 07	Valeur du diamètre des zones d'inhibition (en mm) des sous-produits sur les microorganismes testés	62

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 01	Répartition topographique de la flore digestive humaine	07
Figure 02	Composition du microbiote intestinal	09
Figure 03	Le rouge allura AC en poudre.	19
Figure 04	Structure moléculaire du rouge allura AC (E129)	20
Figure 05	Mécanisme de réduction azoïque du rouge allura AC	26
Figure 06	Le colorant alimentaire E129	31
Figure 07	Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible	34
Figure 08	Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant Rouge allura AC (E129).	38
Figure 09	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Agilent 1100).	41
Figure 10	Courbe d'étalonnage du colorant rouge allura AC (E129) par spectrophotométrie UV-Vis.	44
Figure 11	Évaluation de la concentration du colorant E129 dans les produits alimentaires analysés.	46
Figure 12	Absorbance maximale du rouge allura AC (E129) par spectrophotométrie UV-visible.	47
Figure 13	Aspect macroscopique de différentes souches sur les milieux gélosés appropriés.	49
Figure 14	Aspect microscopique de différentes souches après coloration de Gram au grossissement X100.	51
Figure 15	Test de catalase.	52
Figure 16	Test d'oxydase.	52
Figure 17	Suivie de la dégradation chimique du colorant E129 en fonction du temps par spectrophotométrie UV-Vis.	54
Figure 18	Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM).	55
Figure 19	Suivie de la biodégradation du colorant E129 en fonction du temps par spectrophotométrie UV-Vis.	57
Figure 20	Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM).	58
Figure 21	Analyse du Rouge Allura AC (E129) avant biodégradation par HPLC.	60
Figure 22	Analyse du Rouge Allura AC (E129) après biodégradation par HPLC.	60
Figure 23	Activité antimicrobienne des sous-produits issus de la dégradation du colorant rouge allura AC vis-vis ls microorganismes testés.	62

Table des Matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

Introduction	1
--------------	---

Partie Bibliographique

Chapitre 1. La flore intestinale humaine (Microbiote intestinal)

1.1. Définition et terminologie	5
1.2. Répartition topographique de la flore digestive humaine	5
1.2.1. Estomac	6
1.2.2. Intestin grêle	6
1.2.3. Côlon	6
1.3. Composition de la flore intestinale humaine	8
1.3.1. Principaux groupes microbiens	8
1.3.1.1. Flore dominante	8
1.3.1.2. Flore sous-dominante	8
1.3.1.3. Flore transitoire	8
1.3.1.4. Autres microorganismes (archées, levures et virus)	9
1.4. Fonctions biologiques de la flore intestinale humaine	10
1.4.1. Rôle métabolique	10
1.4.2. Rôle immunitaire	10
1.5. Déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose)	11
1.5.1. Facteurs d'agression de la flore intestinale	11
1.5.1.1. Âge	11
1.5.1.2. Antibiothérapie	11
1.5.1.3. Stress	11
1.5.2.4. Régime alimentaire	11
1.5.2.5. Additifs alimentaires et xénobiotiques	12
1.5.2.6. Gastroentérite aiguë	12
1.6. Flore intestinale et santé humaine	12

Chapitre 2. Les additifs alimentaires : classification, réglementation et impact du colorant Rouge Allura AC (E129) sur la santé

2.1. Définition	15
2.2. Classification des additifs alimentaires	15
2.2.1. Classification selon la fonction technologique	15
2.2.2. Classification selon l'origine	15
2.3. Codification des additifs alimentaires	16
2.3.1. Codification européenne « E »	16
2.3.2. Codification internationale (INS / SIN)	16
2.4. Origine des additifs alimentaires	17

2.4.1. Additifs alimentaires naturels	17
2.4.2. Additifs issus de la modification de produits naturels	17
2.4.3. Additifs alimentaires de synthèse	17
2.5. Conditions d'utilisation des additifs alimentaires	18
2.6. Impact des additifs alimentaires sur la santé	18
2.7. Le colorant alimentaire Rouge Allura AC (E129)	19
2.7.1. Définition et dénomination	19
2.7.2. Origine et nature chimique	19
2.7.3. Structure chimique du Rouge Allura AC	19
2.7.3.1. Groupements fonctionnels	20
2.7.4. Propriétés physico-chimiques	20
2.7.4.1. Solubilité et stabilité	20
2.7.5. Réglementation et dose journalière admissible (DJA)	20
2.7.5.1. Normes internationales (EFSA, FAO/OMS)	20
2.7.5.2. Limites autorisées	20
2.7.6. Impact du Rouge Allura AC sur la santé	21
2.7.7. Devenir intestinal de l'E129	21
2.7.8. Effets de l'E129 sur la composition de la flore intestinale	22
2.8. Techniques de dégradation du Rouge Allura AC (E129)	22
2.8.1. Méthodes physico-chimiques	22
2.8.1.1. Dégradation par oxydation chimique	22
2.8.1.2. Dégradation par le peroxyde d'hydrogène (procédé de Fenton)	23
2.8.1.3. Dégradation par l'ozone (O ₃)	23
2.8.1.4. Dégradation par photolyse	24
2.8.1.4.1. Photolyse UV directe	24
2.8.1.4.2. Photocatalyse (TiO ₂ /UV)	24
2.8.1.5. Dégradation par voie électrochimique	24
2.8.1.5.1. Electrooxydation	24
2.8.1.5.2. Electrocoagulation	25
2.8.1.6. Dégradation par adsorption chimique	25
2.8.1.6.1. Adsorption sur charbon actif	25
2.8.2. Méthodes de dégradation biologique par les bactéries intestinales	25
2.8.2.1. Mécanisme de réduction azoïque	25
2.9. Applications industrielles du colorant E129	27
2.9.1. Produits alimentaires	27
2.9.2. Produits pharmaceutiques	27
2.9.3. Produits cosmétiques	27

Partie Expérimentale

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Objectif de travail	31
3.2. Cadre d'étude	31
3.3. Matériel	31
3.3.1. Matériel non biologique	31
3.3.2. Matériel biologique (souches microbiennes)	31
3.4. Dosage du colorant E129 dans les produits alimentaires par spectrophotométrie UV-Visible	32

3.4.1. Élaboration de la courbe d'étalonnage du colorant E129	32
3.4.2. Préparation des échantillons alimentaires	32
3.4.3. Détermination de la concentration du E129	33
3.5. Évaluation des activités biologiques du colorant rouge allura AC (E129)	33
3.5.1. Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible	33
3.5.2. Activité antioxydant	34
3.5.3. Activité antimicrobienne	35
3.5.3.1. Repiquage des souches	35
3.5.3.2. Examen macroscopique	35
3.5.3.3. Examen microscopique	36
3.5.3.4. Tests biochimiques	36
3.5.3.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant E129	37
3.5.3.5.1. Préparation de la solution du colorant	37
3.5.3.5.2. Préparation de l'inoculum	37
3.5.3.5.3. Ensemencement et dépôt des disques	37
3.6. Dégradation du colorant E129 et analyse des sous-produits	39
3.6.1. Dégradation chimique	39
3.6.1.1. Cinétique de dégradation	39
3.6.1.2. Extraction des sous-produits	39
3.6.1.3. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM)	40
3.6.2. Dégradation biologique (microbienne)	40
3.6.2.1. Cinétique de la dégradation microbienne	40
3.6.2.2. Extraction des sous-produits de dégradation	41
3.6.2.3. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM, HPLC)	41
3.6.3. Activité antimicrobienne des sous-produits de dégradation biologique	42

Chapitre 4. Résultats et discussion

4.1. Dosage du colorant E129 dans les produits alimentaires par spectrophotométrie UV-Visible	44
4.1.1. Élaboration de la courbe d'étalonnage du colorant E129	44
4.1.2. Détermination de la concentration	45
4.2. Évaluation des activités biologiques du colorant rouge allura AC (E129)	47
4.2.1. Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible	47
4.2.2. Activité antioxydant	48
4.2.3. Activité antimicrobienne	48
4.2.3.1. Examen macroscopique	48
4.2.3.2. Examen microscopique	50
4.2.3.3. Tests biochimiques	52
4.2.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant E129	53
4.4. Dégradation du colorant E129 et analyse des sous-produits	54
4.4.1. Dégradation chimique	54
4.4.1.1. Extraction des sous-produits	55
4.4.1.2. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM)	55

4.4.2. Dégradation biologique (microbienne)	56
4.4.2.1. Extraction des sous-produits de la biodégradation	58
4.4.2.2. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM et HPLC)	58
4.4.2.3. Activité antimicrobienne des sous-produits de dégradation	61
Conclusion	63
Références bibliographiques	
Annexes	



Introduction

La santé humaine est étroitement liée à l'alimentation, qui représente bien plus qu'une simple source d'énergie et de nutriments. En effet, les aliments apportent également une grande diversité de composés susceptibles d'interagir avec les différents systèmes biologiques de l'organisme. Parmi ces interactions, celles mettant en jeu le microbiote intestinal occupent une place centrale dans les recherches actuelles. Considéré comme un véritable organe métabolique, le microbiote intestinal est constitué d'une communauté complexe de milliards de micro-organismes qui participent à de nombreuses fonctions essentielles, telles que la digestion des aliments, la synthèse de vitamines, la régulation du système immunitaire et le maintien de l'équilibre physiologique de l'hôte (**Rowland *et al.*, 2018**).

L'équilibre du microbiote intestinal peut être facilement perturbé par divers facteurs externes, notamment l'alimentation, les médicaments et certains additifs alimentaires. Cette altération, appelée dysbiose, se caractérise par une modification de la composition et de la diversité microbienne au sein de l'intestin. Elle peut entraîner un déséquilibre des fonctions métaboliques et immunitaires, favorisant ainsi l'apparition de troubles digestifs et de diverses pathologies. Plusieurs études ont également montré que certains composés alimentaires, notamment les additifs synthétiques, sont susceptibles d'influencer négativement la stabilité du microbiote intestinal (**Zhou *et al.*, 2023 ; Gultekin *et al.*, 2019**).

Ces dernières décennies, l'augmentation de la consommation d'aliments transformés s'est accompagnée d'un usage croissant d'additifs alimentaires destinés à améliorer l'aspect, la conservation et les qualités organoleptiques des produits. Bien que leur utilisation soit réglementée et évaluée sur le plan de la sécurité, leurs effets potentiels sur la santé suscitent un intérêt scientifique grandissant. En effet, plusieurs travaux récents indiquent que certains additifs peuvent modifier la composition et l'activité du microbiote intestinal, entraînant ainsi des perturbations de différentes fonctions physiologiques et métaboliques de l'organisme (**Zhou *et al.*, 2023**).

Parmi les différents additifs utilisés, les colorants alimentaires occupent une place importante. Leur principal rôle est d'améliorer l'aspect visuel des produits en leur conférant une coloration attrayante, uniforme et stable. Les colorants synthétiques, en particulier les colorants azoïques, sont largement employés dans l'industrie alimentaire en raison de leur fort pouvoir colorant, de leur excellente stabilité et de leur faible coût de fabrication. Toutefois, leur utilisation fait l'objet d'une attention particulière en raison des interrogations relatives à leur

métabolisme, à leurs effets toxicologiques potentiels ainsi qu'à leur persistance et leur impact sur l'environnement (**Gultekin *et al.*, 2019**).

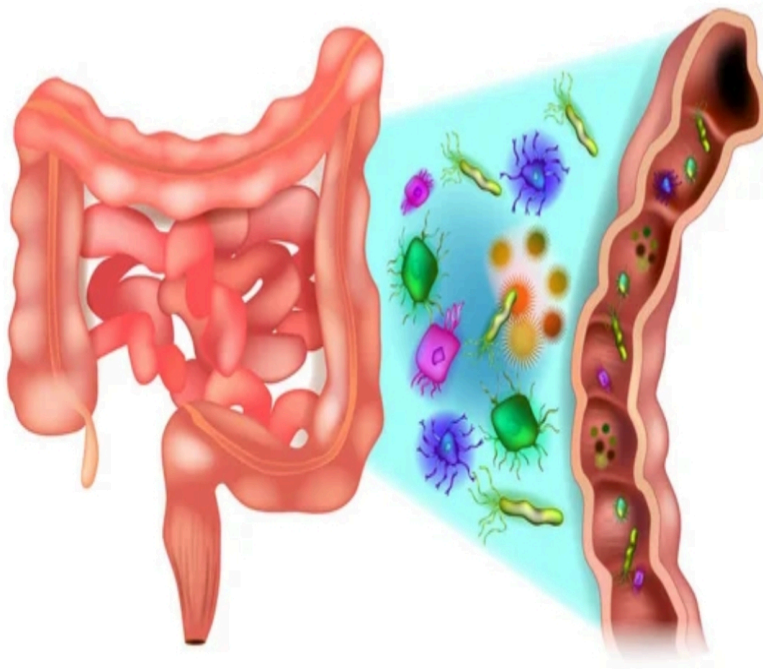
Le Rouge Allura AC (E129) est un colorant azoïque synthétique largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour la coloration de nombreux produits de consommation. Malgré son autorisation réglementaire, son innocuité fait l'objet de nombreuses études en raison de possibles effets indésirables, notamment des réactions d'hypersensibilité chez certains consommateurs. Après ingestion, ce colorant peut être métabolisé par le microbiote intestinal, conduisant à la réduction de sa liaison azoïque et à la formation de métabolites, tels que des amines aromatiques potentiellement toxiques. L'étude de ces mécanismes de biotransformation est essentielle pour mieux comprendre le devenir du E129 dans l'organisme et évaluer les risques associés à son utilisation (**Rovina *et al.*, 2016 ; Chung, 2016**).

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres. Les deux premiers chapitres portent sur la synthèse bibliographique et traitent respectivement de la microflore intestinale et des additifs alimentaires, en particulier le Rouge Allura AC (E129). La partie expérimentale comprend un chapitre sur le matériel et les méthodes, incluant le dosage du colorant, les procédés de dégradation et les techniques d'analyse, suivi d'un chapitre consacré aux résultats et à la discussion, présentant les concentrations du colorant, les essais de dégradation et l'identification des sous-produits, interprétés et comparés aux données de la littérature.

**Partie
Bibliographique**

Chapitre 1

La flore intestinale Humaine



1.1. Définition et terminologie

Le microbiote intestinal est constitué d'un écosystème riche et complexe, composé de milliards de micro-organismes. La mise en place de la flore intestinale humaine débute dès la naissance et évolue progressivement jusqu'à atteindre une relative stabilité à l'âge adulte. Ce processus est complexe, dynamique et influencé par plusieurs facteurs, notamment le mode de naissance, l'alimentation et l'environnement (**Bäckhed *et al.*, 2015**).

La colonisation intestinale débute à la naissance et dépend du mode d'accouchement : la voie basse favorise une flore d'origine maternelle, tandis que la césarienne entraîne une colonisation plus tardive et différente (**Biasucci *et al.*, 2010 ; EL Kaoutari *et al.*, 2014**). L'allaitement maternel enrichit le microbiote en bactéries bénéfiques, contrairement aux laits infantiles (**Roger *et al.*, 2010**), et peut compenser en partie les effets de la césarienne (**Arrieta *et al.*, 2014**). Le microbiote évolue ensuite avec l'âge, atteignant un profil adulte vers 2-3 ans, puis diminuant en diversité au cours du vieillissement (**Yatsunenکو *et al.*, 2012 ; O'Toole et Jeffery, 2015**).

Les altérations de la structure et de la fonction du microbiote peuvent affecter la perméabilité intestinale, la digestion, le métabolisme et les réponses immunitaires. Le déséquilibre du microbiote, ou dysbiose, est associé à un état pro-inflammatoire impliqué dans diverses pathologies gastro-intestinales, métaboliques, immunologiques et neuropsychiatriques (**Gomaa, 2020**). Le microbiote intestinal est un élément essentiel de la santé humaine et possède une fonction similaire à celle d'un organe métabolique. Il influence l'absorption des nutriments et le bien-être général, et co-évolue avec l'hôte. Comprendre cette interaction est crucial pour appréhender son rôle dans la santé et les maladies (**Valencia *et al.*, 2025**).

Ainsi, si la flore intestinale se limite aux bactéries observables, le microbiote reflète la diversité et les fonctions complexes de l'écosystème intestinal (**Inserm, 2021**). Par ailleurs le Microbiome intestinal est le génome collectif et fonctions de ces micro-organismes dans leur habitat intestinal (**Berg *et al.*, 2020**).

1.2. Répartition topographique de la flore digestive humaine

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif (fig. 1), du point de vue microbiologique, le tube digestif humain est constitué successivement de la cavité buccale, de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), du côlon, du rectum et de l'anus. La surface intestinale, estimée entre 150 et 200 m², offre une vaste interface pour les échanges avec l'environnement. Dans des conditions normales, la cavité buccale et le

tractus gastro-intestinal sont colonisés par une flore microbienne complexe, dont la répartition n'est pas uniforme le long du tube digestif. Cette distribution dépend de plusieurs facteurs locaux, tels que la teneur en oxygène, les sécrétions digestives, la disponibilité des nutriments et la vitesse du transit intestinal, qui est rapide de la bouche au cæcum et plus lent dans le côlon. En conséquence, on observe un gradient croissant de densité microbienne de la région orale vers le rectum (Zhang, 2025).

L'environnement gastro-intestinal comprend trois régions (Estomac, intestins grêles et le colon) qui offrent des conditions très différentes pour la survie des différents microorganismes (Ebel, 2012).

1.2.1. Estomac

La prolifération microbienne dans l'estomac est très faible, souvent estimée à l'ordre de (10^1 - 10^3 UFC/g), en raison de l'acidité élevée et des conditions physico-chimiques défavorables qui limitent fortement la croissance des microorganismes. Seules des espèces acido-tolérantes ou transitant rapidement peuvent être présentes dans ce milieu contraignant (Liu *et al.*, 2024).

1.2.2. Intestin grêle

L'intestin grêle présente une augmentation progressive de la densité microbienne de la partie proximale (duodénum) vers la partie distale (iléon).

- **Duodénum et jéjunum** : la charge bactérienne reste relativement faible (10^3 à 10^4 UFC/g) en raison du pH encore acide, du flux biliaire et des enzymes digestives. Les bactéries dominantes sont des anaérobies facultatifs telles que *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*.
- **Iléon** : la densité microbienne augmente (jusqu'à 10^7 - 10^8 UFC/g), avec une proportion croissante de bactéries anaérobies strictes, comme *Bacteroides* et *Clostridium* (Sekirov *et al.*, 2010).

1.2.3. Côlon

Le côlon constitue le principal réservoir microbien de l'organisme humain. Il offre des conditions favorables à la prolifération bactérienne : pH proche de la neutralité, absence d'oxygène et abondance de substrats fermentescibles. La densité microbienne y atteint 10^{11} à 10^{12} UFC/g. La flore colique est dominée par des bactéries anaérobies strictes, notamment *Firmicutes* (tels que *Clostridium*, *Faecalibacterium* et *Ruminococcus*) ; et *Bacteroidetes* tel que *Bacteroides*. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans la fermentation des fibres

Chapitre 1. La flore intestinale humaine

alimentaires, la production d'acides gras à chaîne courte et le maintien de l'homéostasie intestinale (Zhang *et al.*, 2015).

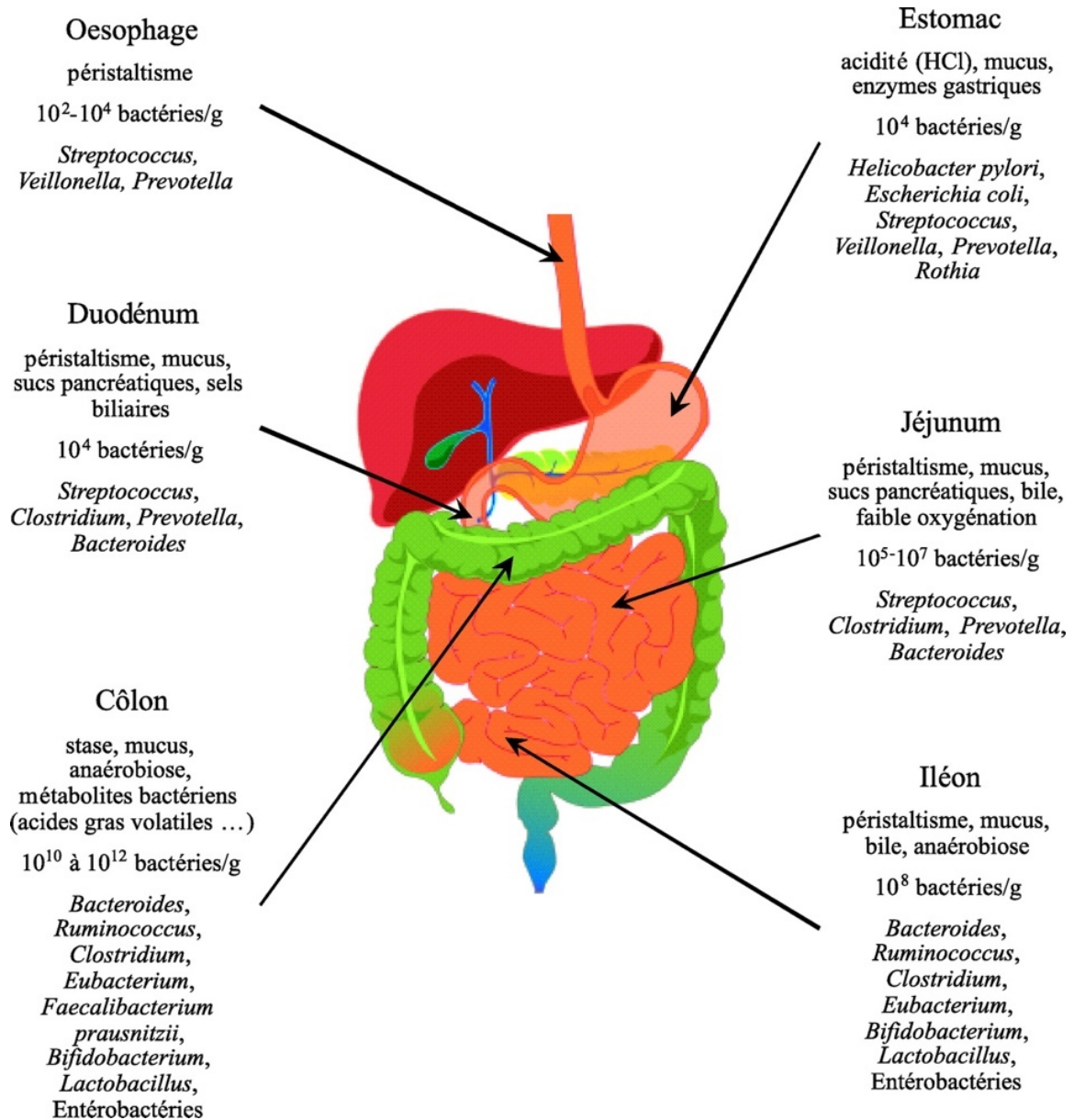


Figure 1. Répartition topographique de la flore digestive humaine (Coudeyras et Forestier, 2010).

1.3. Composition de la flore intestinale humaine

La flore normale regroupe les microorganismes présents de façon stable dans le tube digestif et capables de s'y multiplier (**Mountzouris *et al.*, 2002**). Sa composition varie fortement selon les méthodes d'analyse et les facteurs physiologiques et environnementaux. Elle reste encore imparfaitement connue, ce qui limite la compréhension de ses variations face à l'alimentation, aux bactéries exogènes et aux antibiotiques (**Gronlund *et al.*, 1999**).

1.3.1. Principaux groupes microbiens

1.3.1.1. Flore dominante

La flore dominante (fig. 2) représente la majorité des microorganismes intestinaux (environ 90 à 99 %). Elle est essentiellement composée de bactéries anaérobies strictes, notamment :

- **Firmicutes** : incluant les genres *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium* et *Ruminococcus*. Ces bactéries jouent un rôle clé dans la fermentation des fibres alimentaires et la production d'acides gras à chaîne courte.
- **Bacteroidetes**: dominés par le genre *Bacteroides*, ils participent à la dégradation des polysaccharides complexes et au métabolisme énergétique.
- **Actinobacteria** : représentés principalement par le genre *Bifidobacterium*, particulièrement abondant chez le nourrisson et impliqué dans la protection contre les agents pathogènes.
- **Proteobacteria** : comprenant *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries, présentes en faible proportion chez l'individu sain.

1.3.1.2. Flore sous-dominante

La flore sous-dominante est présente en proportions plus faibles (1 à 10 %). Elle est principalement constituée de bactéries anaérobies facultatives, telles que :

- *Escherichia coli*
- *Enterococcus spp.*
- *Streptococcus spp.*
- *Lactobacillus spp.*

Bien que moins abondantes, ces bactéries participent à l'équilibre intestinal et à la prévention de la colonisation par des agents pathogènes.

1.3.1.3. Flore transitoire

La flore transitoire est composée de microorganismes ingérés avec l'alimentation ou provenant de l'environnement. Elle ne s'implante pas durablement dans l'intestin et est

généralement éliminée par la flore résidente. Elle peut inclure des bactéries potentiellement pathogènes telles que *Salmonella* ou *Shigella* (Donaldson *et al.*, 2016).

1.3.1.4. Autres microorganismes (archées, levures et virus)

Les archées intestinales, principalement des méthanogènes comme *Methanobrevibacter smithii*, participent à la méthanogenèse en consommant l'hydrogène issu de la fermentation bactérienne, améliorant ainsi l'efficacité du métabolisme microbien et influençant le transit intestinal (Levyet *al.*, 2017).

Les levures, constituant le microbiote intestinal (genres *Candida*, *Saccharomyces*, *Malassezia*), sont normalement présents en faible quantité chez l'individu sain, mais peuvent proliférer excessivement, notamment *Candida albicans*, en cas de dysbiose ou d'immunodépression (Shkoporov et Hill, 2019). Enfin, les virus intestinaux forment le virome, majoritairement composé de bactériophages qui régulent les populations bactériennes et maintiennent la diversité microbienne, tandis que certains virus eucaryotes interagissent avec le système immunitaire de l'hôte (Underhill et Iliev, 2014).

Composition du microbiote intestinal

Plus de 100 000 milliards de micro-organismes habitent notre intestin !

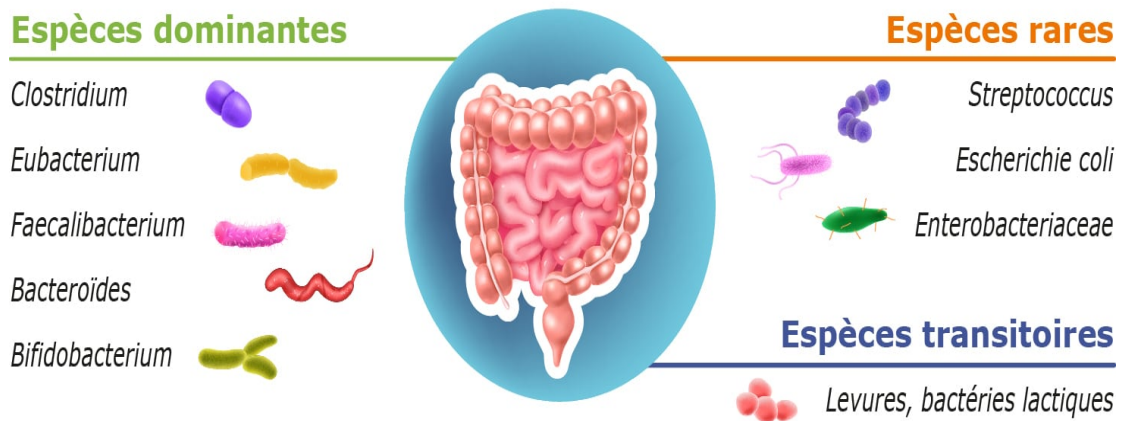


Figure 2. Composition du microbiote intestinal (Kassab, 2025).

1.4. Fonctions biologiques de la flore intestinale humaine

La flore intestinale humaine, jouant un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie physiologique de l'hôte. Elle intervient dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles, notamment les fonctions métaboliques, immunitaires et protectrices. Parmi celles-ci, le rôle métabolique représente l'une des fonctions majeures, assurant la transformation de nombreux substrats alimentaires non digestibles par les enzymes humaines (Sekirov *et al.*, 2010).

1.4.1. Rôle métabolique

Le microbiote intestinal assure un rôle métabolique fondamental, notamment à travers la fermentation des substrats alimentaires non digestibles tels que les fibres. Ces composés sont dégradés dans le côlon par des bactéries spécialisées produisant des métabolites intermédiaires, contribuant ainsi à l'équilibre énergétique et à la stabilité écologique du microbiote (Flint *et al.*, 2015). Cette fermentation conduit à la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), principalement l'acétate, le propionate et le butyrate, dont la synthèse dépend de la composition du microbiote et de la disponibilité des substrats. Ces métabolites jouent un rôle clé dans le fonctionnement intestinal et le métabolisme global (Koh *et al.*, 2016).

En outre, le microbiote intestinal participe activement au métabolisme des xénobiotiques, incluant les médicaments et les additifs alimentaires tels que les colorants azoïques, en les transformant en différents métabolites pouvant être plus ou moins actifs ou toxiques que les composés initiaux (Feng *et al.*, 2012).

1.4.2. Rôle immunitaire

Le développement et la maturation du système immunitaire débutent dès la vie fœtale et se poursuivent après la naissance sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux. À la naissance, ce système reste immature, et sa maturation dépend largement de l'exposition aux antigènes et de l'établissement du microbiote intestinal, qui favorisent la différenciation des cellules immunitaires et l'acquisition d'une réponse immunitaire équilibrée (Kamada *et al.*, 2013 ; Tarriño *et al.*, 2025).

La régulation de la réponse immunitaire repose sur un équilibre entre activation et tolérance, essentiel au maintien de l'homéostasie. Le microbiote intestinal intervient en modulant la production de cytokines et en induisant les lymphocytes T régulateurs, tandis que ses métabolites, notamment les acides gras à chaîne courte, participent à l'immunomodulation. Une perturbation de cet équilibre peut favoriser l'apparition de maladies inflammatoires ou auto-immunes (Arpaia *et al.*, 2013 ; Belkaid et Hand, 2014 ; Honda et Littman, 2016).

Le microbiote intestinal joue également un rôle de barrière contre les agents pathogènes en limitant leur colonisation par compétition pour les nutriments et les niches écologiques, ainsi que par la production de substances antimicrobiennes. Il contribue aussi à moduler l'environnement intestinal et à renforcer les défenses immunitaires locales, assurant ainsi une protection efficace contre les infections (**Buffie et Pamer, 2013**).

1.5. Déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose)

La dysbiose correspond à un déséquilibre durable du microbiote, caractérisé par une diminution des micro-organismes bénéfiques et/ou une augmentation de microbes potentiellement pathogènes. Cette altération affecte les fonctions métaboliques, immunitaires et l'homéostasie, et peut favoriser le développement de diverses maladies (**Shen et al., 2025**).

1.5.1. Facteurs d'agression de la flore intestinale

1.5.1.1. Âge

L'âge influence la composition du microbiote intestinal tout au long de la vie. Bien que la diversité microbienne puisse diminuer avec le vieillissement, certaines personnes âgées en bonne santé conservent une diversité comparable à celle des adultes plus jeunes, ce qui rend les résultats parfois contradictoires (**Galkin et al., 2020**).

1.5.1.2. Antibiothérapie

Les antibiotiques, en particulier à large spectre, entraînent une destruction non sélective des bactéries pathogènes et commensales, provoquant une perte de diversité microbienne et une perturbation durable de l'écosystème intestinal. Cette altération favorise la prolifération de bactéries opportunistes et peut persister plusieurs mois après l'arrêt du traitement, augmentant le risque de dysbiose et d'infections secondaires (**Dethlefsen et Relman, 2011**).

1.5.1.3. Stress

Le stress et la dépression peuvent perturber l'alimentation et modifier la croissance de la microflore intestinale. Ils affectent également sa composition par la sécrétion excessive d'hormones de stress, l'inflammation et des déséquilibres du système nerveux autonome, ce qui peut aggraver l'état général du microbiote (**Sri Sunarti, 2022**).

1.5.2.4. Régime alimentaire

Un régime alimentaire riche en produits animaux modifie rapidement la composition du microbiote intestinal en favorisant les bactéries tolérantes aux acides biliaires, telles que *Alistipes*, *Bilophila* et *Bacteroides*, tout en réduisant les bactéries impliquées dans la

dégradation des polysaccharides végétaux. Ces changements reflètent une adaptation du microbiote au type d'alimentation consommée et peuvent favoriser la prolifération de microorganismes associés aux maladies inflammatoires intestinales (**David *et al.*, 2014**).

1.5.2.5. Additifs alimentaires et xénobiotiques

L'exposition chronique aux additifs alimentaires, aux xénobiotiques et à divers facteurs environnementaux entraîne un contact continu de l'organisme avec des substances chimiques étrangères issues principalement de l'alimentation et de l'environnement. Certains additifs alimentaires, notamment les émulsifiants, les colorants et les édulcorants, peuvent interagir directement avec le microbiote intestinal, altérer sa composition et réduire sa diversité bactérienne. De même, les xénobiotiques, tels que les pesticides, les polluants ou les résidus médicamenteux, exercent des effets toxiques sur les bactéries commensales et favorisent la prolifération de micro-organismes opportunistes (**Chassaing *et al.*, 2015**). Les infections gastro-intestinales contribuent également à cette perturbation en provoquant une diminution transitoire ou durable de la diversité microbienne. Par ailleurs, des facteurs environnementaux comme la pollution et les mauvaises conditions d'hygiène affectent négativement la stabilité de la flore intestinale. L'ensemble de ces altérations favorise l'installation d'une dysbiose intestinale, souvent associée à des maladies inflammatoires chroniques, à des troubles métaboliques ainsi qu'à des dysfonctionnements immunitaires (**Zuo et Ng, 2018**).

1.5.2.6. Gastroentérite aiguë

Une banale gastro-entérite aiguë (GEA) virale ou, plus rarement, d'origine bactérienne altère la flore intestinale. La plupart des enfants des pays à haut niveau de vie guérissent rapidement d'une GEA. Cependant, certains développent le classique tableau de diarrhée grave prolongée post-infectieuse dont l'une des composantes est un déséquilibre durable de la flore intestinale avec toutes les conséquences que ses nombreux rôles physiologiques laissent supposer (**Arabi, 2018**).

1.6. Flore intestinale et santé humaine

La dysbiose intestinale, définie comme une altération de l'équilibre normal du microbiote intestinal, est fortement impliquée dans le développement de nombreuses pathologies inflammatoires et métaboliques. Dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, cette dysbiose se manifeste par une diminution importante de la diversité microbienne ainsi qu'une réduction des bactéries bénéfiques, notamment certaines espèces productrices d'acides gras à chaîne

courte. Ce déséquilibre favorise la dégradation de la couche de mucus protectrice et l'altération de la barrière épithéliale intestinale, permettant le passage de toxines et d'antigènes bactériens vers les tissus sous-jacents. Cette situation stimule excessivement le système immunitaire et entraîne une inflammation chronique de la muqueuse intestinale (**Desai *et al.*, 2016 ; Iliev *et al.*, 2025**).

Les troubles métaboliques, en particulier l'obésité. Certaines modifications du microbiote intestinal augmentent la capacité d'extraction énergétique des aliments, notamment à partir des fibres alimentaires fermentescibles, conduisant à une production excessive d'énergie stockée sous forme de graisse. De plus, l'altération de la perméabilité intestinale favorise le passage de lipopolysaccharides bactériens (LPS) dans la circulation sanguine, phénomène appelé endotoxémie métabolique. Cette translocation induit une inflammation chronique de bas grade qui contribue au développement de la résistance à l'insuline et à l'accumulation de tissu adipeux (**Hamjane *et al.*, 2024**).

Le diabète de type 2 est également associé à des perturbations importantes du microbiote intestinal. Les patients diabétiques présentent souvent une diminution des bactéries bénéfiques productrices de butyrate ainsi qu'une augmentation des bactéries pro-inflammatoires. Cette dysbiose participe à l'installation d'un état inflammatoire chronique et à l'insulinorésistance, perturbant ainsi le métabolisme du glucose et des lipides. Ces observations suggèrent que le microbiote intestinal joue un rôle clé dans la physiopathologie des maladies métaboliques (**Alqahtani, 2025**).

Le microbiote intestinal représente aujourd'hui une cible thérapeutique prometteuse. Plusieurs stratégies sont développées afin de restaurer l'équilibre microbien, notamment l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques, de symbiotiques et d'interventions nutritionnelles ciblées. De plus, la transplantation de microbiote fécal apparaît comme une approche innovante visant à rétablir une flore intestinale saine chez certains patients. La modulation du microbiote ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la prévention et le traitement personnalisé des maladies inflammatoires et métaboliques (**Gao *et al.*, 2024**).

Chapitre 2

*Les additifs alimentaires : classification,
réglementation et impact du colorant Rouge
Allura AC (E129) sur la santé*



2.1. Définition

Les additifs alimentaires sont définis comme étant des substances non consommées en tant que denrées alimentaires, ayant ou non une valeur nutritive et dont l'addition intentionnelle à une denrée alimentaire dans un but technologique ou organoleptique, à une étape quelconque de la fabrication de ladite denrée entraîne (directement ou indirectement) une modification des caractéristiques de l'aliment. L'incorporation intentionnelle de l'additif alimentaire à un aliment a pour but de garantir la qualité sanitaire des aliments, conférer une texture particulière à l'aliment, améliorer l'aspect et le goût d'une denrée alimentaire ou garantir la stabilité du produit (Gaouar *et al.*, 2022).

2.2. Classification des additifs alimentaires

2.2.1. Classification selon la fonction technologique

Selon l'Autorité européenne de sécurité des aliments (2025), Les additifs alimentaires apparaissent sous de nombreuses formes, qu'il s'agisse de conservateurs, d'édulcorants, d'émulsifiants ou encore de colorants alimentaires. Ils jouent un rôle essentiel dans la production alimentaire, en assurant la sécurité des produits et le respect de bonnes conditions de conservation tout au long de la chaîne d'approvisionnement alimentaire, de l'usine à l'assiette. Voici quelques exemples d'additifs alimentaires :

- **Conservateurs** : ajout de nitrates et de nitrites dans des produits à base de viande, de poisson ou de fromage.
- **Exhausteurs** : ajout de dioxyde de soufre dans le vin, pour en préserver la saveur.
- **Couleurs alimentaires** : naturels ou synthétiques renforçant l'attrait visuel d'un produit.
- **Épaississants** : gomme xanthane (E415), souvent présente dans les sauces.

2.2.2. Classification selon l'origine

L'origine des additifs alimentaires constitue l'un des principaux critères utilisés pour leur classification, ces substances pouvant provenir de sources diverses.

- **Additifs naturels** : Provenant de substances naturelles d'origine minérale (sulfites, nitrite), végétale (épaississant extrait de graines, d'algues et curcumine, le bêta carotène, le paprika et le jus de betterave), animale (colorant comme le rouge cochenille).
- **Additifs synthétiques** : Issu de la transformation chimique d'additif naturel tel que les édulcorants issus des fruits.
- **Additifs similaires aux naturels** : Ce sont des substances utilisées pour substituer les AA naturels, mais elles sont obtenues par synthèse chimique. C'est le cas, par exemple, de l'acide ascorbique (vitamine C).

- **Additifs artificiels :** Ce sont ceux qui n'ont aucun homologue dans la nature. Ils sont entièrement artificiels et obtenus par synthèse chimique. C'est le cas de certains antioxygènes, colorant érythrosine, tartrazine ou édulcorants à l'instar de la saccharine (Carocho *et al*, 2014).

2.3. Codification des additifs alimentaires

2.3.1. Codification européenne « E »

L'utilisation des AA est réglementée en Europe par la directive 89/107/CEE, qui établit 25 catégories d'additifs avec un système de codage standardisé. Chaque additif autorisé se voit attribuer un code du type "Exxx", où la lettre "E" représente l'Europe, suivie d'un numéro permettant d'identifier facilement la catégorie à laquelle il appartient (Gallen et Pla, 2013).

Tableau 1. Codes des grandes familles d'additifs alimentaires (Gallen et Pla, 2013).

Grandes familles d'additifs	
E 100	Colorants
E 200	Conservateurs
E 300	Antioxydants
E 400	Agents de texture
E 500	Antiagglomérants
E 600	Exhausteurs de gout
E 700	Agents de sapidité
E 800	Aromes
E 900	Edulcorants
E 1400	Amidons modifiés

2.3.2. Codification internationale (INS / SIN)

Le Système international de numérotation des additifs alimentaires (SIN) est destiné être un système de dénomination harmonisée pour les additifs alimentaires en tant qu'alternative à l'emploi du nom spécifique qui peut être long.

Le SIN dans l'ordre numérique est disposé en quatre colonnes contenant le numéro d'identification, le nom de l'additif alimentaire, les catégories fonctionnelles et les fonctions technologiques. Le numéro d'identification constitue généralement en trois ou quatre chiffres comme 100 pour les curcumines et 1001 pour les esters et les sels de choline. Toutefois dans certains cas, le numéro est suivi d'un suffixe alphabétique, par exemple, 150a qui identifie le caramel I (caramel nature) et 150b identifie le caramel II (caramel sulfite). Les désignations alphabétiques sont introduites dans l'ordre afin de caractériser davantage les différents types

d'additifs (par exemple le caramel produit par différents procédés). Dans la colonne correspondant au nom de l'additif, certains additifs sont encore subdivisés au moyen d'indices numériques. Par exemple les curcumines sont subdivisées en (i) curcumine et (ii) curcuma. Ces identifications identifient les sous-classes (dans ce cas celles des curcumines) qui sont couvertes par des spécifications distinctes du Codex (**Codex alimentaires, 2021**).

2.4. Origine des additifs alimentaires

2.4.1. Additifs alimentaires naturels

Les additifs d'origine naturelle sont obtenus directement à partir de sources végétales, animales ou minérales grâce à des procédés physiques ou thermiques simples. L'origine végétale représente la source la plus répandue de ces substances. Parmi les exemples les plus connus figurent la pectine (E440), extraite des pépins de pommes ou des écorces d'agrumes, la chlorophylle (E140) provenant des feuilles vertes, ainsi que la gomme arabique (E414) obtenue à partir de l'acacia. Certains additifs sont également d'origine animale, bien qu'ils soient moins nombreux. C'est notamment le cas du rouge cochenille (E120), extrait d'un insecte, de la cire d'abeille (E901) utilisée comme agent de glaçage, ou encore du lysozyme (E1105) obtenu à partir du blanc d'œuf. Enfin, les additifs d'origine minérale proviennent de roches ou de gisements naturels, comme le carbonate de calcium (E170), les oxydes de fer (E172) ou le chlorure de sodium, communément appelé sel (**Carocho et al., 2015**).

2.4.2. Additifs issus de la modification de produits naturels

Ce sont des additifs obtenus par modification chimique d'un extrait naturel d'une substance végétale ou animale dans le but d'améliorer ses propriétés. C'est le cas, par exemple, des émulsifiants produits à partir des huiles végétales, des édulcorants issus des fruits et des acides organiques dérivés d'huiles comestibles (**Amrouche, 2011**).

2.4.3. Additifs alimentaires de synthèse

Un additif alimentaire synthétique (ou chimique) est obtenu par synthèse chimique, lorsque l'extraction des substances naturelles (additifs alimentaires naturelles) est coûteuse, ces dernières peuvent être reconstituées par synthèse chimique. Les additifs ainsi fabriqués sont identiques aux substances naturelles déjà existantes. La synthèse chimique peut également être utilisée pour la fabrication des additifs totalement artificiels. De nos jours, les additifs alimentaires de synthèse sont les plus largement utilisés en industrie alimentaire, mais ces derniers provoquent des réactions allergiques chez les personnes sensibles, maladies cutanées, des troubles gastriques et intestinaux, problèmes de tension artérielle et des cancers et même

peut être dangereux pour les enfants. En outre, ils ne sont pas considérés comme dangereux, à condition de respecter un dosage quotidien. Autrement dit, respecter la dose journalière admissible (DJA) (Saci et Sahiri, 2020).

2.5. Conditions d'utilisation des additifs alimentaires

Les additifs alimentaires sont soumis à des limites réglementaires strictes fondées sur des évaluations scientifiques approfondies visant à protéger la santé humaine. Ces évaluations sont réalisées par des organismes internationaux tels que l'Autorité européenne de sécurité des aliments et le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, qui déterminent notamment la Dose Journalière Admissible (DJA). Celle-ci correspond à la quantité maximale d'un additif pouvant être consommée quotidiennement sans risque appréciable pour la santé, exprimée en mg/kg de poids corporel. Par ailleurs, des limites maximales d'incorporation sont fixées selon les catégories alimentaires, garantissant une exposition sécuritaire pour le consommateur. Dans certains cas, le principe de « quantum satis » est appliqué, autorisant l'utilisation de l'additif à la dose minimale nécessaire sans fixer de limite numérique précise. Les réglementations européennes, notamment le règlement (CE) n°1333/2008, encadrent également les conditions d'utilisation et prévoient une réévaluation continue des additifs en fonction des nouvelles données scientifiques (Commission européenne, 2020)

2.6. Impact des additifs alimentaires sur la santé

De nombreux produits alimentaires commercialisés contiennent divers conservateurs destinés à prolonger leur durée de conservation. Parmi les conservateurs les plus utilisés figurent l'acide benzoïque, l'acide sorbique, les parabènes ainsi que leurs sels. Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation excessive de ces substances peut être associée à différents effets néfastes sur la santé humaine (Msagati, 2013).

Les principaux effets indésirables rapportés comprennent l'urticaire, l'angioœdème et l'asthme. Certains travaux suggèrent également une relation entre ces conservateurs et l'hyperactivité chez l'enfant. D'autres manifestations cliniques ont aussi été décrites, notamment la dermatite exfoliative, l'érythème, la rhinite, les nausées, les céphalées, le bronchospasme migraineux, les brûlures œsophagiennes, les vomissements, les diarrhées, la faiblesse musculaire, l'acidose métabolique, les convulsions ainsi qu'un amaigrissement important (Tighrine, 2019).

Par ailleurs, plusieurs recherches ont évoqué le potentiel neurotoxique, cancérigène et tératogène de certains conservateurs alimentaires. Une étude réalisée in vitro sur des

lymphocytes humains a démontré que ces composés peuvent provoquer des aberrations chromosomiques, révélant ainsi leur caractère clastogène (Zengin *et al.*, 2011).

2.7. Le colorant alimentaire Rouge Allura AC (E129)

2.7.1. Définition et dénomination

Le Rouge Allura AC (E129) est un colorant alimentaire synthétique (fig. 3) appartenant à la famille des colorants azoïques, largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour conférer une coloration rouge vif aux aliments et aux boissons (Rovina *et al.*, 2016).



Figure 3. Le rouge allura AC en poudre.
<https://french.alibaba.com/g/allura-red-e129.htm>

Il est identifié par la codification européenne E129 et correspond également à la dénomination internationale INS. Ce colorant est aussi connu sous l'appellation FD et C Red No. 40 aux États-Unis. Ainsi, le Rouge Allura AC est un additif colorant de synthèse couramment employé pour améliorer l'aspect visuel des produits alimentaires (Amchova *et al.*, 2015).

2.7.2. Origine et nature chimique

Le rouge Allura est fabriqué par couplage de l'acide 5-amino-4-méthoxy-2-toluènesulfonique diazoté avec l'acide 6-hydroxy-2-naphtalènesulfonique. Sa formule moléculaire est $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$ (masse molaire : 496,42 g/mol). Il se présente sous forme de poudre ou de granulés rouge foncé, soluble dans l'eau, et légèrement soluble dans l'éthanol à 50 %. Son absorption maximale dans l'eau est de 504 nm, à pH 7 (Carmen, 2008).

Le Rouge Allura AC appartient à la classe des colorants azoïques synthétiques, qui sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire en raison de leur coût faible, de leur facilité de production et de leur forte capacité colorante. Cependant, certains colorants azoïques peuvent être métabolisés dans l'organisme en amines aromatiques, ce qui soulève des préoccupations toxicologiques (Chung, 2016).

2.7.3. Structure chimique du Rouge Allura AC

La structure chimique du Rouge Allura AC est basée sur un système aromatique comportant une liaison azo ($-N=N-$) constitue le groupement chromophore principal

responsable de la couleur rouge du colorant. Elle permet l'absorption de certaines longueurs d'onde de la lumière visible. Il contient plusieurs groupements fonctionnels (EFSA, 2009).

2.7.3.1. Groupements fonctionnels

La molécule de Rouge Allura AC (fig. 4) présente quatre types de groupements fonctionnels principaux qui déterminent ses propriétés physico-chimiques et biologiques :

- Deux groupements sulfonates ($-\text{SO}_3\text{Na}$) responsables de la forte solubilité dans l'eau et de la charge anionique ;
- Un groupement hydroxyle phénolique ($-\text{OH}$) participant aux propriétés chromophores et à la réactivité biologique ;
- Un groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3$) influençant la lipophilicité et la réactivité métabolique ;
- Un groupement méthyle ($-\text{CH}_3$) contribuant à la stabilité de la molécule (Rovina *et al.*, 2016).

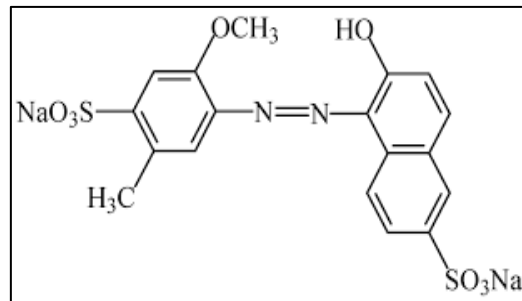


Figure 4. Structure moléculaire du rouge allura AC (E129) (Rovina *et al.*, 2016).

2.7.4. Propriétés physico-chimiques

2.7.4.1. Solubilité et stabilité

Grâce aux groupements sulfonates anioniques, le Rouge Allura AC présente une hydrosolubilité très élevée (supérieures à 200 g/L à 25°C), ce qui le rend particulièrement adapté aux applications en milieu aqueux telles que les boissons, les gèles et les sauces. Le Rouge Allura AC présente une stabilité physico-chimique remarquable dans les conditions habituelles de transformation et de stockage alimentaire. Sa stabilité thermique est maintenue jusqu'à 220°C (Barciela *et al.*, 2023).

2.7.5. Réglementation et dose journalière admissible (DJA)

2.7.5.1. Normes internationales (EFSA, FAO/OMS)

Le rouge Allura AC a fait l'objet de deux évaluations majeures par le JECFA (1980) et le Comité scientifique européen pour les aliments (SCF) en 1984 et 1989, aboutissant toutes deux à l'établissement d'une DJA de 0-7 mg/kg de poids corporel par jour. En 2009, l'EFSA a conduit une réévaluation approfondie intégrant les nouvelles données de génotoxicité (Tsuda *et al.*, 2001).

2.7.5.2. Limites autorisées

En vertu du règlement (CE) n°1333/2008 et de ses annexes, les teneurs maximales autorisées en Rouge Allura AC varient selon les catégories d'aliments, avec des seuils

généralement compris entre 25 et 300 mg/kg ou mg/L. Les valeurs les plus élevées (300 mg/kg) sont autorisées pour les confiseries, tandis que les boissons aux fruits ne peuvent en contenir que 50 mg/L. Plusieurs États membres européens (Allemagne, Autriche, Suède, Norvège, Danemark) ont historiquement imposé des restrictions plus sévères ou des interdictions nationales, bien que celles-ci aient été remises en cause par le processus d'harmonisation européenne (EFSA, 2009).

2.7.6. Impact du Rouge Allura AC sur la santé

Les adultérants alimentaires sont des substances chimiques ou biologiques ajoutées intentionnellement aux aliments afin de réduire les coûts de production et d'en gonfler artificiellement la qualité, ce qui peut entraîner des maladies chez les consommateurs (Eunice *et al.*, 2010). Certains colorants alimentaires synthétiques peuvent être toxiques pour les organismes aquatiques et cancérigènes pour l'homme, notamment en cas de consommation excessive (Ceyhan *et al.*, 2013).

L'étude toxicologique du Rouge Allura a été réalisée par le JECFA en 1980 et par le SCF en 1984 et 1989. Le Rouge Allura est capable de se décomposer par les enzymes azoréductases présentes dans les bactéries intestinales et les cellules hépatiques, libérant ainsi des amines aromatiques dans l'organisme. Ces amines provoquent des maux de tête fréquents chez l'adulte et, chez l'enfant, une distraction et une hyperactivité TDAH (Huang *et al.*, 2003).

L'avis scientifique du groupe scientifique de l'EFSA conclut que le rouge allura peut provoquer des réactions allergiques telles que l'urticaire et l'asthme, notamment lorsqu'il est mélangé à d'autres colorants synthétiques dans les produits alimentaires. Cependant, le groupe scientifique de l'EFSA a indiqué que la DJA (dose journalière admissible) n'était pas modifiée, car les niveaux d'utilisation actuels au sein de la population européenne sont loin d'atteindre la limite officielle de 0,4 à 0,6 mg par jour pour le 95^e percentile de la population (Fallico *et al.*, 2011).

2.7.7. Devenir intestinal de l'E129

Après ingestion, le Rouge Allura AC traverse le tractus gastro-intestinal où son absorption est limitée au niveau de l'intestin grêle. Une proportion importante du colorant atteint le côlon, où elle est exposée à la flore intestinale (Chung, 2016).

Ainsi, le devenir intestinal de l'E129 est fortement influencé par le microbiote colique. Une fois dans le côlon, le colorant peut subir des transformations enzymatiques qui modifient sa structure chimique et ses propriétés biologiques. Par ailleurs, des études expérimentales ont montré que l'exposition chronique au Rouge Allura AC peut entraîner des modifications

fonctionnelles de l'environnement intestinal, notamment une augmentation de la sérotonine colique et une altération de la barrière épithéliale (**Kwon *et al.*, 2022**).

Les colorants azoïques, tels que le Rouge Allura AC, possèdent dans leur structure un groupement azo caractéristique : $-N=N-$. Au niveau intestinal, ces composés subissent une biotransformation principalement sous l'action des bactéries du microbiote intestinal. Certaines bactéries anaérobies, notamment des genres *Bacteroides*, *Clostridium* et *Escherichia*, produisent des enzymes appelées azoréductases capables de réduire la liaison azoïque. Cette réaction enzymatique provoque la rupture du groupement azo ($-N=N-$) et conduit à la formation d'amines aromatiques (**Chung, 2016**).

Une revue récente indique également que le métabolisme du E129 dans le microbiote peut générer des composés comme l'acide sulfonique de crésidine et des dérivés naphtaléniques, soulignant la complexité de sa transformation (**Elder *et al.*, 2023**).

2.7.8. Effets de l'E129 sur la composition de la flore intestinale

Kwon *et al.* (2022), ont montré que L'exposition au Rouge Allura AC peut entraîner des modifications de la composition du microbiote intestinal. Des travaux expérimentaux ont montré que ce colorant est capable d'induire des changements dans la diversité et la structure des populations bactériennes. Ces résultats suggèrent que le E129 peut induire une dysbiose intestinale, caractérisée par un déséquilibre entre les différentes populations microbiennes.

Toutefois, les études chez l'humain restent encore limitées. Une étude récente *in vitro* a montré que, dans des conditions d'exposition aiguë, le E129 n'entraîne pas de perturbation majeure du microbiote humain, mais souligne la nécessité d'étudier les effets à long terme. Ainsi, l'impact du E129 sur la composition du microbiote semble dépendre de plusieurs facteurs, notamment la dose, la durée d'exposition et l'état initial de la flore intestinale (**Granja-Iglesias *et al.*, 2025**).

2.8. Techniques de dégradation du Rouge Allura AC (E129)

2.8.1. Méthodes physico-chimiques

2.8.1.1. Dégradation par oxydation chimique

La dégradation chimique du Rouge Allura AC repose essentiellement sur des réactions d'oxydation qui provoquent la rupture de la liaison azoïque et des structures aromatiques du colorant. Ces procédés transforment le composé en substances plus simples, généralement moins colorées et moins toxiques. Ils sont largement utilisés pour le traitement des effluents contenant des colorants alimentaires et textiles. Les méthodes oxydatives se distinguent par leur rapidité et leur grande efficacité dans la réduction de la charge organique. Cependant, elles

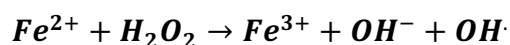
peuvent entraîner la formation de sous-produits aromatiques potentiellement toxiques, nécessitant parfois un traitement complémentaire (Gosetti *et al.*, 2012).

Les procédés d'oxydation avancée (POA) regroupent plusieurs méthodes produisant des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), considérés parmi les oxydants les plus puissants. Ces radicaux réagissent rapidement avec les molécules organiques et provoquent la rupture de la liaison azoïque du Rouge Allura AC. Les POA comprennent principalement les systèmes UV/H₂O₂, O₃/H₂O₂, photo-Fenton et TiO₂/UV. Ces procédés permettent une minéralisation partielle ou totale du colorant, avec formation finale de CO₂, H₂O et ions minéraux. L'efficacité dépend du pH, de la concentration en oxydant et du temps d'irradiation (Oturán et Aaron, 2014).

2.8.1.2. Dégradation par le peroxyde d'hydrogène (procédé de Fenton)

La dégradation du colorant Rouge Allura AC (E129) par le procédé de Fenton est une méthode d'oxydation avancée largement utilisée dans le traitement des effluents contenant des colorants organiques. Ce procédé repose sur la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les ions ferreux (Fe²⁺), générant des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), extrêmement réactifs et oxydants.

La réaction principale de Fenton est la suivante :

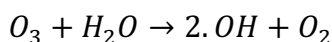


Les radicaux hydroxyles produits attaquent les liaisons azoïques ($-\text{N}=\text{N}-$) et les cycles aromatiques du Rouge Allura, entraînant la rupture de la structure chromophore responsable de la coloration. Cette réaction conduit à une décoloration rapide du milieu ainsi qu'à la formation de composés organiques plus simples, pouvant être ensuite minéralisés en CO₂ et H₂O (Wakrim *et al.*, 2018).

Ce procédé présente plusieurs avantages, notamment une forte efficacité de dégradation, une faible production de résidus secondaires et une application relativement simple dans le traitement des eaux usées. Cependant, une concentration excessive de H₂O₂ peut diminuer le rendement du procédé en consommant les radicaux hydroxyles produits (Pera-Titus *et al.*, 2004).

2.8.1.3. Dégradation par l'ozone (O₃)

L'ozonation est une technique d'oxydation chimique efficace utilisée pour éliminer les colorants azoïques tels que le Rouge Allura AC (E129). L'ozone (O₃) agit comme un puissant agent oxydant capable d'attaquer directement la liaison azoïque ($-\text{N}=\text{N}-$) ainsi que les structures aromatiques du colorant. Cette réaction entraîne la décoloration rapide du milieu et la formation de composés organiques plus simples.



En milieu aqueux, l'ozone peut également se décomposer pour produire des radicaux hydroxyles ($\cdot OH$), ce qui augmente l'efficacité de dégradation du colorant. L'ozonation présente plusieurs avantages, notamment une action rapide, une forte capacité oxydante et une réduction importante de la charge organique des effluents. Cependant, ce procédé peut générer certains sous-produits aromatiques nécessitant parfois un traitement complémentaire (Al-Shabib *et al.*, 2023).

2.8.1.4. Dégradation par photolyse

2.8.1.4.1. Photolyse UV directe

Dans la photolyse UV directe, le colorant absorbe directement les rayonnements UV, ce qui provoque une excitation électronique suivie de la rupture des liaisons chimiques. La liaison azoïque du Rouge Allura AC est particulièrement sensible à ce type de traitement. Cette méthode permet une décoloration progressive du milieu et peut conduire à la formation d'amines aromatiques intermédiaires. L'efficacité dépend fortement de la longueur d'onde utilisée et de l'intensité lumineuse (Pera-Titus *et al.*, 2004).

2.8.1.4.2. Photocatalyse (TiO_2 /UV)

La photocatalyse hétérogène utilisant le dioxyde de titane (TiO_2) constitue l'une des techniques les plus efficaces pour la dégradation des colorants azoïques. Sous irradiation UV, le TiO_2 produit des électrons et des trous capables de générer des radicaux hydroxyles très réactifs. Ces espèces oxydantes attaquent les structures aromatiques du Rouge Allura AC et entraînent une dégradation progressive jusqu'à la minéralisation partielle du composé. Le TiO_2 présente l'avantage d'être peu coûteux, stable et non toxique (Al-Shabib *et al.*, 2023).

2.8.1.5. Dégradation par voie électrochimique

2.8.1.5.1. Electrooxydation

L'électrooxydation repose sur l'oxydation directe ou indirecte des molécules organiques à la surface de l'anode. Ce procédé produit des espèces oxydantes très réactives, notamment les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$), capables de dégrader la liaison azoïque du colorant jusqu'à former des composés plus simples. Cette technique est surtout utilisée pour la destruction chimique des polluants organiques et la réduction de la charge organique des effluents (Panizza et Cerisola, 2009).

2.8.1.5.2. Electrocoagulation

L'électrocoagulation repose sur la dissolution d'électrodes métalliques, généralement en fer ou en aluminium. Les ions métalliques libérés forment des hydroxydes métalliques qui adsorbent et précipitent les molécules du colorant présentes dans l'eau. Les hydroxydes formés agissent comme des coagulants permettant l'élimination des particules et des colorants par floculation. Cette méthode est particulièrement efficace pour réduire la turbidité et éliminer les matières en suspension (Mollah *et al.*, 2001).

2.8.1.6. Dégradation par adsorption chimique

L'adsorption est une technique de traitement largement utilisée pour éliminer les colorants organiques des effluents industriels. Ce procédé consiste à fixer les molécules du colorant sur la surface d'un matériau adsorbant. L'efficacité de l'adsorption dépend de plusieurs paramètres tels que le pH, la température, la surface spécifique de l'adsorbant et la structure chimique du colorant (Crini, 2006).

2.8.1.6.1. Adsorption sur charbon actif

Le charbon actif est l'un des adsorbants les plus utilisés pour l'élimination des colorants azoïques grâce à sa très grande surface spécifique et sa porosité élevée. Les molécules du Rouge Allura AC sont retenues à la surface du charbon par des interactions physiques et chimiques. Cette technique permet une élimination rapide du colorant et une amélioration de la qualité des eaux traitées. Cependant, le coût élevé du charbon actif peut limiter son utilisation à grande échelle (Bhatnagar et Sillanpää, 2010).

2.8.2. Méthodes de dégradation biologique par les bactéries intestinales

La dégradation biochimique du Rouge Allura AC dans l'intestin humain est principalement assurée par les enzymes azoréductases produites par les bactéries intestinales. Ces enzymes catalysent la réduction de la liaison azo ($-N=N-$) du E129 en présence de NADH ou NADPH comme cofacteurs, conduisant à la formation d'amines aromatiques. Des études ont montré que des bactéries comme *Escherichia coli*, *Proteus spp* et *Klebsiella pneumoniae* possèdent une activité azoréductase importante capable de dégrader efficacement le E129 (Feng *et al.*, 2020).

2.8.2.1. Mécanisme de réduction azoïque

De nombreuses études ont démontré la capacité des bactéries à dégrader les colorants azoïques. Contrairement aux champignons et aux actinomycètes, qui réalisent cette dégradation principalement par des mécanismes extracellulaires faisant intervenir des enzymes telles que

les lignine peroxydases (LiP), les manganèse peroxydases (MnP) et les laccases, les bactéries agissent surtout par voie intracellulaire. Ainsi, le processus de décoloration dépend à la fois de l'activité enzymatique cytoplasmique et de la capacité des molécules colorantes à traverser la membrane cellulaire (**Mansour *et al.*, 2011**).

La dégradation complète, ou minéralisation, des colorants azoïques par les bactéries se déroule généralement en deux étapes successives : une azoréduction en conditions anaérobies, suivie d'une oxydation aérobie des amines aromatiques générées lors de la première étape. Le mécanisme de réduction azoïque repose sur un transfert d'électrons assuré par des cofacteurs réduits tels que le NADH ou le NADPH, conduisant à la rupture de la liaison azoïque (-N=N-) responsable de la coloration du composé. Cette réaction entraîne la formation de deux amines aromatiques distinctes, dont certaines peuvent présenter une toxicité plus élevée que le colorant initial et être associées à des effets mutagènes ou cancérogènes (**Stolz, 2001**). L'azoréduction constitue donc l'étape clé du processus de décoloration des colorants azoïques (fig. 5) Cependant, certaines souches bactériennes sont capables d'effectuer cette réduction même en présence d'oxygène, ce qui permet de distinguer des bactéries décolorantes aérobies et anaérobies. Parmi les microorganismes les plus étudiés pour cette propriété, les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent une place importante en raison de leur efficacité dans la biodégradation des colorants azoïques (**Mansour *et al.*, 2011**).

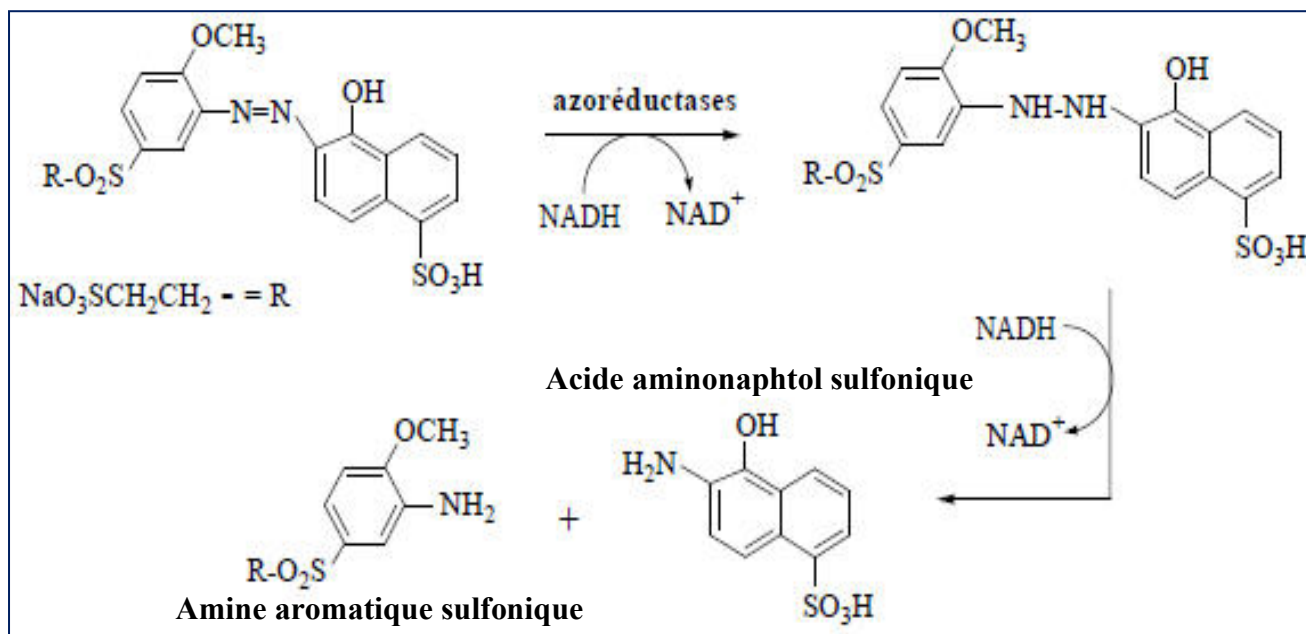


Figure 5. Mécanisme de réduction azoïque du rouge allura AC (**Mansour *et al.*, 2011**).

2.9. Applications industrielles du colorant E129

Le Rouge Allura AC, également connu sous le nom de E129, est un colorant synthétique largement employé dans plusieurs secteurs industriels grâce à sa grande stabilité, sa forte solubilité dans l'eau et son important pouvoir colorant (**Downham et Collins, 2000**).

2.9.1. Produits alimentaires

Dans l'industrie agroalimentaire, il est principalement utilisé pour donner une coloration rouge vif et attractive à différents produits destinés à la consommation. Son utilisation est autorisée dans de nombreux aliments conformément à la réglementation européenne (**CE, 1994**). Le colorant E129 est ainsi incorporé dans une large gamme de produits alimentaires, notamment les boissons telles que les sodas, les sirops, les boissons énergisantes et les boissons aux fruits. Il est également très utilisé dans les produits de confiserie comme les bonbons, les gommes, les gelées et les guimauves. Dans les produits laitiers, il entre dans la composition des yaourts aromatisés, des glaces et des desserts lactés. Ce colorant est aussi présent dans certains produits de boulangerie et de pâtisserie industrielle, notamment les gâteaux et les biscuits, ainsi que dans diverses sauces et condiments tels que le ketchup et les sauces cocktail. Enfin, il est utilisé pour colorer certaines céréales de petit déjeuner afin d'améliorer leur aspect visuel et leur attractivité auprès des consommateurs (**EFSA, 2009**).

2.9.2. Produits pharmaceutiques

Dans l'industrie pharmaceutique, le colorant Rouge Allura AC (E129) est largement utilisé comme agent colorant dans la formulation de nombreux médicaments. Il intervient notamment dans la coloration des comprimés et des gélules afin de faciliter leur identification, ainsi que dans celle des sirops et des suspensions pédiatriques pour améliorer leur attractivité auprès des enfants. Le E129 est également utilisé dans les enrobages pharmaceutiques pour masquer le goût amer de certains principes actifs et permettre une distinction visuelle entre les différents dosages d'un même médicament (**Amchova et al., 2015**).

2.9.3. Produits cosmétiques

Le Rouge Allura AC est également utilisé dans l'industrie cosmétique, où il est autorisé sous la dénomination CI 16035. Grâce à son pouvoir colorant intense, il entre dans la composition de nombreux produits de maquillage tels que les rouges à lèvres, les gloss et les fards à joues. Il est aussi incorporé dans certains soins capillaires, notamment les shampooings colorants et les après-shampooings, ainsi que dans des produits de soins du corps comme les gels douche et les savons liquides colorés. Par ailleurs, ce colorant est présent dans divers

produits d'hygiène, notamment les dentifrices et les bains de bouche, afin d'améliorer leur aspect visuel et leur attractivité pour le consommateur (SCCS, 2012).

**Partie
Expérimentale**

Chapitre 3 *Matériel* *et* *Méthodes*



3. Matériel et méthodes

3.1. Objectif de travail

Le présent travail porte sur l'étude de l'impact d'un colorant alimentaire synthétique, le Rouge Allura AC (E129), sur certains microorganismes. Plusieurs études ont montré que des colorants alimentaires synthétiques peuvent être associés à divers effets indésirables, notamment l'hyperactivité ainsi que des perturbations du microbiote intestinal. Dans ce contexte, cette étude vise à évaluer l'effet du colorant E129 sur la croissance et la viabilité de microorganismes, à savoir les souches de références suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ainsi que la levure *Candida albicans*.

3.2. Cadre d'étude

Cette étude a été réalisée entre février et avril 2026 au sein du laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale à la faculté des sciences exactes et informatique, de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (Ex : INES).

3.3. Matériel

3.3.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans cette expérimentation été le colorant Rouge allura AC (E129) présenté en poudre dans des flacons de 50 g de la marque (color') intense fourni par un magasin des produits alimentaires (fig. 6).

Cette étude a nécessité le recours à divers équipements, matériels, verrerie, produits chimiques et milieux de culture (Annexes).



Figure 6. Le colorant alimentaire E129

3.3.2. Matériel biologique (souches microbiennes)

Afin de démontrer l'impact du colorant E129 sur les microorganismes testés, huit souches bactériennes de référence et une levure ont été étudiées (Tableau 2), fournis par le Laboratoire de microbiologie et de biologie végétale.

Tableau 2. Liste des souches microbiennes utilisées.

N°	Espèces	Référence ATCC
01	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
02	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
03	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 35659
04	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 13316
05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
06	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
07	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876
08	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
09	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

3.4. Dosage du colorant E129 dans les produits alimentaires par spectrophotométrie UV-Visible.

Le dosage du Rouge Allura AC (E129) dans les produits alimentaires a été effectué par spectrophotométrie UV-Visible, une méthode analytique couramment employée pour la quantification des colorants alimentaires. Cette technique est basée sur la mesure de l'absorbance du colorant à sa longueur d'onde maximale d'absorption (504 nm). Elle se distingue par sa rapidité, sa sensibilité ainsi que son faible coût pour l'analyse des différentes matrices alimentaires (EFSA, 2009).

3.4.1. Élaboration de la courbe d'étalonnage du colorant E129

Une solution mère du colorant E129 a été préparée en dissolvant 10 mg de colorant dans 100 ml d'eau distillée, afin d'obtenir une concentration de 100 mg/L. À partir de cette solution, plusieurs solutions étalons de concentrations différentes (1, 2, 4, 6 et 8 mg/L) ont été préparées par dilution en vue de l'établissement de la courbe d'étalonnage. Les absorbances des différentes solutions standards ont ensuite été mesurées à 504 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant l'eau distillée comme blanc.

3.4.2. Préparation des échantillons alimentaires

Les échantillons alimentaires (boissons, lait aromatisé, confiture et produit de charcuterie) ont été préparés en fonction de leur nature afin d'obtenir des solutions claires compatibles avec l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible (Sobańska *et al.*, 2017).

- **Boisson** : 10 ml de boisson ont été dégazés puis dilués dans 900 ml d'eau distillée.
- **Yaourt aromatisé** : 5 ml d'échantillon ont été mélangés avec 10 ml d'éthanol afin de précipiter les protéines et les matières grasses. Après agitation et centrifugation à 5000 tpm pendant 10 minutes, le surnageant a été récupéré puis filtré.
- **Confiture** : 5 g de confiture ont été dissous dans 50 ml d'eau distillée chaude sous agitation. La solution obtenue a ensuite été refroidie, puis centrifugée à 5000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré et filtré afin d'éliminer les particules solides.
- **Produit de charcuterie** : 5 g de l'échantillon ont été broyés puis homogénéisés dans un mélange de 50 ml d'eau distillée chaude et de 20 ml d'éthanol afin de favoriser l'extraction du colorant et la précipitation des protéines. Le mélange a ensuite été agité pendant 10 minutes, puis centrifugé à 5000 tpm pendant 10 min afin d'obtenir une solution limpide adaptée à la mesure spectrophotométrique UV –visible.

3.4.3. Détermination de la concentration du E129

La concentration du colorant dans les échantillons a été déterminée à partir de l'équation de la droite d'étalonnage obtenue selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \times \tau \times c$$

Où :

A : Absorbance mesurée,

ε : Coefficient d'extinction molaire,

τ : Longueur de la cuve (1 cm),

c : Concentration du colorant.

La concentration finale du colorant dans les produits alimentaires a été exprimée en mg/L ou mg/kg selon le type d'échantillon (Ntrallou *et al.*, 2020).

3.5. Évaluation des activités biologiques du colorant rouge allura AC (E129)

3.5.1. Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible

La vérification de la pureté du colorant alimentaire rouge allura AC (E129) a été réalisée par spectrophotométrie UV-Visible, une technique analytique largement utilisée pour l'identification et la quantification des colorants alimentaires. Cette méthode repose sur la mesure de l'absorbance de la solution du colorant à une longueur d'onde spécifique correspondant à son maximum d'absorption ($\lambda_{\max}$). Pour le colorant E129, le maximum d'absorption se situe généralement autour de 505–507 nm dans le domaine du visible (Thani, 2018).

La méthode (fig. 7) consiste à dissoudre 10 mg du colorant Rouge allura AC (E129) dans 100 ml d'eau distillée, puis à analyser la solution à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (6715 UV/Vis) en réalisant un balayage entre 300 et 700 nm afin de déterminer la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorbance.

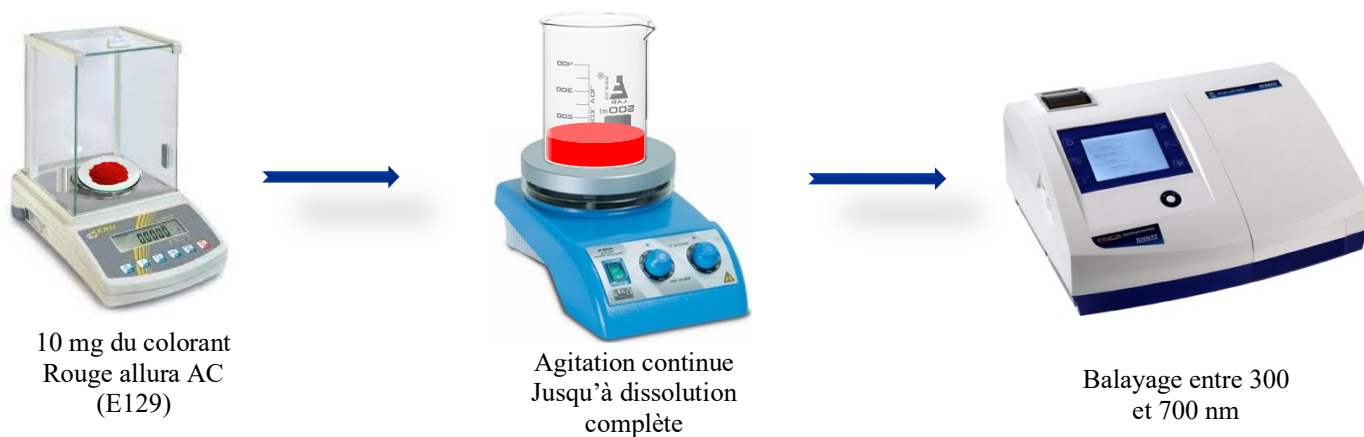


Figure 7. Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible

3.5.2. Activité antioxydant

L'activité antioxydant du colorant E129 a été évaluée par la méthode du radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Ce radical stable présente une coloration violette en solution et possède un maximum d'absorption aux alentours de 504 nm. L'effet antioxydant du colorant étudié a été déterminé par comparaison avec un antioxydant de référence, l'acide ascorbique (vitamine C) (Shahzad Hussain *et al.*, 2023).

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de différentes concentrations d'acide ascorbique (10, 20, 40, 60, 80 et 100 mg/ml) préparées dans de l'éthanol absolu (96 %). Pour l'analyse, 200 μ L de chacune des solutions ont été mélangés à 1000 μ l de solution de DPPH (0,04% (p/v)). Un tube témoin, contenant 200 μ l d'éthanol et 1000 μ l de solution de DPPH, a été utilisé comme contrôle.

Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. L'activité de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique a également été déterminée afin de servir de référence.

L'activité antioxydante du colorant E129 a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH selon la méthode décrite par Archana *et al.* (2005). Un volume de 200 μ l de chacune des solutions éthanoliques du colorant préparées à différentes concentrations est

mélangé avec 1000 µl d'une solution de DPPH° (0,04% p/v). Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm par spectrophotomètre (JENWAY 6715 UV-Visible). Un contrôle négatif composé de 200 µl d'éthanol et de 1000 µl de la solution de DPPH est également préparé.

Les concentrations du colorant rouge allure AC testées sont comprises entre 5 et 50 µg/ml pour alors que celles de l'antioxydant standard, sont comprises entre 1,67 et 16,67 mg/ml.

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de réduction de la solution de DPPH (Dongmo *et al.*, 2010). D'après Dung *et al.*, (2008), le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$I(\%) = 100 \times \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}}$$

Avec :

$A_{\text{contrôle}}$: correspond à l'absorbance de la solution témoin (contenant tous les réactifs sauf l'échantillon),

$A_{\text{échantillon}}$: représente l'absorbance de la solution contenant l'échantillon testé.

3.5.3. Activité antimicrobienne

3.5.3.1. Repiquage des souches

Avant l'évaluation de l'activité antimicrobienne, les souches microbiennes étudiées ont été repiquées sur des milieux de culture appropriés (Annexes) afin d'assurer leur revivification et l'obtention de cultures pures et actives. Le repiquage a été réalisé dans des conditions aseptiques à partir des souches conservées, suivi d'une incubation à une température adaptée au microorganisme étudié. Cette étape permet de garantir la viabilité, la pureté et la standardisation de l'inoculum utilisé lors des tests d'activité antimicrobienne.

3.5.3.2. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des souches étudiées a été réalisé après incubation afin d'observer les caractéristiques morphologiques des colonies développées sur les milieux de culture. Cette étape a permis d'évaluer plusieurs paramètres, notamment la taille, la forme, la couleur, l'aspect de surface, le relief, les contours ainsi que la consistance des colonies. L'observation macroscopique constitue une étape préliminaire importante dans l'identification des microorganismes et dans l'appréciation de la pureté des souches utilisées pour les essais d'activité antimicrobienne (Prescott *et al.*, 2017).

3.5.3.3. Examen microscopique

L'examen microscopique permet d'observer la morphologie et l'organisation des cellules microbiennes après coloration, notamment l'examen à état frais et après coloration de Gram. Il constitue une étape importante pour l'identification préliminaire des microorganismes et l'interprétation des résultats microbiologiques (Willey *et al.*, 2020).

a. Examen à l'état frais

L'examen à l'état frais est une technique microscopique permettant l'observation directe des microorganismes vivants dans une goutte de suspension sans fixation ni coloration. Il est principalement utilisé pour étudier la mobilité bactérienne, la forme cellulaire et l'organisation des cellules dans leur état naturel. Cette méthode rapide fournit des informations préliminaires utiles pour l'orientation du diagnostic microbiologique (Madigan *et al.*, 2021).

b. La coloration de Gram

La coloration de Gram est une technique microbiologique fondamentale permettant de différencier les bactéries selon la structure de leur paroi cellulaire en bactéries Gram positif ou Gram négatif. Elle permet également d'observer leur morphologie (coques ou bâtonnets) ainsi que leur mode de regroupement. Réalisée selon le protocole standard, cette coloration constitue une étape essentielle (annexes) de l'identification préliminaire des bactéries. Les observations ont été effectuées au microscope optique (Cappuccino et Sherman, 2014).

3.5.3.4. Tests biochimiques

a. Test de catalase

Le test de catalase est une méthode microbiologique utilisée pour mettre en évidence la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries. Cette enzyme permet de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), composé toxique produit lors du métabolisme aérobie, en eau (H_2O) et en oxygène (O_2). Le test consiste à déposer quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène sur une lame de verre propre, puis à y ajouter une colonie bactérienne prélevée à l'aide d'une anse de platine. L'apparition immédiate de bulles de dioxygène indique un résultat positif, confirmant la présence de l'enzyme catalase (ASM Protocols, 2024).

b. Test d'oxydase

Le test d'oxydase permet une identification présomptive de certaines bactéries qui produisent l'enzyme cytochrome oxydase. Le principe consiste à appliquer sur les disques de N-méthylé du paraphénylène diamine, quelques colonies bactériennes à l'aide d'une anse de platine stérile. On obtient instantanément une coloration violette si la réaction est positive (Hafed *et al.*, 2015).

3.5.3.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant E129

3.5.3.5.1. Préparation de la solution du colorant

Une quantité de 10 mg a été pesée à l'aide d'une balance de précision, puis dissoute dans 1 ml d'eau distillée contenu dans un tube à hémolyse. La solution obtenue a été homogénéisée à l'aide d'un agitateur vortex, puis filtrée à travers un microfiltre de 0,22 µm de porosité.

3.5.3.5.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture jeune. Quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile puis mises en suspension dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. La suspension obtenue a été homogénéisée et sa turbidité ajustée à 0,5 McFarlane, correspondant à environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL, en vérifiant la densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 à 504 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (**Amara et al., 2022**).

3.5.3.5.3. Ensemencement et dépôt des disques

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne du Rouge Allura AC permet d'apprécier son effet sur les microorganismes testés en mesurant le diamètre des zones d'inhibition. L'activité antimicrobienne a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose (fig. 8), une technique classique utilisée pour évaluer la sensibilité des microorganismes aux agents antimicrobiens (**OMS, 2005**).

Des boîtes de Petri (90 mm) ont été préparées en coulant 18 ml de gélose Mueller Hinton (MH), puis laissées solidifier et sécher sur une surface plane. Les suspensions microbiennes ajustées ont ensuite été ensemencées par écouvillonnage à l'aide d'écouvillons stériles afin d'obtenir une nappe microbienne homogène. Des disques stériles de papier filtre (6 mm de diamètre) ont été déposés à la surface de la gélose, puis imbibés avec 10 µl de la solution du colorant à l'aide d'une micropipette. Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les souches bactériennes et à 30 °C pendant 48 heures pour *Conidia albicans*.

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et interprétés selon **Moreira et al. (2015)** comme suit : résistante (R) pour un diamètre de 10 mm, sensible (S) entre 10 et 14 mm, très sensible (TS) entre 15 et 19 mm, et extrêmement sensible (ES) pour un diamètre supérieur à 20 mm.

Chapitre 3. Matériel et Méthodes

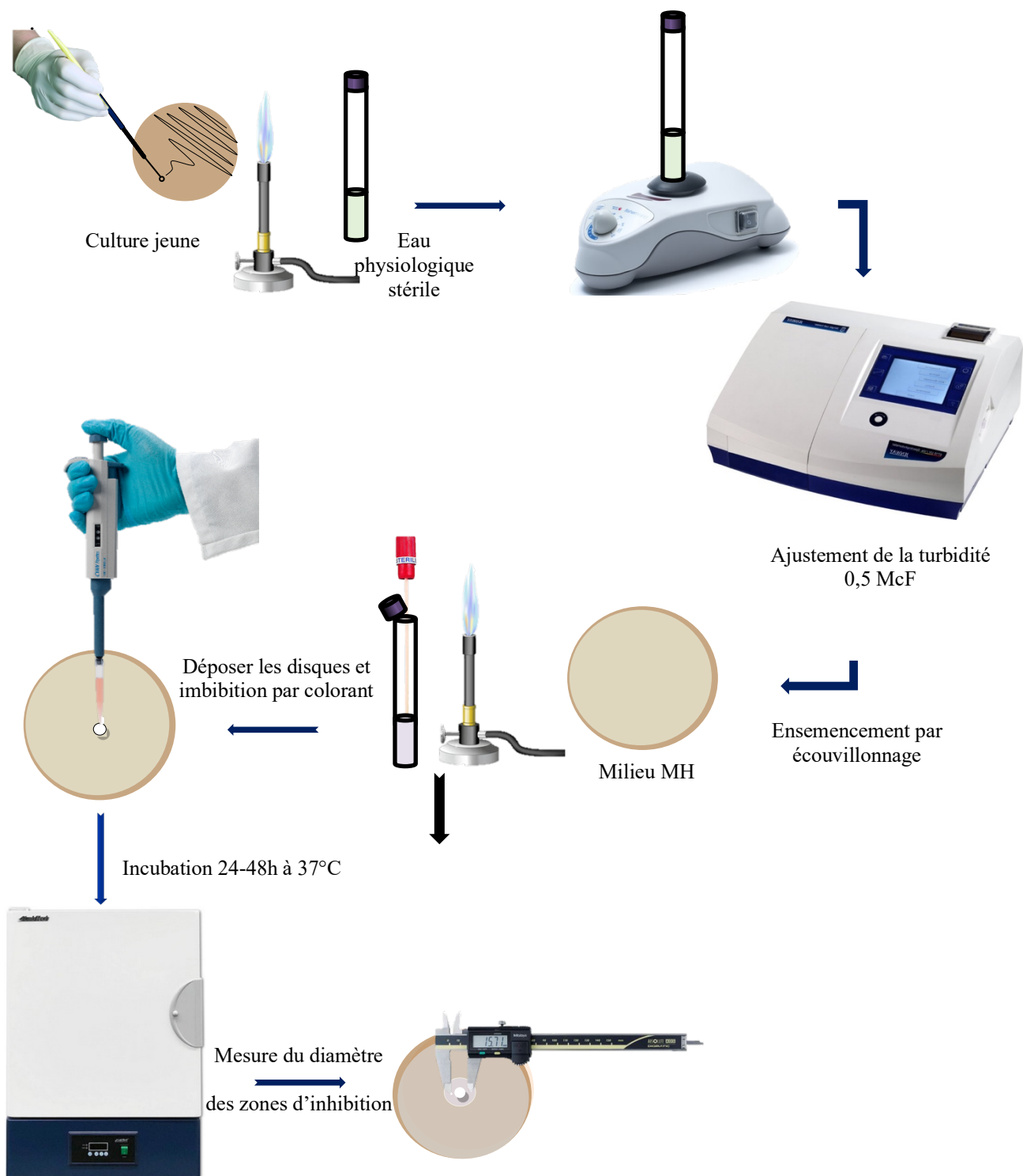


Figure 8. Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant Rouge allura AC (E129).

3.6. Dégradation du colorant E129 et analyse des sous-produits

3.6.1. Dégradation chimique

La réaction de Fenton est un procédé d'oxydation avancée largement utilisé pour la dégradation des composés organiques, notamment des colorants azoïques tels que le rouge allura (E129). Ce procédé repose sur la réaction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les ions ferreux (Fe^{2+}), conduisant à la formation de radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), qui sont des agents oxydants très puissants capables d'attaquer et de décomposer les molécules organiques en composés plus simples comme le CO_2 , H_2O et les ions minéraux. Les paramètres influençant l'efficacité de cette réaction sont principalement le pH, optimal autour de 2,5–3, ainsi que les concentrations en H_2O_2 et en Fe^{2+} , la température et le temps de réaction (**Babuponnusami et Muthukumar, 2014**).

3.6.1.1. Cinétique de dégradation

Dans cette étude, la cinétique de dégradation chimique du colorant E129 a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible. Une solution de 85 ml à 30 mg/L a été préparée dans un bécher sous agitation continue afin d'assurer l'homogénéité du milieu réactionnel. Après ajout de 10 mL d'une solution de fer (1 mmol/l) et ajustement du pH à 3. Un volume de 5 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 30 %) a été introduit afin d'initier la réaction de Fenton. Des aliquotes ont ensuite été prélevées à différents temps (0, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes) pour mesurer l'absorbance à la longueur d'onde maximale ($\lambda_{\text{max}} = 504 \text{ nm}$). Le suivi de la décoloration a été effectué par le calcul du pourcentage de décoloration selon la relation suivante :

$$\% \text{ de décoloration} = [A_0 - A_t / A_0] \times 100$$

Avec :

A_0 : Représente l'absorbance initiale,

A_t : Absorbance à l'instant t.

3.6.1.2. Extraction des sous-produits

Après 13 minutes de réaction, l'ajout de thiosulfate de sodium et d'EDTA permet de stopper la réaction de Fenton en neutralisant le peroxyde d'hydrogène résiduel et en chélatant les ions fer responsables des processus d'oxydation. Le pH est ensuite ajusté à 2 par addition d'acide chlorhydrique concentré afin de stabiliser les produits de dégradation et de faciliter leur extraction (**Pignatello et al., 2006**).

Une extraction liquide-liquide a ensuite été réalisée afin d'isoler les composés de dégradation, par trois extractions successives avec de l'acétate d'éthyle (v/v). Les phases

aqueuse et organique ont été séparées à l'aide d'une ampoule à décanter, puis la phase organique a été séchée sur du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles. Enfin, le solvant a été évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C.

3.6.1.3. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique simple et rapide permettant la séparation et l'identification des composés en fonction de leur migration entre une phase stationnaire (silice) et une phase mobile. Dans cette étude, des plaques de silice ont été utilisées avec un système d'élution constitué de butanol/acide acétique/eau (4:1:5). Deux dépôts ont été effectués sur chaque plaque, l'un correspondant au colorant pur et l'autre au colorant après dégradation, afin de permettre la comparaison des profils chromatographiques.

Après développement dans une cuve saturée, les taches ont été visualisées sous UV, puis révélées chimiquement à la ninhydrine. D'après **Starek (2025)**, le rapport frontal (R_f) de chaque composé a ensuite été calculé selon la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la tache}}{\text{distance parcourue par le front du solvant}}$$

3.6.2. Dégradation biologique (microbienne)

3.6.2.1. Cinétique de la dégradation microbienne

La dégradation biologique du colorant E129 a été réalisée à l'aide de bactéries et d'une levure. Pour cette étude, un milieu minéral minimal (MMM) a été préparé à partir de différents sels minéraux, notamment KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 et NH_4NO_3 , ainsi que du glucose dissous dans de l'eau distillée. Le milieu obtenu a ensuite été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes (**Ngo et Tischler, 2022**).

Après refroidissement, le milieu a été réparti dans des flacons à raison de 90 ml par flacon, puis complété par 10 ml d'une solution de colorant E129 à 30 mg/L. Chaque flacon a ensuite étéensemencé aseptiquement avec 1 ml d'un inoculum microbien standardisé à 10^7 UFC/ml. Les cultures ont été incubées sous agitation continue à 150 tpm pendant 72 heures, à une température comprise entre 30 et 37 °C selon le microorganisme utilisé, dans des conditions aérobies ou anaérobies adaptées à ses exigences physiologiques (**Chen, 2006**).

Au cours de l'incubation, des aliquotes de 1 ml ont été prélevées à différents temps (0, 6, 12, 24, 48 et 72 heures), puis centrifugées à 8000 tpm pendant 10 minutes afin de séparer les cellules microbiennes du milieu. L'absorbance du surnageant a ensuite été mesurée à la longueur d'onde maximale du colorant ($\lambda_{\text{max}} = 504 \text{ nm}$) afin de suivre l'évolution du pourcentage de dégradation au cours du temps.

3.6.2.2. Extraction des sous-produits de dégradation

Le pH du surnageant a ensuite été ajusté à 2, puis trois extractions liquide-liquide successives à l'acétate d'éthyle (v/v) ont été réalisées. La phase organique récupérée a été séchée sur du sulfate de sodium anhydre, avant évaporation du solvant sous vide afin d'obtenir les sous-produits de dégradation.

3.6.2.3. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM, HPLC)

L'identification des métabolites issus de la dégradation du colorant E129 est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La CCM est effectuée selon le protocole décrit précédemment. Les rapports frontaux (R_f) des composés obtenus sont ensuite comparés à ceux des produits issus de la dégradation chimique.

L'analyse chromatographique du colorant Rouge Allura (E129) a été réalisée au Centre de Recherche en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de Bou Ismaïl, Tipaza, Algérie.

Le dosage a été effectué par chromatographie liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'un système Agilent 1100 (fig. 9) piloté par le logiciel ChemStation. La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C18 ($250 \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$) maintenue à 25°C . L'élution a été conduite en mode gradient avec un débit de $0,4 \text{ mL/min}$ et un volume d'injection de $20 \mu\text{L}$. La phase mobile était constituée d'acétate d'ammonium 1 mM dans l'eau ultrapure (phase A) et d'acétate d'ammonium 1 mM dans le méthanol (phase B). Le programme de gradient a débuté avec 85 % de phase A et 15 % de phase B pendant 2 min, puis a évolué progressivement jusqu'à 5 % de phase A et 95 % de phase B à 12 min, avant un retour aux conditions initiales pour la rééquilibration de la colonne. Le temps total d'analyse a été de 16 min. La détection a été assurée par un détecteur UV-Visible réglé à 504 nm , longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du colorant rouge allura.



Figure 9. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'un système Agilent 1100.

3.6.3. Activité antimicrobienne des sous-produits de dégradation biologique

L'activité antimicrobienne des sous-produits issus de la dégradation du colorant E129 a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode a permis d'estimer l'effet inhibiteur des sous-produits obtenus vis-à-vis des microorganismes testés.

Une suspension microbienne fraîche a été préparée puis ajustée à une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. La surface d'une gélose Mueller-Hinton a ensuite étéensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile. Après séchage de la surface, des disques stériles ont été déposés sur la gélose, puis imbibés avec 15 µl des sous-produits préalablement préparés dans le DMSO (2 %). Un témoin négatif (DMSO seul) a également été testé.

Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les souches bactériennes et à 30 °C pendant 48 heures pour *Candida albicans*. Après incubation, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques, exprimé en millimètres (EUCAST, 2025).

Chapitre 4

*Résultats
et
Discussion*



Le présent travail a porté sur l'évaluation de l'impact du colorant alimentaire synthétique Rouge Allura AC (E129) sur différents microorganismes. Cette étude a également permis d'examiner la biodégradation du colorant E129 ainsi que l'activité antimicrobienne des sous-produits générés, dans le but d'évaluer l'efficacité des méthodes analytiques et microbiologiques employées.

4.1. Dosage du colorant E129 dans les produits alimentaires par spectrophotométrie UV-Visible

4.1.1. Élaboration de la courbe d'étalonnage du colorant E129

La courbe d'étalonnage du Rouge Allura AC (fig. 10) a été établie à partir des solutions standards de concentrations comprises entre 1 et 8 mg/L.

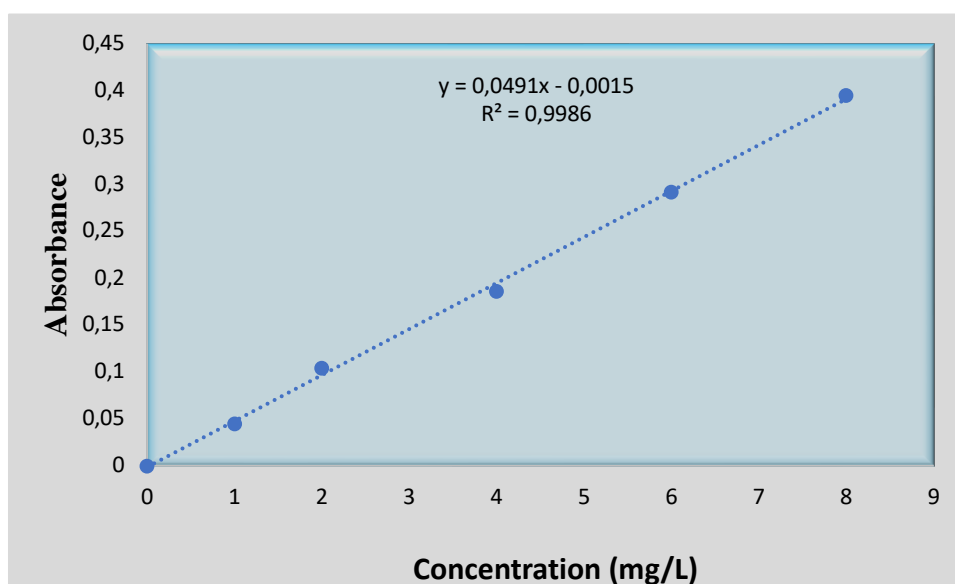


Figure 10. Courbe d'étalonnage du colorant rouge allura AC (E129) par spectrophotométrie UV-Vis.

Les mesures d'absorbance effectuées à la longueur d'onde maximale d'absorption ($\lambda_{\text{max}} = 504 \text{ nm}$) ont permis d'obtenir une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration du colorant, décrite par l'équation :

$$[A = 0,0495C - 0,0015]$$

Avec un coefficient de détermination élevé ($R^2 = 0,9986$).

La valeur élevée de (R^2) indique une excellente corrélation entre la concentration du colorant et l'absorbance mesurée, démontrant la bonne linéarité de la méthode dans le domaine de concentrations étudié. Cette linéarité est conforme à la loi de Beer-Lambert, selon laquelle l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'espèce absorbante.

Ces résultats confirment la fiabilité et la précision de la méthode spectrophotométrique utilisée pour le dosage du Rouge Allura AC dans les produits alimentaires. La courbe d'étalonnage obtenue constitue ainsi un outil analytique fiable pour la détermination quantitative du colorant dans les échantillons étudiés.

4.1.2. Détermination de la concentration

Les concentrations de Rouge Allura AC (E129) déterminées dans les différents produits alimentaires montrent une variabilité importante selon la nature de la matrice analysée (tableau 3).

Le dosage du Rouge Allura AC (E129) dans différents produits alimentaires a révélé des concentrations variables selon la nature de l'aliment. Les teneurs (fig. 11) les plus élevées ont été enregistrées dans le kachir (65,92 mg/L) et la boisson (65,10 mg/L), tandis que des concentrations plus faibles ont été observées dans la confiture (34,08 mg/L) et le yaourt aromatisé (8,45 mg/L). En tenant compte des quantités consommables de chaque produit, la charge en colorant E129 a été estimée à 316,4 mg pour la charcuterie, 20,83 mg pour la boisson, 12,95 mg pour la confiture et 1,44 mg pour le yaourt.

Tableau 3. Dosage du colorant E129 dans différents produits alimentaires et leur DJA.

Produit	Quantité du E129 (en mg)	DJA (mg /Kg/jour)	Enfant (20 Kg)	Adulte (70 Kg)
Boisson (320 ml)	20,83	7 (EFSA, 2009)	140 mg/jour	490 mg/jour
Yaourt aromatisé gout fraise (170 ml)	1,44			
Confiture (380 g)	12,95			
Kachir (480 g)	316,4			

La comparaison de ces valeurs avec la dose journalière admissible (DJA) fixée à 7 mg/kg de poids corporel/jour par l'EFSA montre qu'aucun des produits analysés ne dépasse individuellement la DJA pour un adulte moyen de 70 kg (490 mg/jour). Toutefois, la charcuterie présente une teneur particulièrement élevée et constitue la principale source d'exposition au colorant parmi les produits étudiés. La consommation simultanée de plusieurs aliments contenant du E129 pourrait ainsi contribuer à une augmentation notable de l'apport quotidien total.

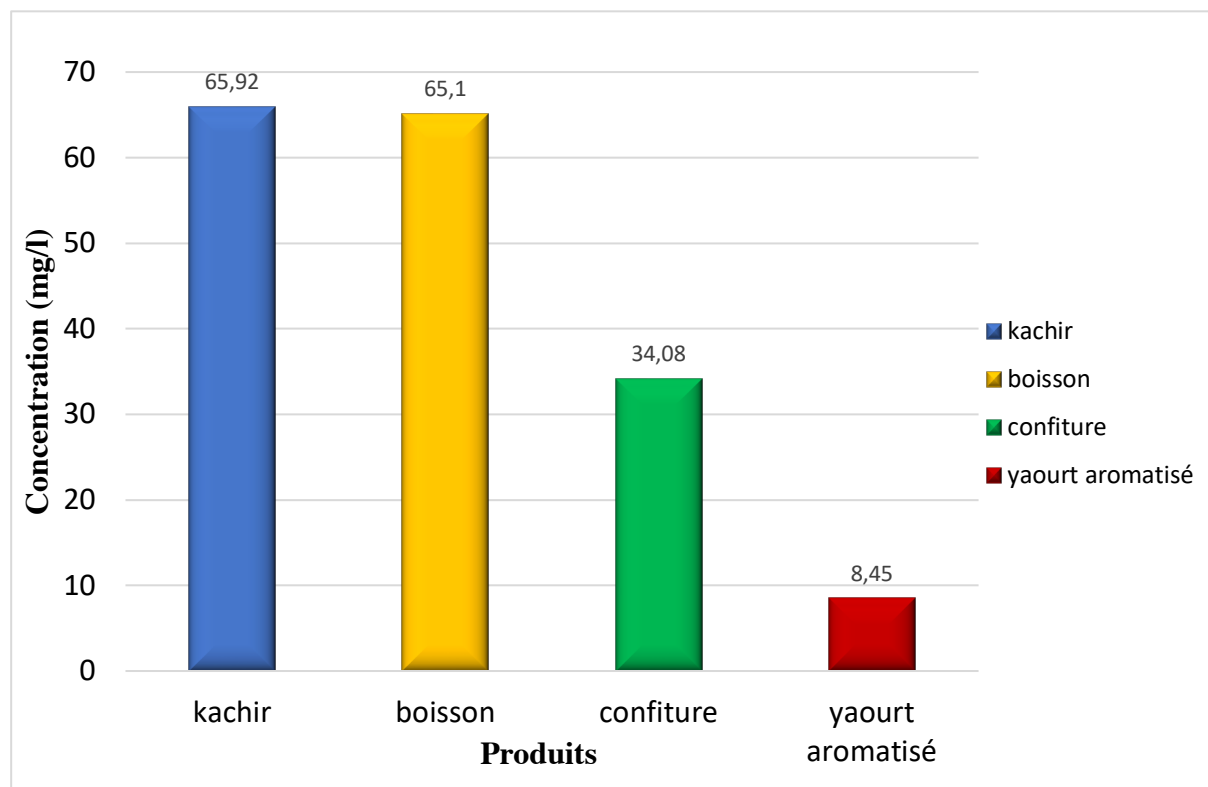


Figure 11. Évaluation de la concentration du colorant E129 dans les produits alimentaires analysés.

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par **Amchova *et al.* (2015)**, qui ont montré que les colorants azoïques, dont le Rouge Allura AC, sont largement utilisés dans les boissons, les produits de confiserie et les produits carnés transformés, où leurs concentrations peuvent varier considérablement selon les formulations industrielles. De même, **Shah *et al.* (2023)** ont observé des teneurs élevées en colorants synthétiques dans certaines denrées alimentaires transformées, soulignant que les produits carnés et les boissons colorées figurent parmi les principales sources d'exposition alimentaire.

Par ailleurs, la concentration relativement faible observée dans le yaourt aromatisé peut s'expliquer par l'utilisation de quantités plus limitées de colorant, destinées uniquement à renforcer la couleur du produit. Des observations similaires ont été rapportées par **Scotter et Castle (2004)**, qui ont montré que les produits laitiers aromatisés contiennent généralement des teneurs plus faibles en colorants synthétiques que les boissons et les produits de charcuterie.

Dans l'ensemble, les concentrations de Rouge Allura AC (E129) mesurées dans les produits analysés varient selon leur nature et leur procédé de fabrication, avec des teneurs plus élevées dans les produits carnés transformés, notamment le kachir, traduisant une exposition non négligeable du consommateur. Bien que ces niveaux restent globalement compatibles avec les limites de sécurité établies pour la population générale, une surveillance régulière demeure

nécessaire, en particulier pour les produits fortement colorés et les populations sensibles, notamment les enfants, en raison de leur exposition plus élevée par rapport au poids corporel.

Dans ce contexte, et afin d'approfondir la compréhension du devenir de ce colorant, l'étude s'est orientée vers l'analyse de sa dégradation ainsi que vers l'identification et l'évaluation des sous-produits formés. Cette étape est essentielle pour appréhender non seulement l'efficacité des procédés de transformation appliqués, mais également l'impact potentiel des produits de dégradation sur le plan environnemental et sanitaire.

4.2. Évaluation des activités biologiques du colorant rouge allura AC (E129)

4.2.1. Vérification de la pureté du colorant E129 par spectrophotométrie UV-Visible

Les résultats de l'analyse par spectrophotométrie UV-Visible ont montré un maximum d'absorbance du colorant E129 autour de 505–507 nm (fig. 12), confirmant ainsi son identité et sa pureté. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Thani (2018)**, qui a montré que l'E129 possède un pic d'absorption caractéristique dans cette région spectrale. Selon **Kaur et Gupta (2012)**, les colorants azoïques tels que le Rouge Allura AC présentent des spectres d'absorption spécifiques permettant leur détection et leur suivi dans différentes matrices alimentaires les résultats obtenus au cours de cette étude concordent donc avec les données de la littérature, ce qui confirme l'efficacité de la méthode utilisée.

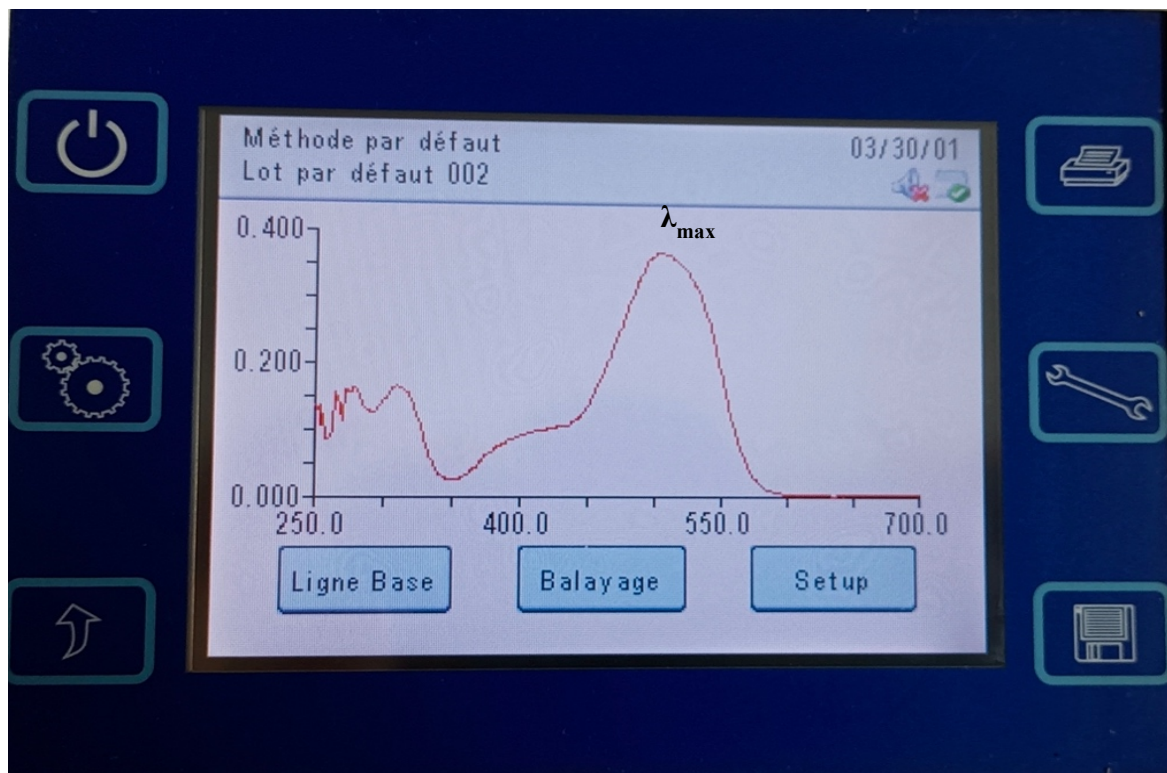


Figure 12. Absorbance maximale du rouge allura AC (E129) par spectrophotométrie UV-visible.

4.2.2. Activité antioxydant

Les résultats obtenus par la méthode de piégeage du radical DPPH ont montré que le colorant E129 présente une très faible activité antioxydante comparativement à la vitamine C utilisée comme référence (annexes). Cette différence peut être attribuée au fort pouvoir réducteur de la vitamine C, capable de neutraliser rapidement les radicaux libres par donation d'électrons ou d'atomes d'hydrogène. En revanche, le colorant E129 possède une capacité limitée de piégeage des radicaux libres, ce qui explique son faible pourcentage d'inhibition. La littérature indique que certains colorants synthétiques présentent une activité antioxydante faible ou limitée par rapport aux antioxydants naturels riches en composés réducteurs (**Prior et al., 2005**).

4.2.3. Activité antimicrobienne

4.2.3.1. Examen macroscopique

Après incubation, l'examen macroscopique (fig. 13) a permis une identification présumptive des différentes souches grâce à leurs caractéristiques culturelles typiques. *Escherichia coli* a présenté des colonies lisses et grisâtres, tandis que *Klebsiella pneumoniae* a formé des colonies mucoïdes et brillantes, en accord avec **Murray et al. (2020)**. *Proteus mirabilis* a montré un phénomène de swarming caractéristique, décrit également dans Bergey's Manual of Systematic Bacteriology par **De Vos et al. (2009)**, et *Citrobacter freundii* des colonies lisses de taille moyenne.

Pseudomonas aeruginosa a développé des colonies pigmentées verdâtres, *Staphylococcus aureus* des colonies jaune doré, et *Bacillus cereus* des colonies larges et rugueuses, conformément aux descriptions de **Riedel et al. (2019)**. Enfin, *Candida albicans* a présenté des colonies crémeuses blanches, parfois plus rugueuses avec l'âge, confirmant son dimorphisme selon **De Hoog et al. (2019)**.

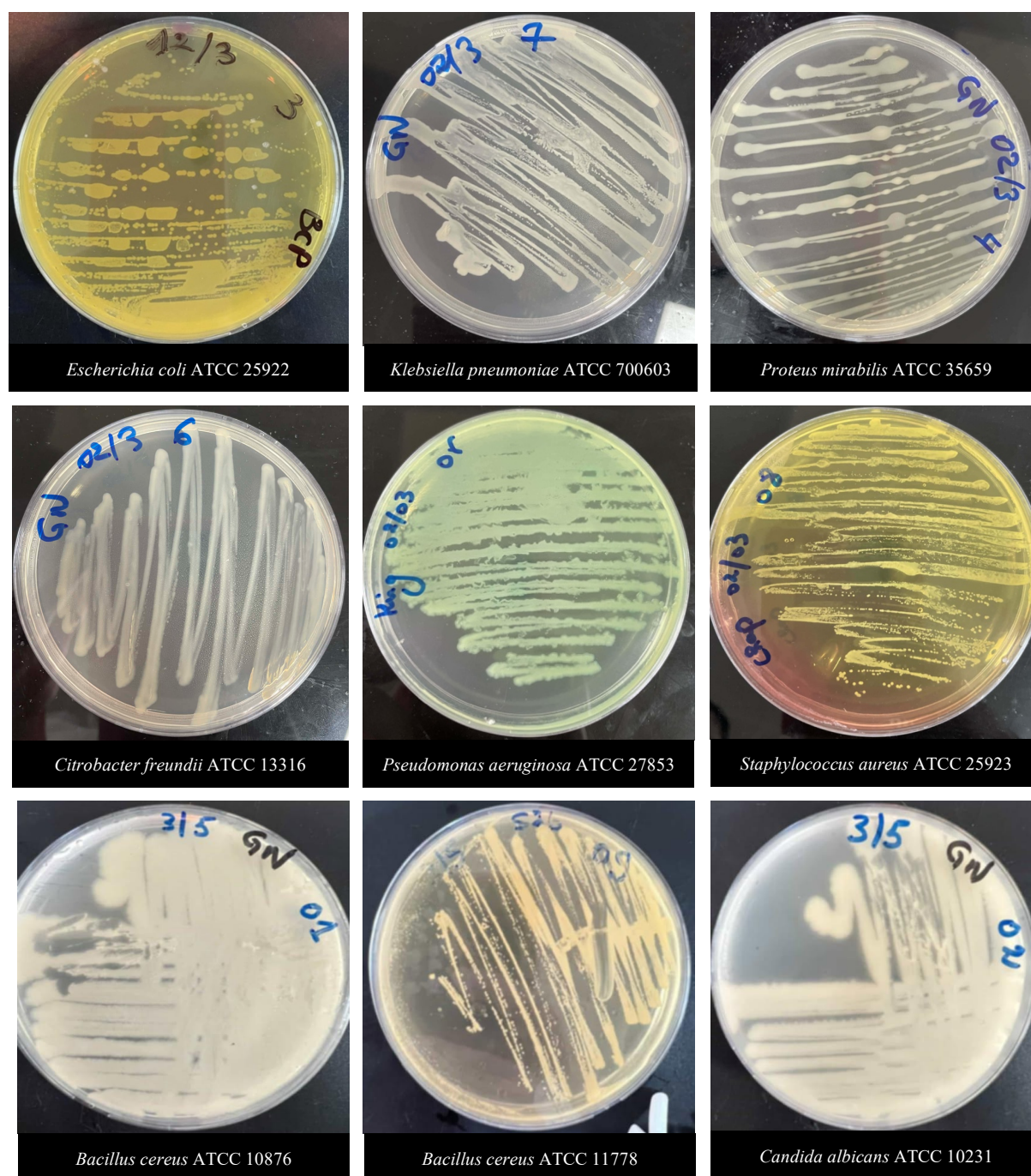


Figure 13. Aspect macroscopique de différentes souches sur les milieux gélosés appropriés.

4.2.3.2. Examen microscopique

a. Examen à l'état frais

L'examen à l'état frais des différentes souches a permis d'observer leurs caractéristiques morphologiques ainsi que leur mobilité (tableau 4). *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une mobilité active grâce à leurs flagelles, tandis que *Klebsiella pneumoniae* est apparue immobile, conformément aux observations rapportées par **Willey et al. (2020)**. *Staphylococcus aureus* a été observé sous forme de cocci regroupés en amas sans mobilité, alors que *Bacillus cereus* a montré des bacilles mobiles, caractéristiques des *Bacillus* sporulés.

Par ailleurs, *Candida albicans* a révélé des cellules levuriformes bourgeonnantes accompagnées parfois de pseudofilaments, ce qui concorde avec les descriptions de **Koneman et al. (2017)**. L'ensemble des observations obtenues est en accord avec les données classiques de microbiologie et a contribué à l'identification présomptive des souches étudiées.

b. La coloration de Gram

Après coloration de Gram, l'examen microscopique (fig. 14) des différentes souches a révélé des caractéristiques morphologiques typiques concordant avec les données de la littérature. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été observées sous forme de bacilles Gram négatif, ce qui correspond aux descriptions rapportées par **Riedel et al. (2019)** et **Murray et al. (2020)**.

Staphylococcus aureus a présenté des coques Gram positif disposées en amas caractéristiques, similaires aux observations décrites dans les travaux de microbiologie clinique. *Bacillus cereus* est apparu sous forme de grands bacilles Gram positif sporulés, en accord avec les descriptions de **(De Vos et al., 2009)**, concernant les *Bacillus* sporulés.

Par ailleurs, *Candida albicans* a présenté des cellules levuriformes ovalaires bourgeonnantes, parfois accompagnées de pseudofilaments, conformément aux descriptions rapportées dans Medical Mycology selon **de Hoog et al. (2019)**. L'ensemble des observations microscopiques obtenues (tableau 4), concorde avec les caractéristiques morphologiques classiques décrites dans la littérature et a permis de confirmer l'identification présomptive des souches étudiées.

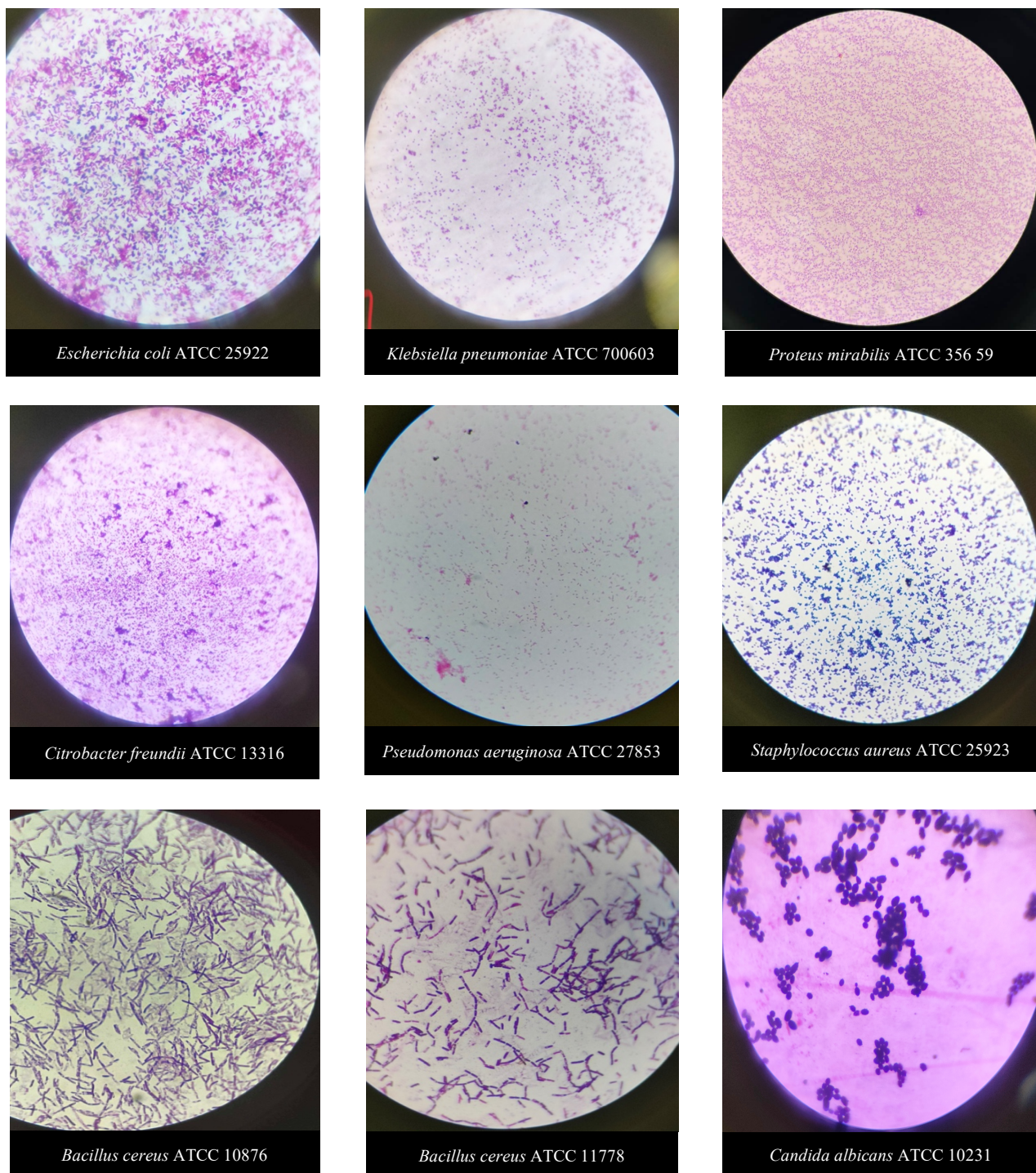


Figure 14. Aspect microscopique de différentes souches après coloration de Gram au grossissement X100.

4.2.3.3. Tests biochimiques

Les tests de la catalase et de l'oxydase (tableau 4) ont permis de préciser les profils biochimiques des souches étudiées et de contribuer à leur identification présomptive. Les souches de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ont présenté une activité catalase positive, traduite par un dégagement immédiat de bulles (fig. 15), confirmant leur capacité à dégrader le peroxyde d'hydrogène se la réaction suivante :

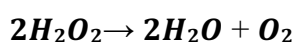
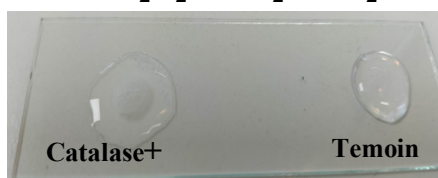


Figure 15. Test de catalase.

À l'inverse, le test de l'oxydase a révélé une réaction positive uniquement chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*, caractérisée par l'apparition rapide d'une coloration violette (fig. 16), alors que les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* et *Citrobacter freundii*) ont montré une réaction négative.



Figure 16. Test d'oxydase.

Ces résultats sont conformes aux données rapportées dans la littérature microbiologique, notamment par Mahon *et al.* (2022) et Collins *et al.* (2016).

Tableau 4. Résultats des examens microscopique et biochimiques des souches étudiées.

Souches	Mobilité	Gram	Oxydase	Catalase
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	+	-	-	+
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 13316	+	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	+	-	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	+	-	+

4.2.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne du colorant E129

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du Rouge Allura AC (E129) vis-à-vis de plusieurs microorganismes, notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*, n'a révélé aucune zone d'inhibition autour du colorant. Ces résultats indiquent l'absence d'effet antimicrobien du Rouge Allura AC dans les conditions expérimentales adoptées.

Cette absence d'activité peut être attribuée à la nature du colorant. En effet, le Rouge Allura AC est un colorant azoïque synthétique destiné principalement à la coloration des produits alimentaires et ne possède pas de propriétés antimicrobiennes reconnues. Les travaux d'**Amchova et al. (2015)** soulignent d'ailleurs que les recherches portant sur ce composé concernent essentiellement sa toxicité, son métabolisme et ses mécanismes de dégradation plutôt que ses effets inhibiteurs sur les microorganismes.

Les résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par **Hovor et al. (2023)**, qui ont montré que le Rouge Allura AC présentait une activité antibactérienne très faible, voire inexistante, comparativement à d'autres colorants alimentaires tels que l'érythrosine (E127). De plus, plusieurs études ont démontré que certaines bactéries sont capables de biodégrader les colorants azoïques grâce à la production d'azoréductases, enzymes qui réduisent la liaison azoïque sans affecter leur croissance (**Foley et al., 2023**). Cette capacité de biodégradation pourrait contribuer à l'absence d'effet inhibiteur observée.

Dans l'ensemble, les résultats confirment que le Rouge Allura AC (E129) ne possède pas d'activité antimicrobienne significative contre les bactéries Gram négatif, les bactéries Gram positif et la levure *Candida albicans*. Son intérêt dans l'industrie alimentaire demeure donc essentiellement lié à son pouvoir colorant plutôt qu'à une éventuelle action conservatrice. Dans ce contexte, et afin de mieux comprendre son comportement environnemental ainsi que son devenir après exposition aux systèmes biologiques ou physico-chimiques, l'étude a été orientée vers l'évaluation de sa dégradation. Cette étape vise à analyser la transformation du colorant E129 et à identifier les éventuels sous-produits formés, dont la nature et la toxicité potentielle peuvent présenter un intérêt majeur sur le plan environnemental et sanitaire.

4.4. Dégradation du colorant E129 et analyse des sous-produits

4.4.1. Dégradation chimique

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec les données de la littérature relatives à la dégradation des colorants azoïques par le procédé de Fenton. Une décoloration complète du Rouge Allura AC a été observée après 30 minutes de traitement, indiquant une cinétique de dégradation rapide, marquée par une diminution progressive et significative de l'absorbance au cours du temps (tableau 5 et fig. 17). Ce comportement reflète la forte réactivité des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) générés au cours de la réaction. Avec un pourcentage de dégradation égal à 80,86%.

Tableau 5. Cinétique de la dégradation chimique du colorant E129 en fonction du temps.

Temps (min)	0	5	10	15	20	25	30
Absorbance	1,113	0,233	0,108	0,069	0,035	0,017	0,009

Des résultats comparables ont été rapportés par **Thiam *et al.* (2015)**, qui ont montré une dégradation rapide du Rouge Allura AC par les procédés électro-Fenton et photoélectro-Fenton, avec une disparition du colorant dès les premières minutes de traitement avec un taux de dégradation de 96%. De leur côté, **Hsueh *et al.* (2005)** ont également mis en évidence des cinétiques de décoloration élevées pour plusieurs colorants azoïques, notamment le Reactive Black 5 et l'Orange G, sous l'action du réactif de Fenton.

L'ensemble de ces études confirme que la dégradation suit généralement une cinétique rapide, où la vitesse de réaction dépend principalement de la concentration du colorant.

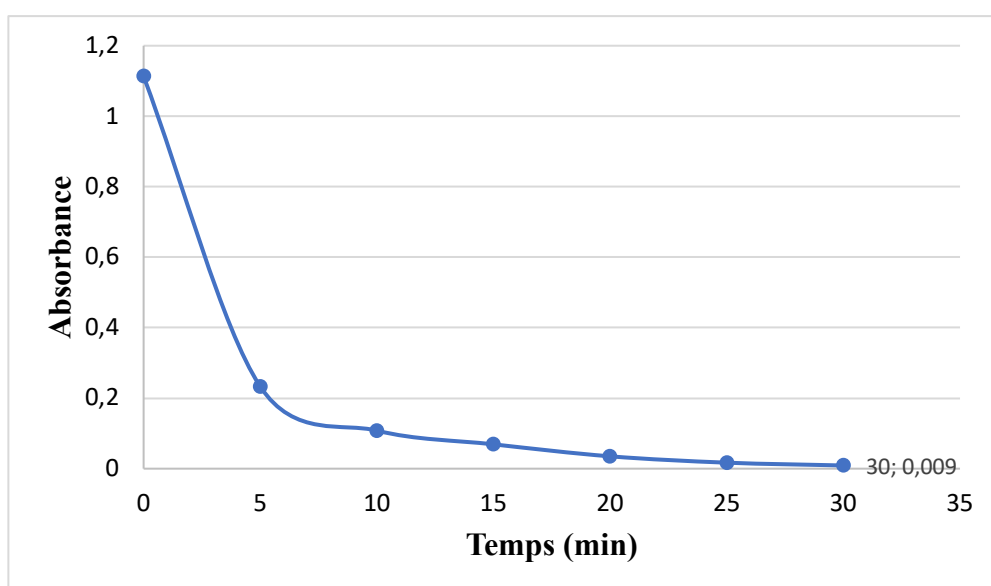


Figure 17. Suivre de la dégradation chimique du colorant E129 en fonction du temps par spectrophotométrie UV-Vis.

4.4.1.1. Extraction des sous-produits

Les résultats de l'étape d'extraction des sous-produits de dégradation du colorant E129 ont montré une séparation efficace des composés formés après traitement. Après acidification du milieu et réalisation des extractions successives par solvant organique, une phase organique nettement distincte a été obtenue. L'évaporation du solvant a permis de récupérer un résidu contenant les produits de transformation du colorant. L'aspect et la quantité de ce résidu témoignent de la présence de composés issus de la dégradation du Rouge Allura AC, qui seront par la suite soumis à une analyse approfondie afin d'en déterminer la nature et la structure chimique.

4.4.1.2. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM)

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits issus de la dégradation du Rouge Allura AC (fig. 18) a mis en évidence une modification nette du profil chromatographique après traitement. La tache correspondant au colorant initial ($R_f \approx 0,13$) a présenté une diminution significative de son intensité, voire une quasi-disparition, traduisant sa dégradation. Parallèlement, l'apparition de plusieurs nouvelles taches visibles sous UV a été observée, indiquant la formation de différents composés secondaires. Ces résultats confirment la génération de sous-produits de dégradation présentant des polarités variées, probablement issus de l'attaque du colorant par les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) et de la rupture des liaisons azoïques ($-\text{N}=\text{N}-$).

Les rapports frontaux (R_f) calculés pour les principales tâches sont les suivants :

- Tache rouge (E129 résiduel) : $R_f \approx 0,13$
- Tache bleue (zone basse) : $R_f \approx 0,11$
- Tache fluorescente haute (près du front du solvant) : $R_f \approx 0,94$

Ces observations sont en accord avec les travaux de **Dhaouadi et Adhoum (2009)**, qui ont mis en évidence la formation de plusieurs intermédiaires lors de la dégradation oxydative de colorants azoïques par électro-Fenton.

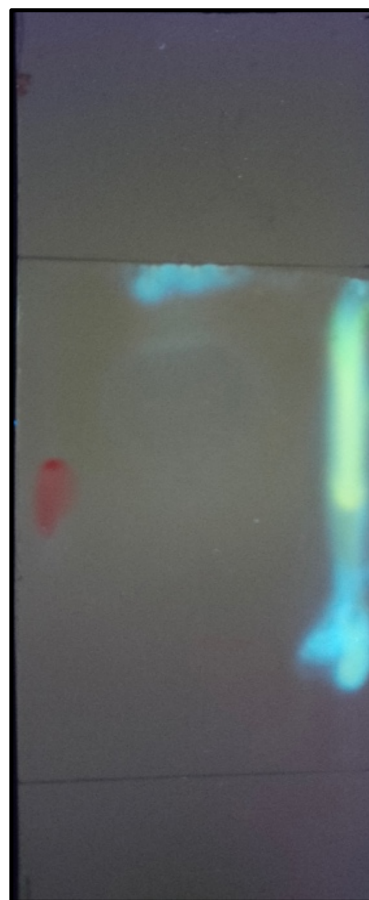


Figure 18. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM).

De même, **Babuponnusami et Muthukumar (2014)** ont rapporté la formation transitoire d'amines aromatiques et d'autres composés intermédiaires après leur minéralisation.

Ces résultats confirment l'efficacité du procédé de Fenton dans la dégradation du colorant E129 et la formation d'intermédiaires réactionnels au cours du processus d'oxydation.

4.4.2. Dégradation biologique (microbienne)

L'étude de la cinétique de biodégradation du Rouge Allura AC (E129) a montré que parmi les microorganismes testés, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* ont démontré une capacité notable à dégrader le colorant au cours de l'incubation (tableau 6). Cette dégradation s'est traduite par une diminution progressive de l'intensité de la coloration et de l'absorbance du milieu (fig. 19), indiquant la transformation du colorant en composés intermédiaires sous l'action du métabolisme bactérien. En revanche, les autres souches testées ont présenté une faible capacité de dégradation ou n'ont montré qu'une décoloration limitée dans les conditions expérimentales utilisées.

Tableau 6. Cinétique de la biodégradation du colorant E129 en fonction du temps.

		Temps (heure)							
		0	6	12	24	36	48	60	72
Souches microbiennes	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,140	0,123	0,095
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	0,153	0,127	0,105	0,07	0,062	0,044	0,042	0,042
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 13316	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,153	0,140
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,153	0,150	0,144	0,14	0,138	0,13	0,128	0,127
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0,153	0,133	0,121	0,12	0,114	0,11	0,1	0,067
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,153	0,133	0,12	0,12	0,118	0,114	0,11	0,065
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,153	0,150	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Chapitre 4. Résultats et Discussion

Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature concernant la biodégradation des colorants azoïques. **Saratale *et al.* (2011)** ont rapporté que des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia* et *Klebsiella* possèdent des systèmes enzymatiques, notamment des azoréductases, capables de réduire les liaisons azoïques (-N=N-) et de favoriser la décoloration des colorants synthétiques. De même, **Solis *et al.* (2012)** ont montré que la biodégradation des colorants azoïques est généralement caractérisée par une diminution progressive de leur concentration.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment ainsi le potentiel de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *B. cereus* pour la biodégradation du Rouge Allura AC.

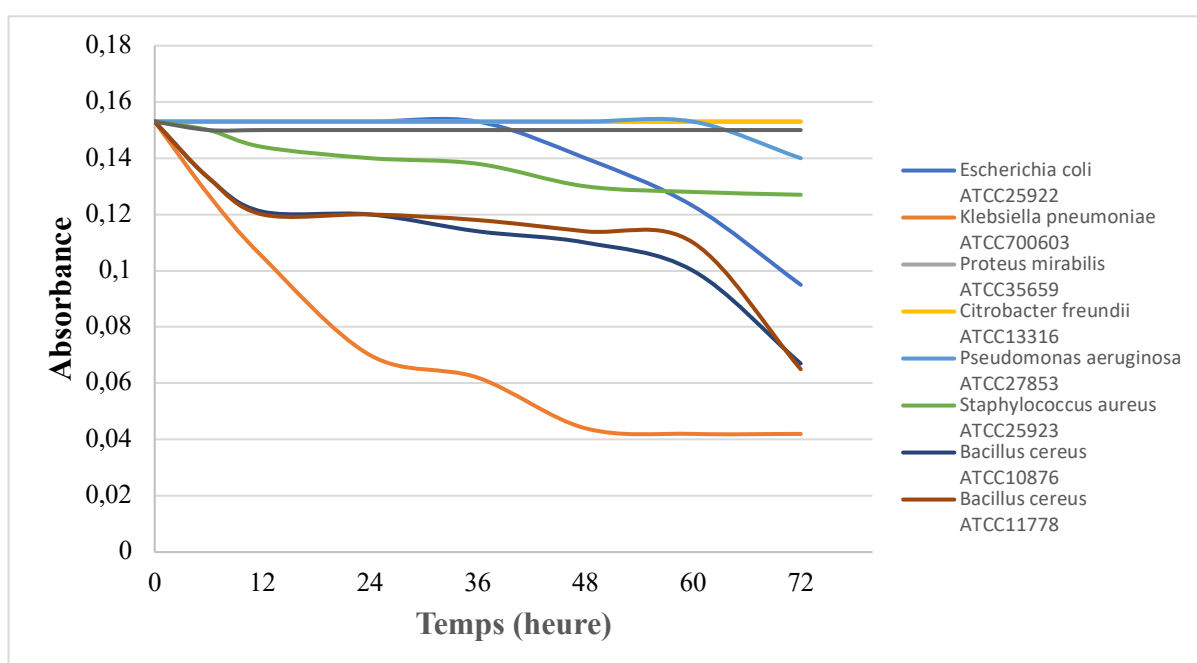


Figure 19. Suivre de la biodégradation du colorant E129 en fonction du temps par spectrophotométrie UV-Vis.

4.4.2.1. Extraction des sous-produits de la biodégradation

L'extraction des sous-produits issus de la biodégradation du colorant E129 a permis d'obtenir une phase organique contenant les composés formés après traitement. Après acidification du milieu réactionnel et réalisation de plusieurs extractions liquide-liquide successives, une séparation nette entre la phase aqueuse et la phase organique a été observée. L'évaporation du solvant a conduit à la récupération d'un résidu de nature variable, traduisant la présence de molécules issues de la transformation du colorant initial. La quantité et l'aspect de l'extrait obtenu confirment l'efficacité de l'étape d'extraction et indiquent la formation de produits de biodégradation, qui ont ensuite été soumis à une analyse chromatographique pour leur identification.

4.4.2.2. Identification et caractérisation par chromatographie (CCM et HPLC) des sous-produits de la biodégradation

À partir de l'analyse de la plaque CCM (fig. 20) des produits issus de la biodégradation, la distance entre la ligne de dépôt (origine) et le front du solvant a été estimée, puis les migrations des taches ont été rapportées à cette distance pour le calcul des R_f .

- Tache rouge (résidu de E129 non totalement dégradé) : $R_f \approx 0,12$
- Tache fluorescente haute (produit de biodégradation principal, proche du front du solvant) : $R_f \approx 0,93$
- Trace intermédiaire très faible (si considérée comme sous-produit mineur) : $R_f \approx 0,30 - 0,35$

Les résultats de la CCM montrent que le composé présentant un R_f faible ($\sim 0,12$) correspond à une espèce encore relativement polaire, probablement le résidu du colorant E129 partiellement dégradé. À l'inverse, la tache caractérisée par un R_f élevé ($\sim 0,93$) traduit la présence d'un composé peu polaire, fortement mobile, correspondant à un produit de dégradation avancée. Par ailleurs, la présence éventuelle d'une tache intermédiaire suggère une transformation progressive du colorant avec formation d'intermédiaires de polarité moyenne. Dans l'ensemble, ces observations confirment que la biodégradation du E129 conduit à la formation de plusieurs sous-produits de polarité différente, mis en évidence par chromatographie sur couche mince.

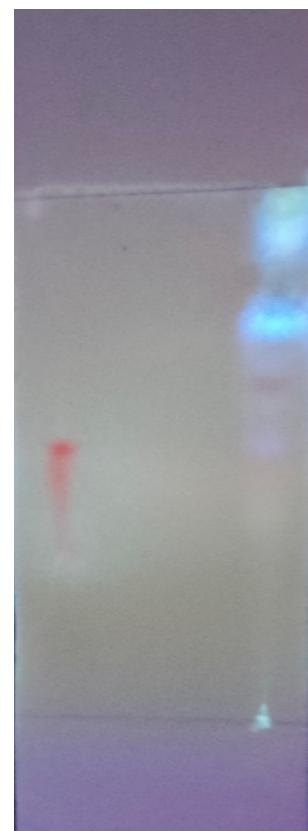


Figure 20. Identification et caractérisation des sous-produits par chromatographie (CCM).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans plusieurs travaux portant sur la dégradation des colorants azoïques. En effet, **Chen (2006)** a montré que la biodégradation des colorants azoïques conduit généralement à la formation d'un mélange d'intermédiaires aromatiques de polarités différentes, visibles en CCM par l'apparition de nouvelles taches associées à la disparition progressive du composé initial. De même, **Forgacs *et al.* (2004)** ont rapporté que la rupture des liaisons azoïques ($-N=N-$) entraîne la formation de fragments aromatiques plus simples, dont la mobilité chromatographique est souvent plus élevée que celle du colorant parent.

Par ailleurs, des études récentes sur la biodégradation du Rouge Allura AC ont également mis en évidence la formation de métabolites intermédiaires avant minéralisation complète. **Thiam *et al.* (2015)** ont observé, lors de la dégradation du même colorant par des procédés d'oxydation avancée, l'apparition de plusieurs produits secondaires présentant des comportements chromatographiques similaires, confirmant un mécanisme de transformation progressive de la molécule. La présence d'une tache intermédiaire ($R_f \approx 0,30-0,35$) observée dans la présente étude suggère également l'existence de composés de transition, correspondant probablement à des produits partiellement oxydés.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment que la biodégradation du E129 ne conduit pas à une élimination directe de la molécule, mais passe par une succession d'étapes impliquant la formation d'intermédiaires de polarité variable, comme largement décrit dans la littérature sur les colorants azoïques.

L'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) a mis en évidence la présence du Rouge Allura AC (E129) avant biodégradation, caractérisé par deux pics chromatographiques principaux observés à des temps de rétention de 4,177 et 4,373 min, pour une surface totale de 31159,7 mAU.s (fig. 21). Après biodégradation bactérienne, le chromatogramme a présenté des modifications importantes, accompagnées d'une diminution marquée de la surface totale, qui est passée à 1199,69 mAU.s. Cette réduction témoigne d'une dégradation significative du colorant et d'une forte diminution de sa concentration dans le milieu. Le chromatogramme (fig. 22) obtenu présente un pic principal à 5,083 min représentant 67,92 % de la surface totale, ainsi que plusieurs pics secondaires à 4,370, 7,811, 8,353 et 8,517 min. L'apparition de ces nouveaux pics témoigne de la formation de métabolites intermédiaires issus de la biodégradation du colorant.

Chapitre 4. Résultats et Discussion

Ces modifications chromatographiques indiquent une transformation importante de la structure moléculaire du Rouge Allura AC sous l'action des microorganismes, probablement liée à la rupture de la liaison azoïque ($-N=N-$). Le taux de dégradation estimé à partir des surfaces chromatographiques atteint environ 96,1 %, ce qui met en évidence la forte efficacité du procédé biologique.

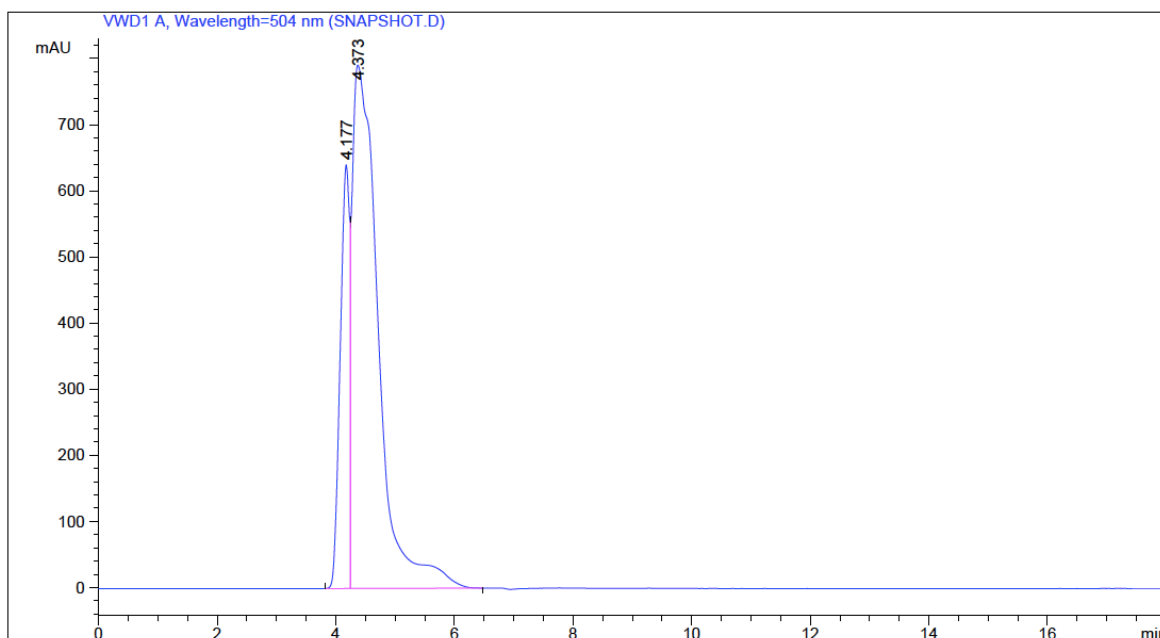


Figure 21. Analyse du Rouge Allura AC (E129) avant biodégradation par HPLC.

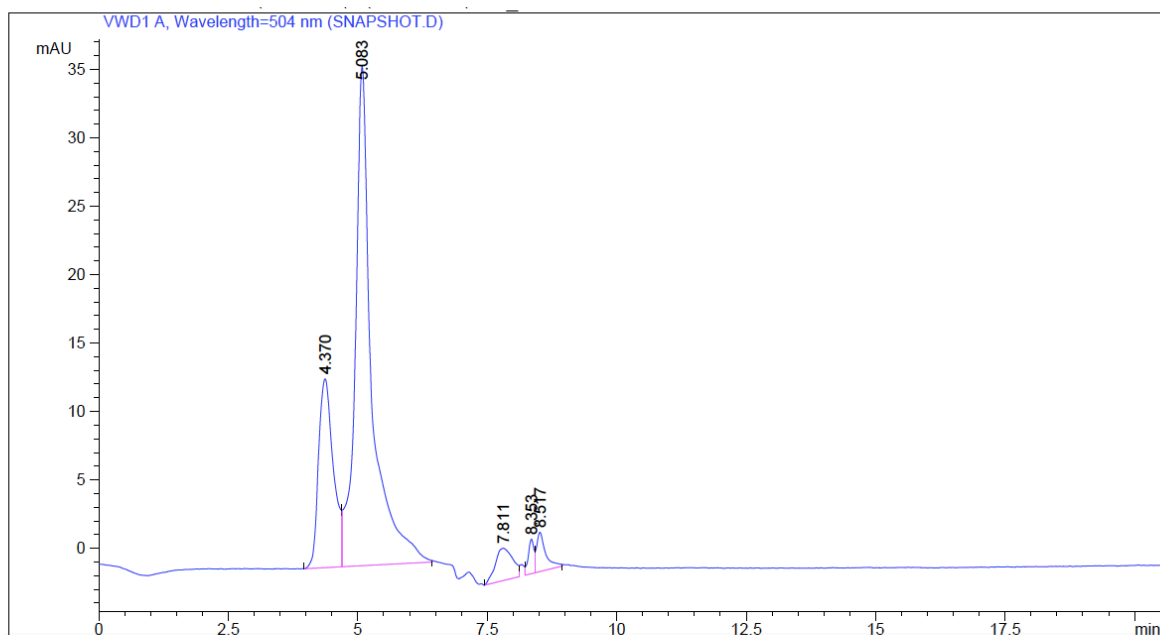


Figure 22. Analyse du Rouge Allura AC (E129) après biodégradation par HPLC.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Gosetti *et al.* (2012)**, qui ont observé la formation de nouveaux produits de transformation lors de la dégradation du Rouge Allura AC, ainsi qu'avec les travaux de **Zilhadia *et al.* (2016)**, qui ont démontré l'intérêt de la HPLC pour le suivi de la disparition du colorant et l'identification de ses sous-produits. Ainsi, l'analyse HPLC confirme une biodégradation avancée du colorant E129 et la formation de métabolites intermédiaires au cours du processus.

Il n'est pas possible d'identifier avec certitude les sous-produits de dégradation du Rouge Allura AC (E129). Une identification formelle nécessite généralement une analyse par HPLC-MS/MS, GC-MS, LC-MS ou RMN. Toutefois, en se basant sur les mécanismes connus de dégradation des colorants azoïques, il est possible de proposer des sous-produits susceptibles d'être formés.

Le Rouge Allura AC (disodium 6-hydroxy-5-[(2-methoxy-5-methyl-4-sulfophenyl)azo]-2-naphthalenesulfonate) est un colorant azoïque dont la dégradation débute généralement par la rupture de la liaison azoïque (-N=N-), conduisant à la formation d'amines aromatiques et de composés hydroxylés. Selon **Thiam *et al.* (2015)**, les principaux sous-produits susceptibles d'être générés sont :

- Acide 1-amino-2-naphtol-6-sulfonique ;
- 5-amino-6-méthoxy-2-méthylbenzène sulfonique ;
- Acide 1,2-naphtoquinone-6-sulfonique (produit d'oxydation ultérieure) ;
- Divers phénols sulfonés, catéchols et acides carboxyliques aromatiques résultant de l'ouverture progressive des cycles aromatiques ;
- Des composés de faible masse moléculaire tels que les acides oxalique, maléique, formique ou acétique lors des étapes avancées de minéralisation.

4.4.2.3. Activité antimicrobienne des sous-produits de dégradation

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des sous-produits issus de la biodégradation du Rouge Allura AC (E129) a révélé la présence de zones d'inhibition de diamètres variables (tableau 7) selon les microorganismes testés (aux tours de 10,7 mm), indiquant une activité antimicrobienne faible à modérée.

La plus importante activité antimicrobienne (fig. 23) a été observée vis-à-vis de *Proteus mirabilis* ATCC 35659, avec une zone d'inhibition de 10,7 mm, indiquant une sensibilité relativement élevée aux sous-produits issus de la dégradation du colorant. Des halos d'inhibition de taille intermédiaire ont également été enregistrés chez *Bacillus cereus* ATCC 10876 et *Bacillus cereus* ATCC 11778 (8,6 mm) ainsi que chez *Candida albicans* ATCC 10231

Chapitre 4. Résultats et Discussion

(8,5 mm). En revanche, aucune inhibition de croissance n'a été observée pour *Citrobacter freundii* ATCC 13316 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, témoignant de leur résistance aux composés formés lors du processus de dégradation.

Tableau 7. Valeur du diamètre des zones d'inhibition (en mm) des sous-produits sur les microorganismes testés.

Souches	Diamètre de la Zone d'inhibition
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7,4 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	7,8 mm
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	10,7 mm
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 13316	6 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7,8 mm
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	8,6 mm
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	8,6 mm
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	8,5 mm

Les résultats obtenus sont cohérents avec les observations rapportées par **Forgacs *et al.* (2004)** et **Saratale *et al.* (2011)**, qui ont montré que les produits intermédiaires issus de la dégradation des colorants azoïques peuvent présenter des propriétés biologiques différentes de celles du colorant initial, incluant parfois une toxicité ou une activité antimicrobienne accrue. De même, **Stolz (2001)** a souligné que la transformation des colorants azoïques peut conduire à la formation de métabolites plus réactifs sur le plan biologique.

Ainsi, les résultats de cette étude indiquent que la dégradation du Rouge Allura AC modifie les propriétés biologiques du colorant et conduit à la formation de sous-produits présentant une activité antimicrobienne mesurable, bien que relativement faible. Ces observations soulignent l'importance d'évaluer non seulement la disparition du colorant initial, mais également les effets biologiques potentiels des composés générés lors de sa dégradation.

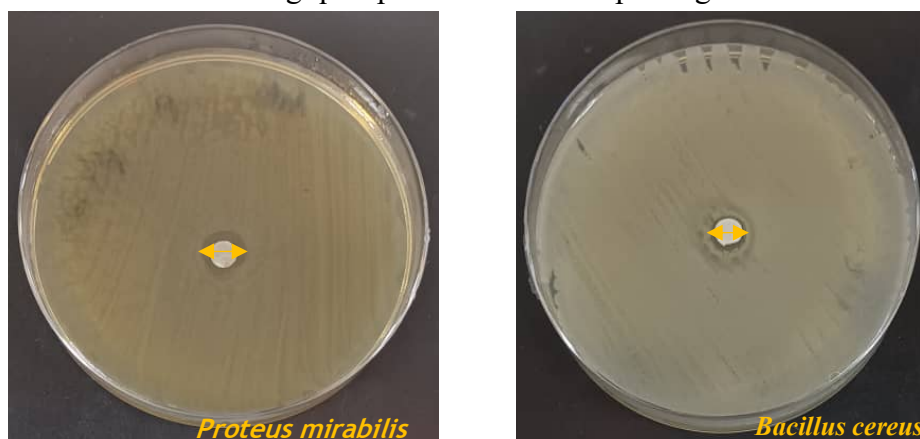


Figure 23. Activité antimicrobienne des sous-produits issus de la dégradation du colorant rouge allura AC vis-vis les microorganismes testés.

Ce travail a porté sur l'étude du colorant alimentaire Rouge Allura AC (E129), un colorant azoïque largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire. L'objectif était d'évaluer sa présence dans différents produits alimentaires commercialisés, d'étudier sa dégradation par des procédés chimiques et biologiques, et d'analyser les caractéristiques ainsi que l'impact potentiel des sous-produits formés sur certains microorganismes de la flore intestinale humaine.

Le dosage du E129 a été réalisé par spectrophotométrie UV-Visible, et la pureté du colorant a été vérifiée par la même technique, avec un maximum d'absorption à 504 nm. Son activité antioxydante, évaluée par le test DPPH en comparaison avec la vitamine C, s'est révélée très faible.

L'activité antimicrobienne du colorant a été étudiée par diffusion sur gélose vis-à-vis de plusieurs souches de référence (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Citrobacter freundii* ATCC 13316, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Candida albicans* ATCC 10231), montrant une absence totale d'activité antimicrobienne du colorant pur.

La dégradation du colorant a été réalisée par procédé de Fenton et par voie biologique en milieu liquide, avec un pourcentage maximal de décoloration atteignant 80,86 %. Les sous-produits obtenus ont été caractérisés par CCM et HPLC, puis testés pour leur activité antimicrobienne.

Les concentrations du Rouge Allura AC dans les produits alimentaires analysés étaient de 65,92 mg/L (kachir), 65,10 mg/L (boisson), 34,08 mg/L (confiture) et 8,45 mg/L (yaourt aromatisé), restant globalement conformes à la DJA.

Enfin, les sous-produits issus de la biodégradation ont présenté une activité antimicrobienne avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 7,4 et 10,7 mm selon les souches étudiées.

Bien que le colorant pur soit biologiquement inactif et que les niveaux détectés soient conformes à la DJA, sa dégradation peut générer des sous-produits susceptibles d'influencer le microbiote intestinal et d'être impliqués dans des désordres digestifs, métaboliques ainsi que dans des effets comportementaux chez l'enfant, notamment l'hyperactivité.

Les perspectives de ce travail incluent :

- Identification plus précise des sous-produits de dégradation du Rouge Allura AC (E129) par des techniques avancées comme la LC-MS/MS ou la GC-MS. Il serait également important,
- Évaluer leur toxicité à travers des tests in vitro et in vivo afin de mieux comprendre leurs effets sur la santé humaine, notamment sur le microbiote intestinal et les fonctions métaboliques.
- Extension de ces études à d'autres colorants alimentaires et l'optimisation des procédés de dégradation permettraient d'améliorer l'évaluation globale de leur devenir et de leurs impacts environnementaux et sanitaires.



Références Bibliographiques

- **Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmed, F., Khan, R. A., & Khan, M. S. (2023).** Ozonation technology for degradation of synthetic dyes in wastewater treatment. *Environmental Research*, 216, 114720. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114720>
- **Alqahtani, M. S. (2025).** The gut microbiota-metabolic axis: Emerging insights from human and experimental studies on type 2 diabetes mellitus. *Medicina (Kaunas)*, 61(11), 2017. <https://doi.org/10.3390/medicina61112017>
- **Amara, M., Aubin, G., Caron, F., Cattoir, V., Dortet, L., Goutelle S., Jeannot K Lepeul, R., Archana, B., Dasgupta, N. (2022),** In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem*, 90(4), 727-733p
- **Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015).** Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914-922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- **Amrouche, (2011),** Origine des additifs alimentaires, *Génie Alimentaire* <https://geniealimentaire.com/spip.php?article59>
- **Arabi A., 2018.** Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine, Thèse de doctorat, université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 185p.
- **Archana, C. M., Jerlin, S. J., Harini, K., Pradeepa, M., & Geetha, N. (2005).** Radical scavenging and antioxidant activity of methanolic leaf extract of *Chromolaena odorata* (L.) King and Robinson by in vitro assays. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management*, 3(7), 1–12.
- **Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., Liu, H., ... Rudensky, A. Y. (2013).** Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451–455. <https://doi.org/10.1038/nature12726>
- **Arrieta, M. C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M., & Finlay, B. B. (2014).** The intestinal microbiome in early life: Health and disease. *Frontiers in Immunology*, 5, 427. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427>
- **ASM Protocols. (2024).** American Society for Microbiology (ASM): "Catalase Test Protocol". Catalase Test Protocol - ASM (ASM.org).
- **Autorité européenne de sécurité des aliments. (2023).** Food additives. <https://www.efsa.europa.eu>
- **Babuponnusami, A., & Muthukumar, K. (2014).** A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 557–572.
- **Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H., Zhong, H., Khan, M. T., Zhang, J., Li, J., Xiao, L., Al-Aama, J., Zhang, D., Lee, Y. S., Kotowska, D., Colding, C., ... Wang, J. (2015).** Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 690–703. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- **Barciela, P., Perez-Vazquez, A., & Prieto, M.A. (2023).** Azo dyes in the food industry: Features, classification, toxicity and regulation. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113935>
- **Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014).** Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157(1), 121–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
- **Bhatnagar, A., & Sillanpää, M. (2010).** Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment—A review. *Chemical Engineering Journal*, 157(2–3), 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.01.007>

Références Bibliographiques

- **Biasucci, G., Benenati, B., Morelli, L., Bessi, E., & Boehm, G. (2010).** Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *Journal of Nutrition*, 140(1), 179S–185S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.110072>
- **Buffie, C. G., & Pamer, E. G. (2013).** Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 790–801. <https://doi.org/10.1038/nri3535>
- **Cappuccino, J. G., Sherman, N. (2014).** Microbiology: a laboratory manual, 10th ed. <https://ci.nii.ac.jp/ncid/BB13222775>
- **Carmen, S. (2008).** Foods Colorants: Chemical and Functional Properties. London: CRC Press.
- **Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014).** Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
- **Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015).** Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- **CE, (1994).** Directive 94/36/CE du Parlement Européen et du Conseil concernant les colorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires. *Journal Officiel des Communautés Européennes*.
- **Ceyhan, B. M., Gultekin, F., Doguc, D. K., Kulac, E. (2013).** Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. *Food Chem. Toxicol.* 56:145–148. [10.1016/j.fct.2013.02.016](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.016)
- **Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., & Gewirtz, A. T. (2015).** Dietary emulsifiers impact the gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519(7541), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature14232>
- **Chen, H. (2006).** Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Current Protein & Peptide Science*, 7(2), 101–111. <https://doi.org/10.2174/138920306776359786>
- **Chung, K. T. (2016).** Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(4), 233–261. <https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1236602>
- **Codex Alimentarius, 2021.** Noms de catégorie et système international de numérotation des additifs alimentaires, FAO/OMS, 94p.
- **Collins, C. H., Lyne, P. M., & Grange, J. M. (2016).** Microbiological Methods (8th ed.). Butterworth-Heinemann. https://mmstcchemistry.weebly.com/uploads/2/4/1/2/24121933/microbiological_methods.pdf
- **Coudeyras, S., & Forestier, C. (2010).** Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(8), 611–650. <https://doi.org/10.1139/W10-052>
- **Crini, G. (2006).** Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*, 97(9), 1061–1085. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.001>
- **David, L. A., et al. (2014).** Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- **De Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2019).** Atlas of Clinical Fungi / Medical Mycology (4th ed.). Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- **De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (Eds.). (2009).** Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed., Vol. 3: The Firmicutes). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- **Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011).** Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Suppl 1), 4554–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000087107>
- **Dhaouadi, H., & Adhoum, N. (2009).** Decolorization and mineralization of an azo dye by electro-Fenton process. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 507–513.

Références Bibliographiques

- **Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016).** Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>
- **Dongmo, A. B., Tchoumboungang, F., & Fekam, B. F. (2010).** Evaluation of antioxidant and radical scavenging activities of essential oils from Cameroon medicinal plants. *Food Chemistry*, 122(4), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.066>
- **Downham, A., & Collins, P. (2000).** Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology*, 35(1), 5–22.
- **Ebel, F. (2012).** Microbiote intestinale humaine : Physiologie et rôle dans la santé. *Actualités Pharmaceutiques*, 51(516), 18–22.
- **El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013).** The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 497–504. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3050>
- **Elder, D. P., Teasdale, A., & Snodin, D. J. (2023).** Metabolism and toxicological considerations of azo food dyes in the gut microbiome. *Food and Chemical Toxicology*, 172, 113559. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113559>
- **EUCAST. (2025).** Disk diffusion methodology and quality control. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://www.eucast.org/bacteria/methodology-and-instructions/disk-diffusion-and-quality-control/>
- **Eunice, L. C., Griffiths, P. R., Chalmers, J. M. (2010).** Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd.
- **European Commission, (2020).** Regulation on food additives and amendments (EC No 1333/2008).
- **European Food Safety Authority (EFSA). (2009).** Scientific opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E129) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1327. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1327>
- **Fallico, B., Chiappara, E., Arena, E., Ballistreri, G. (2011).** Assessment of the exposure to Allura Red colour from the consumption of red juice-based and red soft drinks in Italy. *Food Additive Contaminants; A Chemical Analysis Control Expo.Risk Assess.* 281501–1515. 10.1080/19440049.2011.596166
- **Feng, J., Cerniglia, C. E., & Chen, H. (2012).** Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4(2), 568–586. <https://doi.org/10.2741/e400>
- **Feng, J., Cerniglia, C. E., & Chen, H. (2020).** Significance of intestinal microbiota and azo dye metabolism in the mutagenicity of dietary food colorants. *Food Chemistry*, 312, 125678. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125678>
- **Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2015).** Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 74(1), 13–22. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001463>
- **Foley, S., Burgess, C. M., O'Connor, P. M., & Cotter, P. D. (2023).** Metabolism of azo food dyes by bacterial members of the human gut microbiome. *Anaerobe*, 83, 102783. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102783>
- **Forgacs, E., Cserhádi, T., & Oros, G. (2004).** Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*, 30(7), 953–971. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.001>
- **Galkin F., Mamoshina P., Aliper A., Putin E., Moskalev V., Gladyshev V.N., Zhavoronkov A., 2020.** Human Gut Microbiome Aging Clock Based on Taxonomic Profiling and Deep Learning, *Iscience*, 6, (23), 1-33.
- **Gallen, C., Pla, J. (2013).** Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue Française d'Allergologie*. 53(Supplement 1) :9-18

Références Bibliographiques

- **Gao, Y., Li, W., Huang, X., Lyu, Y., & Yue, C. (2024).** Advances in gut microbiota-targeted therapeutics for metabolic syndrome. *Microorganisms*, 12(5), 851. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050851>.
- **Gaouar, Z. L., Besseghir, F. Z., Gharbi, M. (2022).** Additifs alimentaires : Inventaire des substances ajoutées aux denrées alimentaires de large consommation dans l'Ouest algérien, *Journal de la Faculté de Médecine d'Oran*, 6, (2), 805-814.
- **Gomaa, E. Z. (2020).** Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: A review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- **Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Calabrese, G., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2012).** Identification of photodegradation products of Allura Red AC (E129) in a beverage by ultra high performance liquid chromatography–quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 746, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.020>
- **Granja-Iglesias, A., Vázquez, X., Sabater, C., Hevia, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M., & Moreno, F. J. (2025).** In vitro investigation of the effects of the food additives monosodium glutamate and Allura Red AC on the human gut microbiota and intestinal cell lines. *Journal of Food Science*, 90(8). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70504>
- **Gronlund, M.M., Lehtonen, O.P., Eerola, E., Kero, P., (1999)** :Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Gastroenterol Nutr.* 1999 Jan;28(1):19-25.
- **Hamjane, N., Bennani Mechita, M., Ghailani Nourouti, N., & Barakat, A. (2024).** Gut microbiota dysbiosis-associated obesity and its involvement in cardiovascular diseases and type 2 diabetes: A systematic review. *Microvascular Research*, 151, 104601. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2023.104601>
- **Honda, K., & Littman, D. R. (2016).** The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75–84. <https://doi.org/10.1038/nature18848>
- **Hovor, I., Nakonechny, F., & Nisnevitch, M. (2023).** Photo- and Sono-Active Food Colorants Inactivating Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15126. <https://doi.org/10.3390/ijms242015126>
- **Hsueh, C. L., Huang, Y. H., Wang, C. C., & Chen, C. Y. (2005).** Degradation of azo dyes using low iron concentration of Fenton and Fenton-like system. *Chemosphere*, 58(10), 1409–1414. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.091>
- **Huang, H. Y., Chiu, C. W., Sue, S. L., Cheng, C. F. (2003).** Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *J. Chromatogr. A* 99529–36. [10.1016/S0021-9673\(03\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00530-2)
- **Iliev, I. D., Ananthakrishnan, A. N., & Guo, C.-J. (2025).** Microbiota in inflammatory bowel disease: Mechanisms of disease and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Microbiology*, 23, 509–524. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01163-0>
- **Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm). (2021).** Microbiote intestinal (flore intestinale). Inserm. <https://www.inserm.fr>
- **Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013).** Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–690. <https://doi.org/10.1038/ni.2608>
- **Kassab, T. (2025).** Microbiote et santé intestinale : optimiser le conseil et la prise en charge à l'officine. *Pharma365*. <https://www.pharma365.fr/grand-angle/microbiote-et-sante-intestinale-optimiser-le-conseil-et-la-prise-en-charge-a-lofficine>
- **Kaur, A., & Gupta, U. (2012).** The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes. *G-Journal of Environmental Science and Technology*, 1(2), 24–46.

Références Bibliographiques

- **Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016).** From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- **Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (2017).** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. https://www.jblearning.com/catalog/productdetails/9781284322378?srsId=AfmBOor2KjBk_YsORTFz9CckGi2w_qAcuVR9GNJi8LziPt08WzqFNLq
- **Kwon, Y. H., Wang, H., Denou, E., Ghia, J.-E., Rossi, L., Fontes, M. E., Bernier, S. P., Surette, M. G., & Khan, W. I. (2022).** Chronic exposure to synthetic food colorant Allura Red AC promotes susceptibility to experimental colitis via intestinal serotonin in mice. *Nature Communications*, 13, 7617. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35309-y>
- **Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017).** Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 219, 232. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>
- **Liu, X., Zhang, Y., Wang, J., Li, H., & Chen, W. (2024).** Gastric microbiota: Composition, functions, and implications for human health and disease. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1365824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1365824>
- **Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021).** Brock biology of microorganisms (16th ed.). Pearson.
- **Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Tille, P. M. (2022).** Manuel de microbiologie diagnostique (7^e éd.). Elsevier. <https://shop.elsevier.com/books/textbook-of-diagnostic-microbiology/mahon/978-0-323-82997-7>
- **Mansour, H. B., Boughzala, O., Dridi, d., Barillier, D., Chekir-Ghedira, L. & Mosrati, R. (2011).** Les colorants textiles sources de contamination de l'eau : CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 24(3), 209–238. <https://doi.org/10.7202/1006453ar>
- **Mollah, M. Y. A., Schennach, R., Parga, J. R., & Cocke, D. L. (2001).** Electrocoagulation (EC)—science and applications. *Journal of Hazardous Materials*, 84(1), 29–41. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00176-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00176-5)
- **Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., et Roura, S. I. (2015).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food sci. Technol*, 38, (5), 565–570.
- **Mountzouris, K.C., McCartney, A.L., Gibson, G.R., (2002)** :Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation.. *Br J Nutr*. 87 (5): 405-420.
- **Msagati, A. M. (2013).** Food Acids and Acidity Regulators, *Chemistry of Food Additives and Preservatives*, 125-129.
- **Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020).** Medical Microbiology (9th ed.). Elsevier. <https://shop.elsevier.com/books/medical-microbiology/murray/978-0-323-67322-8>
- **Ngo, A. C. R., & Tischler, D. (2022).** Microbial Degradation of Azo Dyes: Approaches and Prospects for a Hazard-Free Conversion by Microorganisms. *International journal of environmental research and public health*, 19(8), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084740>
- **Ntrallou, K., Gika, H., & Tsochatzis, E. (2020).** Analytical and Sample Preparation Techniques for the Determination of Food Colorants in Food Matrices. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(1), 58. <https://doi.org/10.3390/foods9010058>
- **O'Toole, P. W., & Jeffery, I. B. (2015).** Gut microbiota and aging. *Science*, 350(6265), 1214–1215. <https://doi.org/10.1126/science.aac8469>
- **OMS. (2005).** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine a l'échèle nationale. 4^eme Edition, 95p. <http://www.sante.dz/aarn/stand6ed.pdf>

Références Bibliographiques

- **Oturan, M. A., & Aaron, J. J. (2014).** Advanced oxidation processes in water/wastewater treatment: Principles and applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(23), 2577–2641. <https://doi.org/10.1080/10643389.2013.829765>
- **Panizza, M., & Cerisola, G. (2009).** Direct and mediated anodic oxidation of organic pollutants. *Chemical Reviews*, 109(12), 6541–6569. <https://doi.org/10.1021/cr9001319>
- **Pera-Titus, M., García-Molina, V., Baños, M. A., Giménez, J., & Esplugas, S. (2004).** Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: A general review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 47(4), 219–256. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2003.09.010>
- **Pignatello, J. J., Oliveros, E., & MacKay, A. (2006).** Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/10643380500326564>
- **Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2017).** *Microbiology* (10th ed.). McGraw-Hill Education. <https://search.worldcat.org/title/982094951>
- **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- **Riedel, S., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., Sakanari, J. A., Hotez, P., & Mejia, R. (2019).** *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (28th ed.). McGraw-Hill Education. <https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=2629>
- **Rovina, K., Siddiquee, S., & Shaarani, S. M. (2016).** Extraction, analytical and advanced methods for detection of Allura Red AC (E129) in food products. *Frontiers in Microbiology*, 7, 798. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00798>
- **Saci, Y., Sahiri, L. (2020).** Utilisation des additifs alimentaires naturels dans les matières grasses: Cas du safran, Thème de mémoire, 28p.
- **Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011).** Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.06.006>
- **SCCS, (2012).** Scientific Committee on Consumer Safety. Opinion on Allura Red AC. European Commission.
- **Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010).** Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
- **Shahzad Hussain, S., Mehmood, A., & Khan, M. K. (2023).** Evaluation of antioxidant activity of plant extracts and essential oils using DPPH assay. *Food Chemistry*, 405, 134779. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134779>
- **Shen, Y., Fan, N., Ma, S. X., Cheng, X., Yang, X., & Wang, G. (2025).** Gut Microbiota Dysbiosis: Pathogenesis, Diseases, Prevention, and Therapy. *MedComm*, 6(5), e70168. <https://doi.org/10.1002/mco2.70168>
- **Shkoporov, A. N., & Hill, C. (2019).** Bacteriophages of the human gut: The “known unknown” of the microbiome. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.003>
- **Sobańska, A. W., Pyzowski, J., & Brzezińska, E. (2017).** SPE/TLC/Densitometric Quantification of Selected Synthetic Food Dyes in Liquid Foodstuffs and Pharmaceutical Preparations. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2017, 9528472. <https://doi.org/10.1155/2017/9528472>

Références Bibliographiques

- Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (2012). Microbial decolouration of azo dyes: A review. *Process Biochemistry*, 47(12), 1723–1748. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014>
- Starek, M. (2025). Modern applications of thin-layer chromatography in pharmaceutical and environmental analysis. *Journal of Chromatography A*.
- Stolz, A. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 69–80. <https://doi.org/10.1007/s002530100686>
- sunarti, L. S. (2022). Microbial normal flora: Its existence and their contribution to homeostasis. *Journal of Advances in Microbiology*, 22(9), 1–15. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2022/v22i930483>
- Tarriño, M., Gutiérrez-Bautista, J. F., Durán, M. J. O., et al. (2025). The role of intestinal microbiota in the humoral response to SARS-CoV-2 after mRNA-1273 vaccination. *Scientific Reports*, 15, 24731. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11103-w>
- Thani, M. Z. (2018). A simple spectrophotometric evaluation method of Allura Red (E129) in several samples using cloud point extraction. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28(3), 134–140. <https://doi.org/10.23851/mjs.v28i3.157>
- Thiam, A., Sirés, I., Centellas, F., Cabot, P. L., & Brillas, E. (2015). Decolorization and mineralization of Allura Red AC azo dye by solar photoelectro-Fenton: Identification of intermediates. *Chemosphere*, 136, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.047>
- Tighrin, A. (2019). Recherche et dosage de quelques additifs alimentaires sur les produits dérivés de fruits, effet sur la santé et comparaison aux normes : optimisation et validation des méthodes analytiques, Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi ouzou, 124p.
- Underhill, D. M., & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: Interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 405–416. <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Valencia, S., Zuluaga, M., Florian Pérez, M. C., Montoya-Quintero, K. F., Candamil, M., & Robledo, S. (2025). Human Gut Microbiome: A Connecting Organ Between Nutrition, Metabolism, and Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4112. <https://doi.org/10.3390/ijms26094112>
- Wakrim, A., Byoud, F., El Ghachtouli, S., Jamal Eddine, J., Azzi-Martin, L., & Azzi, M. (2018). Discoloration Study of Azo Dye Solution Using the Fenton Process. *European Journal of Engineering and Technology Research*, 3(10), 75–80. DOI: 10.24018/ejeng.2018.3.10.915
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2020). Prescott's Microbiology (11thed.). McGrawHill Education. https://studylib.net/doc/28079761/prescott%E2%80%99smicrobiology?utm_source=chatgpt.com&ct=d273e03b5a0fcf59%3A667adea0481e5f3175573583f18d68&utm_campaign=captcha_passed
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2020). Prescott's microbiology (11th ed.). McGraw-Hill Education. <https://www.worldcat.org/title/982094951>
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Zengin, N., Yuzbasioğlu, D., Unal, F., Yilmaz, S., Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives : Sodium benzoate and potassium benzoate, *Elsevier*, 49, 763–769.

Références Bibliographiques

- **Zhang, H., Xiang, J., Feng, J., Zhang, M., & Xi, Q. (2025).** Gut microbiome dysbiosis and inflammatory bowel disease complement each other. *Digestive Diseases*, 43(3), 345–357. <https://doi.org/10.1159/000544771>
- **Zhang, J., Guo, Z., Xue, Z., Sun, Z., Zhang, M., Wang, L., Wang, G., Xu, J., Cao, H., Xu, H., Lv, Q., Zhong, Z., Chen, Y., Qimuge, S., Menghe, B., Zheng, Y., Zhao, L., Chen, W. (2015).** A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *The ISME Journal*, 9, 1979–1990. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.11>
- **Zuo, T., & Ng, S. C. (2018).** The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2247. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02247>

Annexes



		NACTIS GOURMET ZA LA GUIDE 1 43200 YSSINGEAUX		Tel. 04.71.59.04.78 Fax 04.71.65.54.24 Mail info@sevarome.com		Mise à jour 31/07/2014 VISA Sevarome 	
FICHE TECHNIQUE PRODUIT							
Description du produit							
Consistance		poudre		hydrosoluble (25 g / l)		à mélanger dans phase aqueuse	
Couleur		rouge					
Odeur		neutre					
REFERENCE		COL0008111		Protocole de dégustation			
REFERENCE CLIENT				N.A.			
Statut légal		ou : Application réelle					
Dénomination COLORANT ROUGE FRAISE POUDRE HYDRO E.129							
Code douanier		32041100		Application		Dosage indicatif (g/kg)	
				maxi. glaces et desserts		0,224	
				maxi. produits de boulangerie fine		0,299	
				maxi. pour confiserie		0,449	
Composition		Aromes : Règlement CE 1334/2008 et décret 2011-949					
Colorants : Règlement 380/2012 - 231/2012 - 232/2012 (teneurs maximales) et reglt 1129/2011							
- Agents d'aromatisation (équivalences éventuelles)				- Solvants - supports :			
statut Européen : E.129 rouge allura AC (66,8%)/ statut USA-FDA : FD&C RED N°40				dextrose (ex-blé)			
- Substances limitées :				- Additifs (*) :			
non							
Produit non traité par ionisation et ne contenant pas d'ingrédient ou d'additif traité par ionisation.							
- Autres déclarations :				- Fiche sécurité :			
				oui			
OGM (Directives 1829 et 1830/2003/CE) :		non					
Allergènes (Directive 2007/68/CE) :		non					
(*) Notion de carry-over		(Décret du 7/12/84 et Circulaire 23/08/85)					
Additif non déclarable (sauf (1)) dans le produit fini si : l'additif se retrouvant dans le produit fini ne provient que de la matière première employée et n'a aucune influence sur le produit fini. La preuve en incombe au fabricant de l'aliment. L'indication des solvants ou supports (proportion limitée à la quantité strictement nécessaire à la présentation de l'arôme n'est pas requise dans l'étiquetage des denrées alimentaires contenant cet arôme.							
Analyse physicochimique		N.S. : Non Significatif		Microbiologie			
pH 20 °C		+/- 0,30		Germes totaux		< 1000/g	
Densité 20 °C		+/- 0,010		Levures /		< 20 / g	
Indice de Réfraction 20 °C		+/- 0,005		Moissures		< 20 / g	
Indice polarimétrique 20 °C				Coliformes		< 20 / g	
% vol./vol.éthanol 20 °C				Coliformes fécaux		0 / 1 g	
% matière sèche							
Métaux lourds		les arômes sont conformes à l'Arrêté du 11/07/91 sur les critères de pureté des arômes ainsi qu'au Règlement CE 1334/2008		Nutrition			
Autre		concentration : 66,8 %		Protéines		0%	
*BRIX				Glucides		29%	
Point éclair (°C)				Lipides		0%	
				Humidité		N.S.	
				Autres		N.S.	
				Kcal / 100 g		120	
Conservation							
Stockage		Conserver à l'abri de la lumière et de l'oxygène dans l'emballage d'origine;					
Durée de conservation		12 mois (dans l'emballage d'origine non ouvert)		Température stockage (°C)		20	
		3 mois après ouverture et correctement fermé		Température stockage (°C)			
Transport		Terrestre, maritime ou aérien.		Températures		Sans spécifications	
Palettisation							
Mentions d'étiquetage Règlement 1334/2008 et 95/45							
Colorant : E.129							
E.129 : Peut avoir des effets indésirables sur l'activité et l'attention chez les enfants.							
Clause de responsabilité							
Ces informations sont rédigées au mieux de nos connaissances à la date indiquée sur le document. Tous les renseignements obligatoires ou facultatifs permettant au client de se conformer à la réglementation en vigueur ont été fournis. Par conséquent, le fournisseur se considère déchargé de toute responsabilité en ce qui concerne les infractions découlant de l'utilisation du produit.							

Merci de nous préciser si vous souhaitez recevoir les mises à jour de nos fiches techniques lors de modifications mineures.

Cours Hygiène- Stérilisation	Fiche Méthode La coloration de Gram
--	--

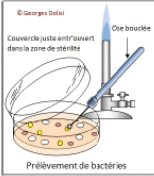
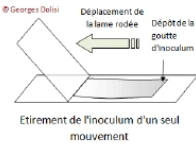
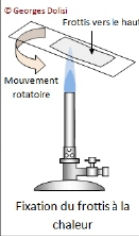
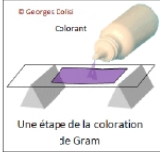
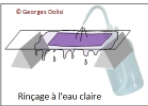
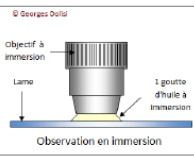
Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

1. Principe de la coloration

Le violet de gentiane est un colorant qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. Certaines bactéries gardent leur couleur violette : ce sont les bactéries Gram + grâce à la composition chimique de leur paroi et de sa structure plus épaisse. D'autres perdent cette couleur violette à cause de leur paroi fine et davantage perméable : ce sont les bactéries dites de Gram-.

Fiche méthode			
Matériel		Produits	
<ul style="list-style-type: none"> Pissette d'eau Lames Ecouillons 	<ul style="list-style-type: none"> Boîtes de Pétri Cuve à coloration <p>Microscopes, lames, lamelles, bec benzène, ôses</p>	<ul style="list-style-type: none"> Violet de Gentiane Décolorant Safranine 	<ul style="list-style-type: none"> Lugol Culture bactérienne Eau de javel (pour désinfecter les lames à la fin)

Mode opératoire A partir de cultures bactériennes sur surface gélées (lames de contact):

1. Faire un frottis	2. Coloration au violet de gentiane	3. Décolorer
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Nettoyer une lame à l'alcool. ✓ Déposer une goutte d'H₂O sur la lame. ✓ Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries ✓ Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air. ✓ Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.   	<p>1) Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé. 2) Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries. 3) Eliminer l'excès de colorant dans un béc. Rincer très brièvement en faisant couler l'eau sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis). 5) Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Laisser agir 1 minute. Jeter la solution de Lugol dans un béc et rincer brièvement à l'eau comme précédemment.</p>    	<ul style="list-style-type: none"> ■ Faire couler la solution de décoloration (mélange d'alcool et d'acétone) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes). ■ Rincer à l'eau ■ Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+. ■ Rincer à l'H₂O. ■ Laisser sécher à l'air. ■ Observer au microscope (grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x). 

NUTRITIVE AGAR 2.8% + NaCl

54478

64484

GÉLOSE / MILIEU D'ENRICHISSEMENT**IVD****1- APPLICATION**

Cette gélose est un milieu solide qui convient à la subculture des bactéries ne présentant pas d'exigences particulières.

2- PRINCIPE

La culture des bactéries non exigeantes est favorisée par les substances nutritives apportées par la peptone, l'extrait de viande et de levure.

Elle peut être additionnée de différents ingrédients : sucres, colorants, sérum, sang, extrait globulaire, etc...

La présence de chlorure de sodium permet d'éviter l'hémolyse, lorsqu'on y ajoute du sang.

3- PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - 25 tubes de 8 ml (gélose inclinée) code 54478
- Milieu déshydraté
 - flacon de 500 g code 64484

4- COMPOSITION (en g/l d'eau distillée)

Peptone	4,4
Extrait de viande	1,85
Extrait de levure	4,4
Chlorure de sodium	6,35
Agar	

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **28 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Si nécessaire, ajuster le pH à 7,4. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Répartir en boîtes de Petri ou en flacons.

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2-8°C
- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à +15-25°C.
La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION**Matériel :**

- Matériel fourni : milieu Nutritive agar 2,8% + NaCl.

Ensemencement :

Ensemencer à partir d'une culture pure et fraîche prélevée sur milieu gélosé.

Incubation :

Incuber pendant 24 heures à 37°C.

B.C.P.

REF 54376

REF 63854

REF 64444

**MILIEU D'ISOLEMENT DES ENTÉROBACTÉRIES ET DE DIFFÉRENCIATION
DES ESPÈCES LACTOSE (+) ET LACTOSE (-)**



2014/04

1- APPLICATION

La gélose lactosée au bromocrésol-pourpre (B.C.P.) est un milieu non sélectif pour l'isolement et la numération des Entérobactéries. Il permet (également) de différencier les espèces fermentant le lactose de celles qui ne le fermentent pas. Ce milieu est utilisé couramment au cours de l'examen bactériologique des urines et des selles.

2- PRINCIPE

La différenciation des Entérobactéries est basée sur leur capacité à fermenter ou non le lactose. S'il y a fermentation du lactose, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune des colonies en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH).

3- PRÉSENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - coffret de 20 boîtes de Petri (90 mm) (**BCP**) code 63854
- Milieu prêt à l'emploi (à répartir)
 - 6 flacons de 200 ml (**BCP**) code 54376
- Milieu déshydraté 500 g code 64444

4- COMPOSITION THÉORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu est préparé selon la formule décrite par HAJNA et DAMON (1).

Casitone	7,5
Extrait de levure	2
Lactose	10
Agar	25
Pourpre de Bromocrésol	0,02
pH final :	6,8 ± 0,2

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre 29 grammes de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes puis répartir en boîtes de Petri ou en flacons.

5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : +2-8°C.
 - Milieu prêt à l'emploi (à répartir) : +2-25°C.
 - Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec et frais.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu B.C.P.

Ensemencement :

Ensemencer en stries directement à partir de l'échantillon à étudier (suspension de selles, urines). Pour la conservation des échantillons biologiques, se référer aux recommandations en vigueur (2).

BIO-RAD

CHAPMAN - MANNITOL SALT AGAR

REF 53647 - 63844 - 64134

Milieu d'isolement et de Différenciation des Staphylocoques



1. APPLICATION

La gélose Chapman - Mannitol Salt Agar est un milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.

2. PRINCIPE

La sélectivité de ce milieu est basée sur la présence de chlorure de sodium qui inhibe la plupart des bactéries à Gram (+) et à Gram (-). La différenciation des Staphylocoques est basée sur leur capacité à fermenter ou non le mannitol. S'il y a fermentation, cela induit une acidification qui entraîne une coloration jaune du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH).

3. PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi
 - coffret de 20 boîtes de Petri (90 mm) (**MSA**) code 63844
- Milieu prêt à l'emploi (à répartir)
 - 6 flacons de 200 ml (**MSA**) code 53647
- Milieu déshydraté
 - flacon de 500 g code 64134

4. COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu Chapman - Mannitol Salt Agar est préparé selon la formule décrite par Chapman (1).

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| • Peptone | 10 |
| • Extrait de viande de bœuf | 1 |
| • Chlorure de sodium | 75 |
| • Mannitol | 10 |
| • Rouge de phénol | 0.025 |
| • Agar | 15 |
| • pH final : | 7.4 ± 0.2 |

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **111 grammes** de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée stérile. Mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes. Répartir en boîtes de Petri ou en flacons.

5. CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi (Petri) : à + 2 - 20°C.
- Milieu prêt à l'emploi (tubes et flacon) : à + 2 - 8°C.
- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à +15-25°C.

La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

6. UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu Chapman – Mannitol Salt Agar

Ensemencement :

Ensemencer directement en stries à partir de l'échantillon à étudier. Pour la conservation des échantillons biologiques, se référer aux recommandations en vigueur (2).



Hektoen Agar

Catalog #	Description
3563894	Hektoen Agar , ready-to-use, 90 mm x 20 dishes
3564284	Hektoen Agar , dehydrated, 500 g

For laboratory use only.

Intended Use

Medium used for the detection and isolation of *Enterobacteria*, especially *Salmonella* and *Shigella*, in food products.

Principle

The medium is based on several reactions. *Enterobacteriaceae* that utilize lactose, saccharose and/or salicin for growth, acidifying the medium, which combined with bromothymol blue turns the agar yellow. *Salmonella* and *Shigella* utilize peptone for growth, alkalizing the medium, which combined with fuchsin turns the agar blue. Further differentiation occurs through the production of H₂S. Thiosulfate serves as a reaction component and ferric salts as indicators through the formation of iron sulfides, which turn colonies black indicating the presence of *Salmonella*. Due to the presence of bile salts, the medium inhibits the growth of Gram positive bacteria.

Theoretical Composition

Base Medium

Enzymatic digest of meat	12 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Sodium thiosulfate	5 g
Bile salts	9 g
Ferric ammonium citrate	1.5 g
Salicin	2 g
Lactose	12 g
Saccharose	12 g
Fuchsin acid	100 mg
Bromothymol blue	65 mg
Agar	13 g
Distilled water	1,000 ml
Final pH at 25°C = 7.5 ± 0.2	

Shelf Life and Storage

Store ready-to-use medium at 2–8°C. Store dehydrated medium at 15–25°C in carefully sealed bottles in a cool, dry place. Expiration date is on package.

Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer

Milieu gélosé C(gélose Sabouraud avec glucose)
Sabouraud gélose (XIX)**355-6524****355-6519****356-4494****DOMAINE D'APPLICATION**

La gélose de Sabouraud est utilisée pour l'isolement, l'identification et la culture des levures et moisissures à partir de prélèvements peu souillés par les bactéries.

Ce milieu est recommandé par le Codex de la Pharmacopée Française pour les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques.

Equivalent USP 30/NF 25 : Milieu XIX

REFERENCE(S)

• **USP 30/NF 25 US Pharmacopeia and National Formulary (2007) : Microbial Limit Tests (61) - Microbiological Tests**

• **Pharmacopée Européenne 6.0 - Méthodes Biologiques - 2.6.13. : Contrôle Microbiologique des produits non stériles (Recherche de micro-organismes spécifiés)**

PRINCIPE

La croissance rapide des levures et des moisissures est favorisée par la présence des substances nutritives apportées par la peptone et par celle du glucose utilisé comme source énergétique. L'ajout de différents antibiotiques peut être réalisé afin de rendre le milieu inhibiteur vis-à-vis des bactéries.

PRESENTATION

• **Prêt à l'emploi**
8 ml x 25 tubes (incl.) **code 355-6524**
100 ml x 6 flacons **code 355-6519**

• **Déshydraté**
500 g **code 356-4494**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

• Prêt à l'emploi : à +2-8°C
• Déshydraté : +15-25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
• La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final = 5,6 – 6,0

NB : Des adaptations de la formule ont pu être réalisées afin d'atteindre les critères de performance requis.

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Diluant(s)
- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Tubes à essais (16 x 160 mm) avecouchons autoclavables
- Flacons de 125 ml en Pyrex avec bouchons autoclavables
- Boîtes de pétri stériles (Ø = 90 mm)
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Etaleurs stériles
- Bain-marie avec une précision de ±1°C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ±1°C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation.

Dissoudre 42 grammes de poudre dans 1 litre d'eau distillée.

Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Répartir à raison de 8 ml par tubes ou de 100 ml par flacon, et stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Taux de reconstitution : 42 g/l
500 grammes de poudre permettent de réaliser 11,9 litres de milieu.

PROTOCOLE**Ensemencement et incubation**

Ajouter éventuellement de la Gentamicine ou du Chloramphénicol.

Homogénéiser et couler en boîtes de Petri stériles.

Transférer l'échantillon à analyser et étaler à l'aide d'un étaleur stérile.

Incuber à 32°C ± 1°C pendant 3 à 7 jours.