



HAL
open science

Recherche de conditions de synthèses en flux continu et d'analyses rapides d'huile de tournesol ozonée pour la lutte antibactérienne contre les mammites

Julien Vinet

► To cite this version:

Julien Vinet. Recherche de conditions de synthèses en flux continu et d'analyses rapides d'huile de tournesol ozonée pour la lutte antibactérienne contre les mammites. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0040 . tel-04170634

HAL Id: tel-04170634

<https://theses.hal.science/tel-04170634v1>

Submitted on 25 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. JULIEN VINET

le mercredi 14 avril 2021

Titre :

Recherche de conditions de synthèses en flux continu et d'analyses rapides d'huile de tournesol ozonée pour la lutte antibactérienne contre les mammites

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU

MME ANNE CALMON

Rapporteurs :

M. FLORENT ALLAIS, AGROPARISTECH

M. VINCENT CHALEIX, UNIVERSITE DE LIMOGES

Membre(s) du jury :

MME MARIE-HÉLÈNE MANERO, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

M. DOMINIQUE BERGONIER, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Invité(e)

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU, EI PURPAN, Membre

MME ANNE CALMON, EI PURPAN, Membre

MME MARIELLE PAGES-HOMS, EI PURPAN, Invité(e)

M. YANNICK POUILLOUX, UNIVERSITE DE POITIERS, Membre

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants Anne CALMON et Frédéric VIOLLEAU pour m'avoir donné la possibilité de prendre part à ce projet. J'ai eu la chance d'apprendre énormément d'un point de vue professionnel que ce soit par nos différents échanges, par la grande liberté accordée sur la gestion du projet ou pour avoir participé de près ou de loin à différents projets annexes.

Je remercie l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et la région Occitanie qui ont cofinancé l'ensemble du projet.

Je remercie aussi Marie-Hélène MANERO, Yannick POUILLOUX, Florent ALLAIS et Vincent CHALEIX pour avoir eu l'amabilité de bien vouloir juger mon travail et de constituer ainsi mon jury de thèse.

Merci aussi à Marielle PAGES-HOMS et Dominique BERGONNIER pour leurs conseils avisés et pour avoir accepté de participer à la constitution de mon jury de thèse en tant qu'invités.

Je tiens aussi à remercier les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire et que j'ai rencontrées pendant ces trois années. Pour un bon nombre, ces personnes sont devenues bien plus que des collègues ou des personnes avec qui nous avons partagé un open-space. Un remerciement tout particulier à Mireille et Coralie, parce qu'elles le méritent, tout simplement !

Une pensée à Maxime PINGRET, qui a été mon stagiaire lors de l'été 2020 au laboratoire et qui m'aura apporté beaucoup (beaucoup) d'aide et qui s'est parfaitement adapté à la situation.

Enfin, un grand merci à tous les amis qui ont été présents pendant toutes ces années, ainsi qu'à ma famille pour le soutien obtenu quand c'était nécessaire.

RESUME

Les huiles végétales ozonées sont étudiées depuis des années pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Ce produit biosourcé est issu de la réaction de l’ozone, un gaz oxydant puissant, sur un large spectre d’huile végétale. Avec une action microbiologique avérée sur un grand nombre de souches bactériennes et champignons, les huiles ozonées se présentent comme une véritable alternative naturelle à l’utilisation d’antibiotiques pour certaines pathologies. Il a été démontré que les propriétés du produit obtenu sont liées aux conditions de réaction et seule une synthèse en batch est possible à ce jour. De plus, les analyses pour caractériser ce produit sont longues, fastidieuses et nécessitent l’emploi d’une grande quantité de produits chimiques dangereux.

L’objectif de ces travaux était d’optimiser les méthodes de synthèses et d’analyses de l’huile de tournesol ozonée afin de produire efficacement un produit bioactif capable d’agir contre une pathologie d’intérêt en agronomie : les mammites.

Dans un premier temps, des mélanges ternaires huile de tournesol/eau/acide nonanoïque ont été étudiés. L’ajout d’eau et/ou d’acide permet de modifier les propriétés physiques du mélange tout en conservant des propriétés chimiques intéressantes voire de les améliorer. Des produits finis fluides avec des propriétés chimiques similaires à des produits pâteux tels que décrits dans la littérature ont pu être synthétisés. Cette viscosité faible est une caractéristique physique importante qui permet d’envisager une synthèse innovante en microréacteur. A ce jour, il s’agit d’une première preuve de concept pour l’ozonation d’huile végétale en flux continu.

Les méthodes de référence pour la mesure de l’indice d’iode et de l’indice de peroxyde sont longues, coûteuses, destructrices et consommatrices de nombreux produits chimiques. Des méthodes d’analyses alternatives ont été recherchées. La mise en relation des analyses chimiques sur les huiles ozonées avec des mesures spectrales dans le domaine de l’infrarouge a permis d’établir des modèles de prédiction. Cette technologie, après une phase de calibration spécifique, permet de quantifier rapidement les indices désirés. Il est même possible d’envisager utiliser cette méthodologie au sein d’un réacteur ou en sortie de ligne lors d’une synthèse en

flux continu. Ainsi, des informations sur les paramètres chimiques d'un mélange en temps réel seraient obtenues.

Enfin, la mammite est une inflammation de la mamelle, le plus souvent, en réponse à une invasion d'origine bactérienne, qui impacte la santé de l'animal et la qualité du lait. Il a été montré l'intérêt de l'huile de tournesol ozonée pour lutter contre les mammites, qui se présente comme une alternative à l'utilisation abusive d'antibiotiques. Plus d'une centaine de souches bactériennes isolées de cas déclarés de mammites chez les brebis ont été soumises à de l'huile de tournesol ozonée. L'effet antibactérien du produit a été mesuré et les profils d'antibiorésistances des souches ont été déterminés. Il a été démontré l'efficacité du produit contre l'ensemble des souches y compris sur un grand nombre de souches multirésistantes. Ces résultats permettent de conclure que l'utilisation de l'huile de tournesol ozonée se présente comme une alternative efficace pour remédier au phénomène de résistance bactérien sans cesse en évolution. Cependant, il serait intéressant de valider ces résultats sur le vivant afin d'évaluer l'efficacité *in-vivo* de ces huiles ozonées.

Mots clés : ozone, huile de tournesol, huile ozonée, solvant, spectroscopie infrarouge, activité antibactérienne.

ABSTRACT

Ozonated vegetable oils have been studied for years for their antibacterial and antifungal properties. This bio-sourced product is the result of the reaction of ozone, a powerful oxidising gas, with a wide spectrum of vegetable oils. With a proven microbiological action on many bacterial strains and fungi, ozonated oils are a real natural alternative to the use of antibiotics for certain pathologies. It has been shown that the properties of the product obtained are linked to the reaction conditions and only batch synthesis is possible to date. Moreover, the analyses to characterise this product are long, tedious and require the use of a large quantity of dangerous chemicals.

The aim of this work was to optimise the methods of synthesis and analysis of ozonated sunflower oil to efficiently produce a bioactive product capable of acting against a pathology of interest in agronomy: mastitis.

Initially, ternary sunflower oil/water/nonanoic acid mixtures were studied. The addition of water and/or acid makes it possible to modify the physical properties of the mixture while maintaining or even improving its chemical properties. Fluid end products with chemical properties like pasty products as described in the literature could be synthesised. This low viscosity is an important physical characteristic which makes it possible to envisage an innovative synthesis in a microreactor. To date, this is the first proof of concept for the continuous flow ozonation of vegetable oil.

Subsequently, an optimisation of the analysis methods was envisaged by looking for alternative characterisations. The linking of chemical analyses on ozonated oils with spectral measurements in the infrared range made it possible to establish prediction models. The reference methods for measuring the iodine and peroxide indices are long, costly, destructive, and consuming many chemicals. Infrared technology, after a specific calibration phase, allows the desired indices to be quickly quantified. It is even possible to consider using this methodology online at the output of a continuous flow synthesis or in a specially designed reactor in the laboratory, and thus obtain information on the chemical parameters of a mixture in real time.

Finally, mastitis is an inflammation of the udder, most often in response to an invasion of bacterial origin, which affects the health of the animal and the quality of the milk. Ozonated sunflower oil has been shown to be useful in the fight against mastitis as an alternative to the overuse of antibiotics. More than a hundred bacterial strains isolated from reported cases of mastitis in sheep have been subjected to ozonated sunflower oil. The antibacterial effect of the product was measured, and the antibiotic resistance profiles of the strains were determined. The efficacy of the product was demonstrated against all strains including many multi-resistant strains. These results lead to the conclusion that the use of ozonated sunflower oil presents itself as an effective alternative to remedy the phenomenon of constantly evolving bacterial resistance. However, it would be interesting to validate these results on living organisms to evaluate the in-vivo efficiency of these ozonated oils.

Key words: ozone, sunflower oil, ozonated oil, solvent, infrared spectroscopy, antibacterial activity.

LISTE DES ABREVIATIONS

AN	acide nonanoïque
ATCC	american type culture collection
ATR	réflectance totale atténuée
AV	acidité
BCC	bouille cœur-cervelle
C	carbone
CCSI	comptage cellulaire somatique individuelle
CIP	collection de l'Institut Pasteur
CMI	concentration minimale inhibitrice
CMI50	concentration minimale inhibitrice pour inhiber 50% d'une population de souches
CMI90	concentration minimale inhibitrice pour inhiber 90% d'une population de souches
CMT	california mastitis test
COSY	correlation spectroscopy
CPG	chromatographie en phase gazeuse
DS	déviatoin standard
FT-IR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
H	hydrogène
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	chromatographie liquide haute performance
I	iode
II	indice d'iode
IP	indice de peroxyde
IT	insaturation totale
KI	iodure de potassium
LM	linoléate de méthyle
MALDI - TOF	matrix assisted laser desorption ionization - time of flight
méq	milliéquivalent
MIR	moyen infrarouge
MSC	normalisation standard du vecteur
MTBE	méthyl tert-butyl éther
NIR	near-infrared
O	oxygène
OM	oléate de méthyle
P	produit
pH	potentiel hydrogène
PLS	Partial Least Squares

ppm	partie par million
PS	polystyrène
RI	indice de réfraction
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMSE	erreur quadratique moyenne
RPD	déviations prédictive résiduelle
rpm	rotation par minute
S	soufre
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
SNV	normalisation standard du vecteur
ST-IR	spectra-tech infrared
TA	température ambiante
TAG	triglycérides
THO	très haute teneur en chaîne oléique
TMS	tétraméthylsilane
TMSH	triméthylsulphonium hydroxyde
UA	unité d'absorbance
UFC	unité formant colonie
UV	ultraviolet
Vis	visible

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I – ETAT DE L’ART	5
<u>I.1 L’huile ozonée pour la lutte contre des pathologies infectieuses</u>	7
I.1.1 Les propriétés antibactériennes de l’huile ozonée	7
I.1.2 Une application dans le domaine agricole : le traitement des mammites	12
I.1.2.1 Présentation de la pathologie	12
I.1.2.2 Les méthodes actuelles de prévention et traitements des mammites	13
<u>I.2 La synthèse des huiles ozonées</u>	16
I.2.1 La matière première : les huiles végétales	16
I.2.1.1 Généralités sur les huiles végétales	16
I.2.1.2 Cas particulier de l’huile de tournesol	18
I.2.2 La réaction d’ozonation des huiles végétales	18
I.2.2.1 Le réactif oxydant : l’ozone	18
I.2.2.1 Le mécanisme réactionnel de la réaction d’ozonation	20
I.2.3 Les conditions opératoires de synthèses des huiles ozonées	23
<u>I.3 La caractérisation des huiles ozonées</u>	25
I.3.1 Les caractérisations chimiques	25
I.3.1.1 Mesure de la quantité d’insaturations	25
I.3.1.2 Détermination de l’indice de peroxyde	26
I.3.1.3 Détermination de l’acidité	27
I.3.1.4 Suivi de la formation de formaldéhyde	29
I.3.1.5 Mesure de la viscosité	29
I.3.2 Les caractérisations spectrales	30
I.3.2.1 La RMN ¹ H et ¹³ C	30
I.3.2.2 La chromatographie en phase gazeuse	31
I.3.2.3 La chromatographie liquide	32
I.3.2.4 La spectroscopie infrarouge	32
I.3.3 La stabilité des huiles ozonées	35
<u>I.4 Conclusion et objectifs de la thèse</u>	36
CHAPITRE II – MATERIELS ET METHODES	39
<u>II.1 Les réactifs utilisés</u>	41
<u>II.2 L’ozonation des matières grasses</u>	42
II.2.1 Ozonation en réacteur semi-continu	42

II.2.1.1 Description du montage	42
II.2.1.2 Le générateur d’ozone	42
II.2.1.3 Le réacteur d’ozonation	43
II.2.1.4 Les analyseurs d’ozone	43
II.2.1.5 Destruction de l’ozone résiduel	44
II.2.1.6 Conditions opératoires standards	44
II.2.2 Cas particulier de la synthèse en flux continu	44
<u>II.3 Les plans d’expériences</u>	45
II.3.1 Plan de Doelhart à deux facteurs	46
II.3.2 Plan de surface de réponse étendu	49
<u>II.4 Les caractérisations chimiques</u>	50
II.4.1 Détermination de l’indice d’iode	50
II.4.2 Détermination de l’indice de peroxyde	51
<u>II.5 Les caractérisations spectrales</u>	53
II.5.1 La chromatographie en phase gazeuse	53
II.5.2 La spectroscopie moyen infrarouge	54
II.5.3 La spectroscopie proche infrarouge	56
<u>II.6 Les outils de chimiométrie</u>	58
<u>II.7 L’évaluation de l’activité antibactérienne</u>	60
II.7.1 Le prélèvement et l’identification des souches	60
II.7.2 La mise en culture des bactéries	60
II.7.3 La détermination des CMI’s	61
II.7.4 La réalisation des antibiogrammes	62
CHAPITRE III – ETUDE DE L’IMPACT DE SOLVANTS SUR LA CINÉTIQUE ET LA NATURE DES PRODUITS SYNTHÉTISÉS	65
<u>III.1 Détermination des solvants et du domaine expérimental</u>	68
III.1.1 Recherche d’un effet de dilution : ajout d’acide nonanoïque	68
III.1.2 Synthèse de composés oxygénés en milieu protique : ajout d’eau et d’acide nonanoïque	69
III.1.3.1 Détermination du domaine expérimental de la quantité d’eau	73
III.1.3.2 Détermination du domaine expérimental de la quantité d’acide nonanoïque	74
<u>III.2 Utilisation des plans d’expériences pour identifier l’impact des solvants</u>	74
III.2.1 Plan de Doelhart à 2 facteurs	74
III.2.1.1 Détermination des modalités expérimentales pour le plan de Doelhart	75
III.2.1.2 Réponses obtenues et détermination des coefficients de Doelhart	76
III.2.1.3 Fiabilité des modèles de prédiction développés avec le plan de Doelhart	78

III.2.1.3.1	Modèle de prédiction de l'indice d'iode à l'aide du plan de Doelhart.....	79
III.2.1.3.2	Modèle de prédiction de l'indice de peroxyde à l'aide du plan de Doelhart	80
III.2.1.4	Analyse des variances pour le plan de Doelhart.....	81
III.2.2	Plan de surface de réponse étendu	83
III.2.2.1	Détermination des modalités expérimentales pour le plan de surface étendu.	83
III.2.2.2	Réponses obtenues et détermination des coefficients pour le plan de surface étendu	84
III.2.2.3	Fiabilité des modèles de prédictions pour le plan de surface étendu	86
III.2.2.3.1	Modèle de prédiction de l'indice d'iode pour le plan de surface étendu	86
III.2.2.3.2	Modèle de prédiction de l'indice de peroxyde pour le plan de surface étendu	88
III.2.2.4	Analyse des variances pour le plan de surface étendu	89
III.2.3	Illustrations de l'effet des facteurs sur les différentes propriétés du mélange	90
III.2.3.1	Effets des facteurs sur l'indice d'iode	90
III.2.3.2	Effets des facteurs sur l'indice de peroxyde.....	92
III.2.3.3	Effets des facteurs sur la consommation de l'ozone	93
III.2.3.4	Effets des facteurs sur la viscosité du mélange	95
III.2.3.5	Effets des facteurs sur les propriétés antibactériennes	97
III.3	Essais préliminaires de synthèse au flux continu	100
III.3.1	Détermination d'une composition de mélange pour envisager une synthèse en flux continu	100
III.3.2	Etude sur le microréacteur Low-Flow de Corning	102
III.3.2.1	Spécificités de l'appareil	102
III.3.2.2	Conditions opératoires appliquées pour la synthèse en flux continu	103
III.3.2.3	Résultats obtenus pour les essais de synthèse en flux continu	105
III.3.2.3.1	Analyse de la réaction entre l'ozone et les insaturations.....	105
III.3.2.3.2	Analyse de la formation d'espèces oxygénées	106
III.3.3	Comparaison entre le flux continu et le procédé semi-continu	107
III.4	Conclusion	108
CHAPITRE IV – MISE AU POINT D'UNE METHODE DE PREDICTION D'INDICES CHIMIQUES PAR ANALYSES SPECTRALES		
IV.1	Les échantillons de référence pour l'étude	115
IV.1.1	Caractérisations des matières premières utilisées	115
IV.1.1.1	Composition des matières premières	115
IV.1.1.2	Analyses des matières premières avant ozonation	115

IV.1.2 Conditions opératoires appliquées pour l'étude	117
IV.1.3 Caractérisations chimiques des échantillons synthétisés	119
IV.1.3.1 Détermination de l'indice d'iode	119
IV.1.3.2 Détermination de l'indice de peroxyde	122
IV.1.3.3 Fiabilité de la méthode	124
<u>IV.2 Analyses spectrales des échantillons synthétisés</u>	125
IV.2.1 Analyses par spectroscopie moyen infrarouge	125
IV.2.2 Analyses par spectroscopie proche infrarouge	127
<u>IV.3 Prédiction des indices chimiques par spectroscopie infrarouge</u>	128
IV.3.1 Mise au point des modèles de prédiction	128
IV.3.2 Prédiction des indices chimiques à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge	130
IV.3.2.1 Prédiction de l'II à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge.....	130
IV.3.2.2 Prédiction de l'IP à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge.....	131
IV.3.2.3 Bilan de l'étude utilisant la spectroscopie moyen infrarouge	132
IV.3.3 Prédiction des indices chimiques à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge	134
IV.3.3.1 Prédiction de l'II à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge.....	134
IV.3.3.2 Prédiction de l'IP à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge.....	135
IV.3.3.3 Bilan de l'étude utilisant la spectroscopie proche infrarouge	136
<u>IV.4 Conclusion</u>	136
CHAPITRE V – EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HUILES OZONEES POUR LUTTER CONTRE LES MAMMITES	141
<u>V.1 Création d'une base de données représentative de l'étiologie des mammites</u>	144
V.1.1 Détermination des souches qui vont constituer la base de données	144
V.1.2 Les critères de classification des souches	145
V.1.2.1 Les principaux réservoirs	145
V.1.2.2 Le pouvoir pathogène des souches	146
V.1.3 Le classification obtenue pour notre base de données	146
<u>V.2 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)</u>	147
V.2.1 Préparation de l'échantillon d'huile ozonée	147
V.2.2 Répétabilité et répartition des CMI	148
V.2.3 Influence des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques	149
V.2.3.1 Influence des caractéristiques intrinsèques des bactéries : coloration de Gram	149
V.2.3.2 Influence du réservoir d'origine des bactéries	152

V.2.3.3 Influence du type de pathogénicité.....	152
V.2.3.4 Bilan sur l'efficacité de l'huile ozonée.....	153
<u>V.3 Détermination de l'antibiorésistance et analogie avec l'activité antibactérienne de l'huile ozonée</u>	157
V.3.3.1 Relation entre les CMI et la sensibilité aux antibiotiques	163
V.3.3.2 Cas des souches sensibles aux antibiotiques	165
V.3.3.3 Cas des souches résistantes aux antibiotiques	166
<u>V.4 Conclusion</u>	168
CHAPITRE VI – CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	171
TABLE DES ILLUSTRATIONS	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187
ANNEXES	205
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	215

INTRODUCTION GENERALE

L'intérêt de la recherche sur l'effet thérapeutique de produits biosourcés s'est considérablement accru au cours des cinquante dernières années et les produits végétaux ont vu leur utilisation se généraliser dans le domaine de la microbiologie. Bien qu'il existe un certain nombre de nouvelles approches thérapeutiques basées sur les plantes médicinales et leurs extraits, l'utilisation des huiles est de plus en plus envisagée, notamment pour leur effet antimicrobien. Cette nouvelle tendance est due à la fois à la propagation croissante de micro-organismes résistants aux agents antimicrobiens classiques et à l'augmentation des études sur l'activité antimicrobienne des produits naturels. Une résistance aux médicaments peut survenir lorsque les bactéries et les levures subissent une mutation rapide, notamment des modifications des protéines de la membrane cellulaire. Elles ne sont alors plus reconnaissables par les médicaments. La plupart de ces produits biosourcés contiennent des centaines de principes actifs naturels dans des proportions variables, ce qui réduit fortement le phénomène d'antibiorésistance. En effet, les micro-organismes ne sont plus capables de s'adapter à des structures hétérogènes.

Les propriétés thérapeutiques des huiles, et notamment de l'huile d'olive, sont connues depuis des millénaires. Hippocrate préconisait l'utilisation de jus d'olive pour soigner les maladies mentales et guérir les ulcères. Au Moyen-Âge, l'huile d'olive était utilisée pour soigner les infections gynécologiques. D'un point de vue dermatologique, l'huile a également prouvé une activité antibactérienne dans les infections cutanées, que ce soit sur les bactéries à coloration de Gram positives (*Staphylococcus aureus*), bactéries à coloration de Gram négatives et diverses espèces de champignons comme *Candida spp.* De ce fait, l'huile d'olive rentre dans la composition d'un nombre de produits à utilisation topique dans le traitement d'inflammations (Ugazio 2020).

Il a été démontré qu'il est possible d'améliorer les propriétés des huiles en les faisant réagir avec l'ozone. En effet, l'ozone est reconnu pour ses propriétés bactéricides, antivirales et antifongiques. Il est utilisé de manière empirique comme agent thérapeutique. L'ozone est un oxydant puissant, qui permet la destruction des parois cellulaires des bactéries et des membranes cytoplasmiques, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité et donc l'accès aux molécules d'ozone dans les cellules. Dans le but d'améliorer l'action de l'ozone, qui possède une durée de demi-vie faible, il est possible de faire réagir l'ozone sous forme gazeux

avec d'autres composés chimiques permettant la formation de dérivés oxydés. Avec la présence d'insaturations au sein de leur composition chimique, les huiles et les matières grasses animales et végétales possèdent une bonne réactivité avec l'ozone gazeux. Les premières réactions ont été décrites par Fenaroli en 1906, tandis que les propriétés antifongiques des composés, notamment sur les inflammations cutanées n'ont été décrites que vers 1934. Les huiles végétales ozonées ont depuis été évaluées pour leur activité antibactérienne et antifongique, leur utilisation dans les traitements topiques de la peau (dermatologie) et une efficacité particulière dans la cicatrisation des plaies cutanées, et au cours de ces dernières années, ces études sont de plus en plus nombreuses.

Les huiles ozonées se présentent donc comme une alternative biosourcée intéressante pour la lutte antibactérienne. Son action a été démontrée contre de nombreuses bactéries, avec notamment une étude très complète sur plus de 250 souches. Cette étude a notamment démontré l'efficacité de ce produit contre *S. aureus*, *E. coli* et *S. uberis*. En se basant sur cette étude, nous avons développé des recherches pour cibler l'action des huiles ozonées sur certaines pathologies particulières, par exemple les mammites. Cette pathologie, qui consiste à une inflammation du tissu de la glande mammaire, présente une réelle problématique dans le domaine de la production laitière. En effet, les mammites ont un impact sur la qualité et la production du lait ainsi que sur la santé des animaux. Pour répondre au phénomène d'antibiorésistance et trouver des alternatives aux traitements actuels, il a été envisagé l'utilisation des huiles ozonées. Pour affirmer le potentiel d'utilisation des huiles ozonées contre les mammites, il est nécessaire de réaliser une étude sur un panel complet et représentatif de la pathologie.

Pour répondre à la demande croissante en huile ozonée, il peut être intéressant d'envisager une synthèse sur des quantités industrielles. Actuellement, les protocoles en réacteurs semi-continus à l'échelle du laboratoire sont maîtrisés. En ce qui concerne l'échelle industrielle, on utilise la réaction de l'ozone sur des insaturations, notamment sur l'acide oléique, pour synthétiser des acides azélaïque et nonanoïque. Une voie de synthèse à l'échelle industrielle peut être envisagée pour les huiles, en rupture avec les traditionnels procédés semi-continus, dans l'utilisation de systèmes microfluidiques. Cette technologie permet d'intensifier et de rendre plus accessible certaines réactions comportant des risques comme des réactions possédant un caractère exothermique. La synthèse peut être menée en continu avec de faibles quantités de réactifs et une évacuation de la chaleur pour une meilleure efficacité de la réaction tel que l'on pourrait l'envisager pour la réaction exothermique entre l'huile et l'ozone. De plus,

les microréacteurs répondent à une stratégie de développement de procédés durables, plus respectueux de l'environnement et des hommes et plus rentable. Enfin, cet outil à l'avantage de posséder des conditions opératoires facilement transposables de l'échelle du laboratoire vers une production industrielle.

Pour finir, l'utilisation de la spectroscopie infrarouge est envisageable pour déterminer la composition d'un mélange issu de l'ozonation d'une huile végétale. En effet, il est possible de prédire certains paramètres chimiques d'une huile (indice d'iode, indice de peroxyde) à l'aide du spectre d'absorption dans la gamme du moyen infrarouge ou du proche infrarouge. De plus, l'analyse par proche infrarouge en sortie d'un réacteur en flux continu pour le suivi de la transestérification d'huiles végétales a déjà été réalisé avec de bons résultats. Il est donc tout à fait possible d'envisager cette technique pour suivre l'évolution de la composition des huiles ozonées, et de combiner ces analyses à la technologie d'un microréacteur. Enfin, cette méthode d'analyse offre aussi les avantages d'être rapide, non destructive pour l'échantillon analysé et limitante sur l'usage de solvants chimiques contrairement aux méthodes de référence utilisées actuellement (dosages volumétriques).

Ainsi, ce travail de thèse va s'orienter autour de six chapitres. Le premier chapitre dressera un état de l'art concernant la synthèse des huiles ozonées, leurs caractérisations et leurs propriétés antibactériennes.

Le deuxième chapitre fera état des différents outils et méthodes utilisés durant l'ensemble des travaux.

Une étude de la réactivité en réacteur semi-continu d'un mélange ternaire, composé d'huile et de deux solvants, avec de l'ozone gazeux sera menée dans le troisième chapitre. Cette étude aura pour objectif d'observer l'influence de la quantité des additifs sur les propriétés physiques, chimiques et microbiologiques. La finalité de cette étude sera de déterminer une composition optimale permettant d'envisager une transposition vers une synthèse d'huile ozonée sur un procédé en flux continu.

Le quatrième chapitre consistera à développer des modèles de prédiction d'indices chimiques à l'aide d'analyses spectrales. Cette méthodologie rapide et innovante dans le domaine des huiles ozonées permet de se substituer à l'utilisation abusive de produits

chimiques. De plus, la technologie utilisée peut s'adapter à différents procédés de synthèses que ce soit en sortie de ligne sur un procédé en continu ou au sein d'un réacteur semi-continu spécialement conçu. On peut ainsi envisager d'obtenir des informations sur la composition du milieu réactionnel en temps réel.

Le cinquième chapitre se composera d'une étude approfondie de l'effet antibactérien d'une huile ozonée sur une pathologie d'intérêt : les mammites. L'huile ozonée sera testée face à un panel de souches exhaustif représentatif de la pathologie. Ce panel complet prendra aussi en compte diverses pathologies. En parallèle, l'antibiorésistance des souches sera déterminée pour réaliser une analogie entre le potentiel des huiles ozonées et l'utilisation d'antibiotiques.

Enfin, une conclusion générale des travaux et les perspectives envisagées dans les différents domaines seront établies dans le sixième chapitre.

CHAPITRE I – ETAT DE L'ART

I.1 L'huile ozonée pour la lutte contre des pathologies infectieuses

I.1.1 Les propriétés antibactériennes de l'huile ozonée

Les pathologies infectieuses chez l'homme et chez l'animal sont causées par des bactéries, des champignons, des parasites ou des virus. L'utilisation d'antibiotiques est préconisée pour traiter les infections bactériennes mais de plus en plus de bactéries résistent à ces traitements, certaines peuvent même être qualifiées de « multirésistantes ». Ce phénomène d'antibiorésistance a entraîné des problèmes sanitaires majeurs au niveau mondial. Pour freiner ce problème, de nombreuses équipes sont en quête d'alternatifs aux antibiotiques et notamment dans le domaine des agroressources.

Il est connu depuis des temps anciens le potentiel antimicrobien des huiles végétales. L'huile d'olive était utilisée pour soigner les maladies mentales, guérir les ulcères ou apaiser les infections gynécologiques. Il a été prouvé l'efficacité de l'huile d'olive pour une application dermatologique sur les infections cutanées. On constate notamment l'action de l'huile sur des bactéries gram-positives (*Staphylococcus aureus*), des bactéries gram-négatives (*Escherichia coli*) et même sur des espèces de champignons comme *Candida spp* (Al-Waili et al. 2006, Baumann et al. 2007). Ces propriétés ont été mises à profit et l'huile d'olive rentre désormais dans la composition de nombreux produits thérapeutiques pour une application topique, notamment dans le traitement d'inflammations (Sechi et al. 2001).

Bien que l'huile végétale présente un intérêt dans son état initial, il a été envisagé la réaction de l'ozone sur les huiles pour synthétiser des huiles ozonées. L'ozone est reconnu pour ses propriétés bactéricides, antivirales et antifongiques (Martinez et al. 2005, Smith et al. 2017). La réaction de cet oxydant puissant sur les huiles permet d'améliorer les propriétés antibactériennes de ce produit biosourcé. Les premières tentatives de synthèse remontent au début du XX^{ème} siècle (Fenaroli et al. 1906). Cependant, l'activité antifongique, notamment sur les inflammations cutanées, n'a été démontrée que plusieurs dizaines d'années plus tard (Harada 1934). L'évaluation des propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles ozonées reste un sujet contemporain (Menendez et al. 2011, De Almeida et al. 2016), et l'utilisation de ces propriétés pour des applications diverses est largement étudiée (Valacchi et al. 2013, Zeng et al. 2018).

On trouve sur le marché plusieurs produits issus d'huiles végétales ozonées qui possèdent une activité antibactérienne. Les huiles les plus fréquemment utilisées sont l'huile d'olive et l'huile de tournesol, mais il existe des brevets pour une vingtaine d'huiles de différentes origines (Travagli et al. 2009). On peut ainsi noter la possibilité d'utiliser comme matière première de l'huile issue du thym, du sésame, du soja, de la noix de coco, du pépin de raisin parmi d'autres. Du fait qu'il n'existe pas de conditions de synthèses standardisées, il est difficile d'estimer et de comparer la relation entre coûts et bénéfices de ces différentes huiles. Il existe cependant de nombreux produits qui ont prouvé leur intérêt (Tableau 1).

Tableau 1. Exemples de produits commerciaux issus d'huile ozonée (Ugazio, 2020)

Désignation commerciale	Matière première	Pays de production
Ozonia 3000® Oleozon	Huile de tournesol	Italie Cuba
O2-ZAP® OOO	Huile d'olive	Canada USA
Cocozone oil	Huile de noix de coco	Grande-Bretagne

Actuellement, les produits à base d'huiles végétales ozonées sont utilisés pour des applications externes avec pour objectif la prévention et le traitement de diverses pathologies de la peau (Zeng et al. 2018). L'éventail de ces pathologies cutanées traitées est ciblé sur des maladies bénignes (Tableau 2).

Tableau 2. Exemples de pathologies ciblées par les huiles ozonées

Types de pathologie	Pathologies traitées	Références
Infection de la peau	Abcès Pied d'athlète	Bialoszewski 2011, Zanardi 2013, Ouf 2016, Ozturk 2017
Allergie	Eczéma Urticaire Prurigo	Jenerowicz 2012, Gershwin 2015
Erythémateuse et squameuse	Psoriasis Pustulose palmoplantaire	Dia Paolo 2005, Bocci 2015
Autre	Cicatrisatin des plaies Guérison des ulcères	Borges 2017

Les applications thérapeutiques étant diverses, il existe différentes formes galéniques pour le produit fini à base d'huile ozonée. On trouve donc des pommades, des gels ou bien encore des sprays. Les différentes galéniques vont pouvoir s'adapter par exemple à un traitement de la peau en gel pour stimuler la cicatrisation (De Almeida et al. 2016) ou un spray pour le traitement de l'acné, l'herpès, du psoriasis ou des infections fongiques (Carata et al. 2019).

En plus de cibler un grand nombre de pathologies, des études ont déterminé l'efficacité des huiles ozonées contre des souches particulières en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI). L'étude avec le plus large spectre de souches a été réalisée sur l'huile ozonée Oleozon®. Ce sont plus de 250 souches dont certaines multirésistantes qui ont été testées (Sechi et al. 2001). Les souches choisies appartiennent à 27 espèces bactériennes différentes et les valeurs des CMIs sont réparties entre 0,95 et 9,5 mg/mL (Tableau 3). La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'un agent antibactérien nécessaire pour inhiber toute croissance visible d'un microorganisme au cours d'une période définie et dans des conditions contrôlées (CLSI 2012). En comparaison, les données obtenues pour certains antibiotiques sont de l'ordre du µg/mL. Les valeurs obtenues pour l'huile ozonée apparaissent donc élevées cependant ce produit constitue un mélange très complexe.

Ces résultats ont été confirmés récemment, à la fois sur des bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) et sur des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *Micrococcus luteus*) (Serio et al. 2017). De plus, on observe un effet antibactérien de l'Oleozon® sur des parasites protozoaires tels que *Giardia duodenalis* et *Leishmania major* (Hernandez et al. 2009). Ce produit est aussi considéré comme une meilleure alternative que le kétoconazole, un principe actif notamment utilisé pour le traitement des onychomycoses et ne présente aucun risque d'effets indésirables (Rajabi et al. 2015). Des études *in vivo* ont montré que les huiles ozonées pouvaient guérir des lésions cutanées graves causées par *S. aureus*, mais également par des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (Song et al. 2018). La guérison est fréquente entre en un ou deux mois, avec des effets secondaires limités. Les huiles ozonées ont aussi été comparées à divers antibiotiques, tels que la kanamycine, l'érythromycine, la gentamicine et le chloramphénicol. Il a en effet été démontré que l'huile de coco permettait de limiter plus efficacement la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 que les antibiotiques précédemment cités (Diaz et al. 2005).

Tableau 3. Valeurs des CMI des différentes souches étudiées par Sechi et.al (2001)

Groupe bactérien	Espèce/Souche	CMI (mg/mL)
Enterococci	<i>Ent. hirae</i> ATCC 9790	9,5
	<i>Ent. faecalis</i> ATCC 35038	9,5
	<i>Ent. faecium</i> ATCC 19474	9,5
	<i>Ent. gallinarum</i> ATCC 49573	2,37
	<i>Ent. casseliflavus</i> ATCC 25778	9,5
	<i>Ent. maleodoratus</i> ATCC 43197	4,75
	<i>Ent. durans</i> ATCC 19432	9,5
	<i>Ent. solitarius</i> ATCC 49428	9,5
	<i>Ent. pseudoavium</i> ATCC 49472	9,5
	<i>Ent. avium</i> ATCC 14025	9,5
	<i>Ent. saccharolyticus</i> ATCC 43076	9,5
	<i>Ent. mundtii</i> ATCC 43186	9,5
	<i>Ent. faecium</i> (21)	1,18 – 9,5
	<i>Ent. faecalis</i> (10)	4,75 – 9,5
Streptococci	<i>Strep. pyogenes</i> (40)	2,37 – 9,5
Staphylococci	<i>Staph. aureus</i> ATCC 29213	9,5
	<i>Staph. epidermidis</i> ATCC 14990	2,37
	<i>Staph. aureus</i> (50)	2,37 – 9,5
	<i>Staph. epidermidis</i> (19)	2,37 – 9,5
Mycobactéries	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv	0,95
	<i>M. smegmatis</i> mc155	0,95
	<i>M. abscessus</i> (1)	2,37
	<i>M. aurum</i> (1)	0,95
	<i>M. avium</i> (2)	2,37
	<i>M. fortuitum</i> (2)	0,95 – 2,37
	<i>M. chelonae</i> (2)	2,37
	<i>M. tuberculosis</i> (1)	0,95
<i>M. tuberculosis</i> MDR (2)	0,95 – 2,37	
Autres bactéries	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4,75
	<i>E. coli</i> XL1	1,18
	<i>E. coli</i> (40)	1,18 – 9,5
	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	4,75
	<i>Ps. aeruginosa</i> (40)	4,75 – 9,5

Contrairement à l'ozonothérapie qui connaît plusieurs effets secondaires (Fitzpatrick et al. 2018), la littérature révèle très peu d'effets néfastes des huiles ozonées sur la santé. Une étude récente met en évidence des cas d'irritations et des réactions allergiques causés par l'application topique de pommades à base d'huile ozonée (Aerts et al. 2016), mais dans un des cas, l'application est faite sur les lèvres, ce qui est vivement déconseillé car la muqueuse des

lèvres est pourvue d'une très fine couche cornée, ce qui en fait une zone plus sensible à l'action irritante des huiles et dont l'effet est plus prononcé avec l'ajout d'ozone.

La diversité des domaines d'applications des huiles ozonées ne cesse de croître. On trouve par exemple la présence de ce produit dans la composition de formulations cosmétiques comme des crèmes, des shampooings, des baumes à lèvres ou des lotions pour le corps. Le domaine médical se diversifie avec l'utilisation des huiles ozonées en médecine bucco-dentaire (Tiwari et al. 2017, Monteiro et al. 2020). Un autre domaine d'application d'intérêt est la gynécologie avec notamment le traitement des infections vulvovaginales causées par *Candida spp.* (Tara et al. 2016). L'utilisation en traitement oculaire est aussi envisagée (Spadea et al. 2018). L'utilisation d'une formulation basée sur de l'huile de tournesol (Ozodrop®, FB Vision, Ascoli Piceno, Italie) est une alternative intéressante pour le traitement de troubles oculaires (conjonctivite ou kératite par exemple) avec des traitements envisagés chez les animaux et chez l'Homme, du fait des symptômes partagés (Baeyens et al. 2002). L'application d'Ozodrop® 3 à 4 fois par jour permet de contrôler la pathologie jusqu'à la disparition. De plus, les gouttes oculaires à base de formulation ozonée pourraient être utilisées comme préparation aux interventions chirurgicales intra- et extra-oculaires. Dans le domaine agricole, il a été montré l'intérêt d'utiliser des huiles ozonées pour lutter contre l'apparition de moisissures sur les plants. Par exemple, l'application d'Oleozone® sur les pousses de concombres permet d'améliorer les rendements de production et la qualité du produit fini (Ma et al. 2017). Enfin, dans le domaine vétérinaire, les huiles végétales ozonées peuvent également constituer un nouveau moyen de prévenir et/ou de traiter la mammite. Cette pathologie d'intérêt pour ce projet sera détaillée dans un second paragraphe.

Peu d'études permettent d'expliquer le mécanisme d'action des huiles ozonées. Il a été mis en évidence que l'huile de tournesol ozonée présente une action instantanée sur la viabilité de la bactérie dès qu'elle entre en contact avec elle (Curtiellas et al. 2008, Ledea Lozano et al. 2010). Il semblerait que l'action oxydative des huiles se situe au niveau des membranes de la cellule, sans déformer leur structure. Les cellules bactériennes exposées à Oleozone® ne montre pas d'altérations de l'ensemble de la paroi cellulaire quand on les observe au microscope. On remarque cependant une modification de certaines protéines membranaires, ce qui peut impacter la perméabilité de la membrane et entraîner une fuite du contenu cytoplasmique (Nagayoshi et al. 2004). Pour expliquer l'action antifongique des huiles ozonées, certaines

études émettent l'hypothèse de l'inhibition de l'élastase, une enzyme impliquée dans la virulence des champignons (Battinelli et al. 2006).

L'action de l'huile ozonée sur le développement de certains pathogènes a permis de cibler des pathologies particulières. Le développement des mammites dans le domaine agricole est notamment une étude ciblée de nos recherches.

I.1.2 Une application dans le domaine agricole : le traitement des mammites

I.1.2.1 Présentation de la pathologie

La notion de mammite est associée à une inflammation du tissu de la glande mammaire et de la mamelle chez les mammifères. En général, c'est une réponse immunitaire causée par une infection bactérienne. Nous pouvons distinguer deux catégories de mammites en fonction de l'apparition ou non de symptômes : les mammites cliniques ou subcliniques. De même, nous pouvons répartir les mammites cliniques en trois niveaux de gravités selon différents paramètres (Royster and Wagner 2015) : le cas de gravité léger peut s'associer à une production de lait visiblement anormal (apparition de caillots et flocons notamment), les mammites modérées voient l'apparition de gonflements ou de rougeurs sur le quartier concerné en plus du lait anormal, enfin les mammites dites sévères sont déterminées par l'observation de signes systémiques tels que la fièvre ou la déshydratation.

Malgré la présence de cette pathologie sur un bon nombre d'espèce animales, les animaux domestiques impliqués dans la production laitière sont les plus touchés (Barlow 2011). Ce phénomène peut s'expliquer par le contact facilité entre tous les animaux. On observe différents taux d'apparition des cas de mammites précédemment cités en fonction de différents paramètres (zone géographique, caractéristique de l'animal, etc.). Par exemple, on peut évaluer la prédominance des mammites subcliniques sur les vaches laitières entre 15 et 40% selon la zone géographique (Zhao et al. 2015). On observe aussi davantage de formes subcliniques de mammites, en opposition au forme clinique, chez les brebis et les chèvres (Bergonnier et al. 2003).

Les mammites ont un impact direct sur l'économie de l'exploitation : diminution de la production laitière, moindre valorisation du lait, davantage de travail pour l'éleveur, coût des traitements, etc. (Seegers, Fourichon et Beaudeau 2003). De multiples facteurs peuvent entraîner l'apparition de mammites dans les élevages (on parle de réservoir mammaire ou de réservoir environnemental par exemple) (Rattez et al. 2017), c'est pourquoi il est parfois difficile d'en identifier les causes. Depuis 2014, on observe une amélioration notable de la situation cellulaire des troupeaux laitiers français. Après les très bons résultats de 2016, l'amélioration continue en 2017, malgré un léger fléchissement de la baisse (Institut de l'Elevage). Cependant, c'est une infection qui entraîne toujours un manque à gagner, notamment avec des modifications de la composition du lait, ce qui limite le développement de la production laitière.

I.1.2.2 Les méthodes actuelles de prévention et traitements des mammites

La limitation de l'action des mammites peut se faire en deux étapes. Tout d'abord, à l'aide d'actions préventives. Elles interviennent notamment par le biais de bonnes pratiques d'élevage, (traite, paillage, aération...). Elles permettent d'éviter la contamination des trayons avant ou après la traite, mais aussi les contaminations entre les vaches (Williamson et Lacy-Hulbert 2013). Une fois que l'apparition de la mammite est observée, les actions préventives ne sont plus nécessaires. Les actions curatives entrent alors en jeu et ont pour but d'éliminer les infections. La mise en place de différents traitements existe en fonction de la mammite ciblée. Les mammites sont presque exclusivement d'origine bactérienne. Exceptionnellement, elles peuvent être causées par des champignons, des parasites, des agents chimiques, un traumatisme (comme un choc violent ou une agression de la peau du quartier ou du trayon) ou une sténose (engendrée par un dysfonctionnement de la machine à traire ou un papillome) (Remy et al. 2010). C'est pourquoi le traitement privilégié est l'utilisation d'antibiotiques. Le traitement a lieu immédiatement si la mammite est dite clinique. Différents paramètres peuvent influencer le traitement (voie d'administration, durée, etc.) en fonction de la gravité de l'inflammation. Dans le cas d'une mammite subclinique, le traitement peut s'opérer plus tardivement, notamment durant la lactation ou au tarissement par voie intra-mammaire. On améliore considérablement le taux de guérison en traitant précocement et en intervenant dès l'apparition des premiers symptômes. Il faut donc avoir recours aux antibiotiques au bon moment, et avec la bonne posologie. Les actions préventives et curatives imposent donc d'avoir recours à

l'utilisation d'importantes quantités de médicaments pour le contrôle des mammites (Trevisi et al. 2014).

Malgré la mise en place de ces deux phases d'actions, on observe toujours une prédominance des mammites, ce qui entraîne une utilisation abusive d'antibiotiques (Oliver, Murinda, et Jayarao 2011). On remarque alors l'apparition de résistances des souches ce qui peut donc avoir un impact sur la santé de l'animal mais aussi sur la qualité du lait. Ce phénomène d'antibiorésistance est donc un enjeu majeur de santé publique actuellement pour des raisons thérapeutiques, économiques et épidémiologiques. Il est logiquement nécessaire de limiter l'utilisation d'antibiotiques.

Il existe différentes techniques pour identifier les pathogènes responsables de l'infection (CCSI, test CMT, ou diagnostic bactériologique) (Dudouet et al. 2004, Rémy et al. 2010, Salat et al. 2014). Elles permettent de cibler avec précision l'espèce bactérienne impliquée. Il faut alors mettre en place le traitement antibactérien adapté avec pour objectif de réduire la quantité d'antibiotiques. Il est nécessaire de distinguer les nombreux micro-organismes qui sont responsables des mammites pour pouvoir adapter le traitement. On différencie deux groupes de pathogènes. Tout d'abord les pathogènes contagieux, par exemple les *Staphylococcus aureus* ou les espèces du genre *Mycoplasma*. Ils sont notamment présents dans les trayons des vaches infectées, que l'on peut considérer comme réservoir primaire. Pendant la traite, les pathogènes passent de quartiers en quartiers ou de mamelles à mamelles via l'intermédiaire des réservoirs secondaires (lavettes, manchons trayeurs, mains de l'éleveur), de plaies ou à cause du mauvais fonctionnement de la machine à traire (Institut de l'élevage 2008, Remy et al. 2010). Dans un second temps, nous pouvons cibler les pathogènes environnementaux, tels que les coliformes ou les streptocoques (Oliver et Murinda 2012). Dans ce mode de contamination, les bâtiments d'élevage, et très principalement la litière, fournissent le réservoir primaire aux bactéries. La transmission se fait alors par contact direct entre les mamelles et cette litière lors des périodes de couchage.

La diversité des germes entraîne différentes réponses face aux antibiotiques. Certaines souches comme les streptocoques sont très sensibles tandis que les mammites issues d'*Escherichia coli* n'impliquent pas d'utiliser des antibiotiques. En effet, dans ce cas, la guérison est observée après quelques jours et sans utiliser de traitement (Robertson et al. 2012). Certains cas d'infections ne peuvent pas s'accompagner d'un traitement antibiotique,

notamment en raison de la nature de l'infection. C'est le cas d'infections par champignon, levure ou virus. Dans un second temps, ce cas peut être imposé par l'environnement d'élevage. Par exemple, dans le cas d'élevages dans des fermes biologiques, l'utilisation de produits antibactériens va entraîner la perte du statut biologique pour l'animal (Ruegg et al. 2009). Une solution efficace serait donc d'envisager un traitement alternatif qui répondrait aux différents problèmes économiques, de santé animale et biologique.

Il a été envisagé différents traitements naturels pour tenter de répondre à ces différents besoins. L'étude d'extraits naturels de plantes (Issauter et al. 2013) ou l'utilisation d'huiles essentielles (Lesot et al. 2006) ont permis de conclure à l'efficacité de ces produits sur plusieurs souches bactériennes isolées représentatives des mammites : *S. aureus*, *E. coli* ou *S. uberis* (Ananda Baskaran et al. 2009, Aiemsaard et al. 2011, Dal Pozzo et al. 2011, Fratini et al. 2014). Des mécanismes d'actions de ces produits naturels sont envisageables (Goetz 2012) et prouvent que des produits biosourcés peuvent être une solution alternative de lutte contre les mammites.

Depuis plusieurs années, les propriétés antibactériennes et antifongiques des huiles végétales ozonées ont été démontrées sur plusieurs cas d'études et ont prouvé l'intérêt de ce produit comme alternative. Tout d'abord, une étude menée en Asie (Jo et al. 2005) a comparé l'effet d'un antibiotique et de l'huile ozonée sur des quartiers de vaches allaitantes. Des études comparatives avec des médicaments utilisés habituellement ont permis de prouver l'intérêt des huiles ozonées comme alternative naturelle (Guerra-Blanco 2017). Des recherches sur différents types d'huiles ozonées affirment que ces produits ont une action antibactérienne sur un panel de souches impliquées dans les inflammations cutanées des animaux de productions laitières (Francisco et al. 2017, Oviedo et al. 2017). Enfin, un hybride d'huile de tournesol hautement oléique ozonée a prouvé son efficacité contre un panel de 59 pathogènes représentatifs de la pathologie de la mammité (Moureu 2015a). Ces travaux ouvrent la porte à de nouveaux essais pour approfondir la comparaison entre l'huile de tournesol ozonée et les antibiotiques utilisés habituellement.

Il a donc été démontré l'action antibactérienne des huiles ozonées. Ce sont les molécules formées au cours de la synthèse du produit qui sont responsables de cette propriété. La nature et la quantité de ces molécules sont dépendantes notamment des conditions appliquées pour la réaction entre l'huile végétale et l'ozone.

I.2 La synthèse des huiles ozonées

I.2.1 La matière première : les huiles végétales

I.2.1.1 Généralités sur les huiles végétales

On peut définir la composition des huiles végétales selon deux familles de molécules. La première représente les composés « mineurs » présents en faible proportion (1 à 5%), il s'agit de la fraction lipidique, qui possède la propriété de ne pas être saponifiable. Une partie des composés de cette fraction possède des propriétés particulières comme les tocophérols qui ont le rôle d'antioxydants notamment contre les dérivés réactifs de l'oxygène, issus de l'oxydation des acides gras (Bramley et al. 2000). Cette famille ne présente actuellement pas d'intérêt majeur pour la synthèse d'huile végétale ozonée.

La deuxième famille est composée des triglycérides (TAGs), en proportion majoritaires (95 à 99%). On peut définir les TAGs comme la combinaison d'une molécule de glycérol et d'acides gras reliés par des fonctions ester (R_1 , R_2 , R_3 désignent les chaînes aliphatiques saturées ou insaturées d'acides gras) (Figure 1).

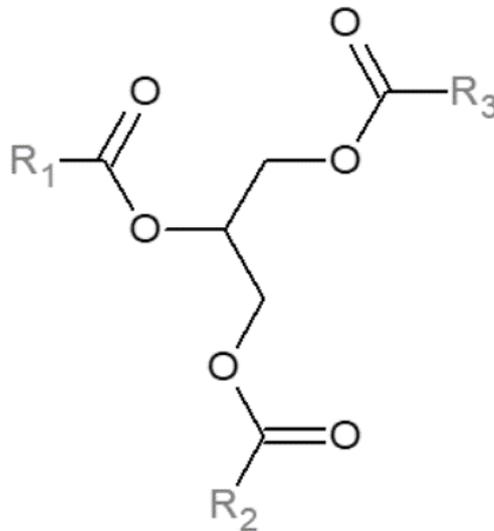


Figure 1. Structure chimique d'un triglycéride

Les chaînes des acides gras peuvent avoir différentes structures, ce qui nous permet d'obtenir des TAGs homogènes (avec les mêmes chaînes grasses) et des TAGs hétérogènes (au moins deux chaînes grasses différentes). Les chaînes grasses des huiles végétales possèdent plusieurs caractéristiques. Tout d'abord, elles sont composées d'un nombre d'atomes de carbone compris entre 6 et 24 (Dubois et al. 2007). Ensuite, les chaînes grasses peuvent être totalement saturées, ou bien fonctionnalisées avec des doubles liaisons entre deux atomes de carbones (insaturation). Ces insaturations sont présentes à des positions spécifiques de la chaîne (atome de carbone n° 6, 9, 12 ou 15 par rapport au carbone portant la fonction carbonyle) et présentent des configurations spatiales Z ou E. Il apparaît en majorité quatre types de chaînes grasses présentes dans la composition des huiles végétales, provenant de quatre acides gras : l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique (Figure 2).

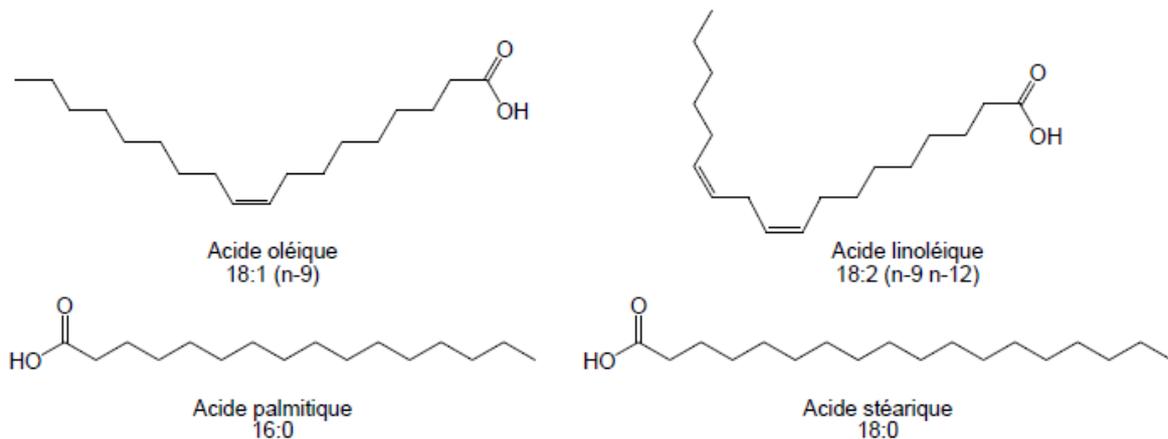


Figure 2. Structure des quatre principaux acides gras rencontrés dans des huiles végétales

La présence de ces quatre profils seulement limite le nombre et la position des insaturations sur les chaînes grasses. La particularité des huiles végétales est la présence de différentes proportions de ces chaînes grasses, imposées par la nature ou adaptées par la production d'hybrides (Warner et al. 2007). Ainsi, on observe des huiles enrichies en acide gras de type oléique (huile de colza ou huile d'olive) ou des huiles avec une majorité de chaîne palmitique (huile de palme) (Kamal-Eldin and Andersson 1997, Vingering et al. 2010). L'huile de tournesol constitue notre espèce d'intérêt car la diversité variétale permet de travailler avec des huiles aux profils de chaînes grasses différentes.

I.2.1.2 Cas particulier de l'huile de tournesol

La production mondiale d'huile de tournesol continue de se classer parmi les plus importante depuis des années (List 2015). En effet, près de 20 millions de tonnes ont été produites en 2019 à travers le monde (USDA), classant cette ressource au 4^{ème} rang mondial derrière l'huile de soja, de palme et de colza. En France, un tiers des surfaces cultivées en tournesol est localisé en région Occitanie (Agreste – statistique agricole annuelle 2017), ce qui s'explique notamment par la situation géographique propice à l'exploitation de cette plante.

L'évolution de la production a amené l'apparition de nouveaux hybrides avec différents profils de chaînes grasses. Ainsi, il est possible d'obtenir des huiles de tournesol présentant une teneur en chaînes linoléiques variant de 50 à 75%. Ce sont des huiles issues d'hybrides classiques. Dans une autre mesure, il est possible d'obtenir des huiles à faible teneur en chaînes linoléiques et abondantes en chaînes oléiques (teneurs au-dessus de 70%). Ces huiles sont obtenues à partir d'hybrides oléiques et hauts oléiques (Warner et al. 2007).

Ces différents profils d'huiles présentent chacun des intérêts qui sont valorisés dans différents domaines. Tout d'abord dans le secteur de l'alimentaire où les propriétés de l'huile à haute teneur oléique tendent à se rapprocher de celle de l'huile d'olive (huile de friture). Ce dernier profil présente aussi un intérêt en industrie, notamment pour la production de différents acides à chaînes spécifiques (Godard 2012). La production de biocarburants, qui nécessite l'obtention d'esters méthyliques à partir d'huile de tournesol, est une autre source de valorisation de cette agroressource (Ramos et al. 2009, Richard 2011). Depuis plusieurs années, l'huile de tournesol vient à répondre à un nouveau défi, avec des propriétés antibactériennes intéressantes par le biais des huiles ozonées (Moureu 2015a ; Guerra-Blanco 2017).

I.2.2 La réaction d'ozonation des huiles végétales

I.2.2.1 Le réactif oxydant : l'ozone

L'ozone est une molécule chimique composée de trois atomes d'oxygène, de formule O₃. Il s'agit d'une forme allotropique de l'oxygène. Elle possède des formes dites mésomères (Bailey 1978) (Figure 3).

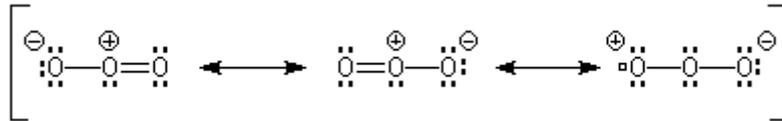


Figure 3. Les formes mésomères de l'ozone

L'existence de cette molécule a été démontrée par la collaboration de deux chimistes dans la première moitié du XIX^e siècle : Martin van Marum et Christian Friedrich Schönbein. C'est un gaz coloré (bleu pâle) qui est soluble dans l'eau. Sa caractéristique principale est son odeur, qui est décelable facilement à des concentrations de 0,01 ppm (Cain, Schmidt, and Wolkoff 2007).

Il existe aujourd'hui plusieurs moyens technologiques et chimiques pour obtenir de l'ozone. Il est possible de produire de l'ozone à partir d'oxygène en utilisant un système de décharge électrique (décharge Corona) ou des ultraviolets (radiations UV). La voie électrochimique permet de convertir l'eau en ozone par électrolyse (Benson 1959, Dohan and Masschelein 1987) (Figure 4).

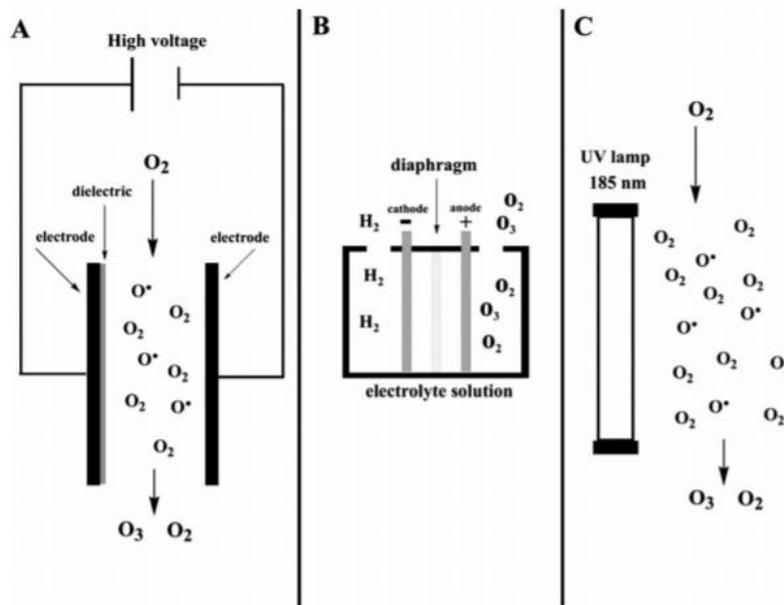


Figure 4. Schéma de principe pour les différents générateurs d'ozone, A : décharge corona, B : voie électrochimique, C : radiations UV (Travagli, 2009)

L'ozone un oxydant puissant qui possède de nombreuses applications notamment dans le traitement des eaux (Langlais, Reckhow, and Brink 1991, Percival et al. 2014) ou comme moyen de lutte contre des champignons pathogènes du pommier (Pages 2015). En effet, sa

décomposition rapide en oxygène permet des traitements oxydatifs sans persistance de la présence de la molécule (sa demi-vie est de 20 minutes à 20 °C dans l'eau et de 3 jours dans l'air).

L'ozone possède différents types de réactivité. Tout d'abord, une réaction indirecte est possible avec la formation préalable de radicaux libre HO[•], ce qui implique ensuite un mécanisme de type radicalaire. Il est aussi possible d'observer une réaction directe entre l'ozone et un site réactionnel spécifique (Bourgin 2011). Dans un premier temps, une attaque électrophile peut avoir lieu sur des molécules à fortes densités électroniques telles que les composés aromatiques qui possèdent un substituant électrodonneur, ou des amines tertiaires (Henbest et Stratford 1964, Bailey 1982). Dans un second temps, le caractère dipolaire de l'ozone permet d'expliquer sa réactivité par cycloaddition (Bailey 1978). Cette réaction intervient généralement au niveau des liaisons insaturées selon le mécanisme de Criegee (Criegee 1975) ou bien au niveau des liaisons carbone-hydrogène activées. C'est cette réaction qui entre en jeu pour l'ozonation des huiles végétales en suivant un mécanisme réactionnel bien précis.

I.2.2.1 Le mécanisme réactionnel de la réaction d'ozonation

Le site de réactivité des huiles végétales est la double liaison entre deux atomes de carbone présentes sur les chaînes grasses des triglycérides (insaturation). L'ozone, molécule oxydante puissante, peut venir réagir sur ce site réactif selon un mécanisme décrit par Criegee (1975) composé de plusieurs étapes.

La première étape consiste en une addition cyclique de la molécule d'ozone sur l'insaturation. On parle de cycloaddition 1,3-dipolaire (Réaction 1, Figure 5, p. 22). Il se forme alors un ozonide primaire, ou molozonide, qui est instable et va rapidement se décomposer en deux espèces (Réaction 2, Figure 5, p. 22) : un zwitterion et un aldéhyde (Kuczkowski 1983).

Deux voies de synthèses sont ensuite envisageables en fonction de la nature du milieu réactionnel. En effet il est possible de réaliser l'ozonation d'huile végétale dans différents milieux : sans solvant, en milieu protique (présence d'au moins un atome d'hydrogène mobile) ou un milieu aprotique (absence d'atome d'hydrogène).

Dans un milieu aprotique ou en absence de solvant, deux produits peuvent se former. Tout d'abord, une cycloaddition 1,3-dipolaire peut à nouveau permettre d'associer les aldéhydes et les zwitterions formés précédemment (Réaction 3, Figure 5, p. 22). On obtient alors les ozonides de Criegee ou 1,2,4-trioxolane. Il existe trois ozonides différents : deux sont dits « cross ozonides » (deux chaînes R_1 ou deux chaînes R_2) et un est dit « normal ozonide » (une chaîne R_1 et une chaîne R_2) (Wu et al. 1992). On peut aussi observer la formation de peroxydes dimériques et polymériques lorsqu'un zwitterion interagit avec un autre zwitterion (Réaction 4, Figure 5, p. 22) (Ishmuratov et al. 2010).

Dans le cas d'un milieu protique, par exemple de l'eau, les zwitterions vont en priorité réagir avec le solvant pour former des espèces peroxydées : les hydroperoxydes (Réaction 5, Figure 5, p. 22). Par équilibre chimique, ces peroxydes forment des acides carboxyliques ou des aldéhydes (Réaction 6, Figure 5, p. 22) (Vesna et al. 2009). Les acides formés peuvent de nouveau réagir avec les zwitterions encore présents dans le milieu pour former des α -acyloxyalkyl hydroperoxydes (Réaction 7, Figure 5, p. 22) (Nishikawa et al. 1995). Cette réaction est aussi directement envisageable lorsque le milieu protique choisi pour diluer l'huile végétale est un acide carboxylique (Zhou et al. 2019).

Bien que la nature du solvant oriente la composition finale du produit, il a été démontré que l'ensemble des produits étaient formés pendant la réaction (Moureu 2015a). On obtient donc un produit enrichi en espèces carbonylées et hydroperoxydes, avec une faible présence d'ozonide de Criegee lorsque le milieu est protique (Díaz, Núñez, et al. 2005, Omonov 2010). Et inversement, dans le cas d'un milieu aprotique ou sans solvant. Il est donc possible d'influencer la composition finale du produit à l'aide des paramètres de réaction.

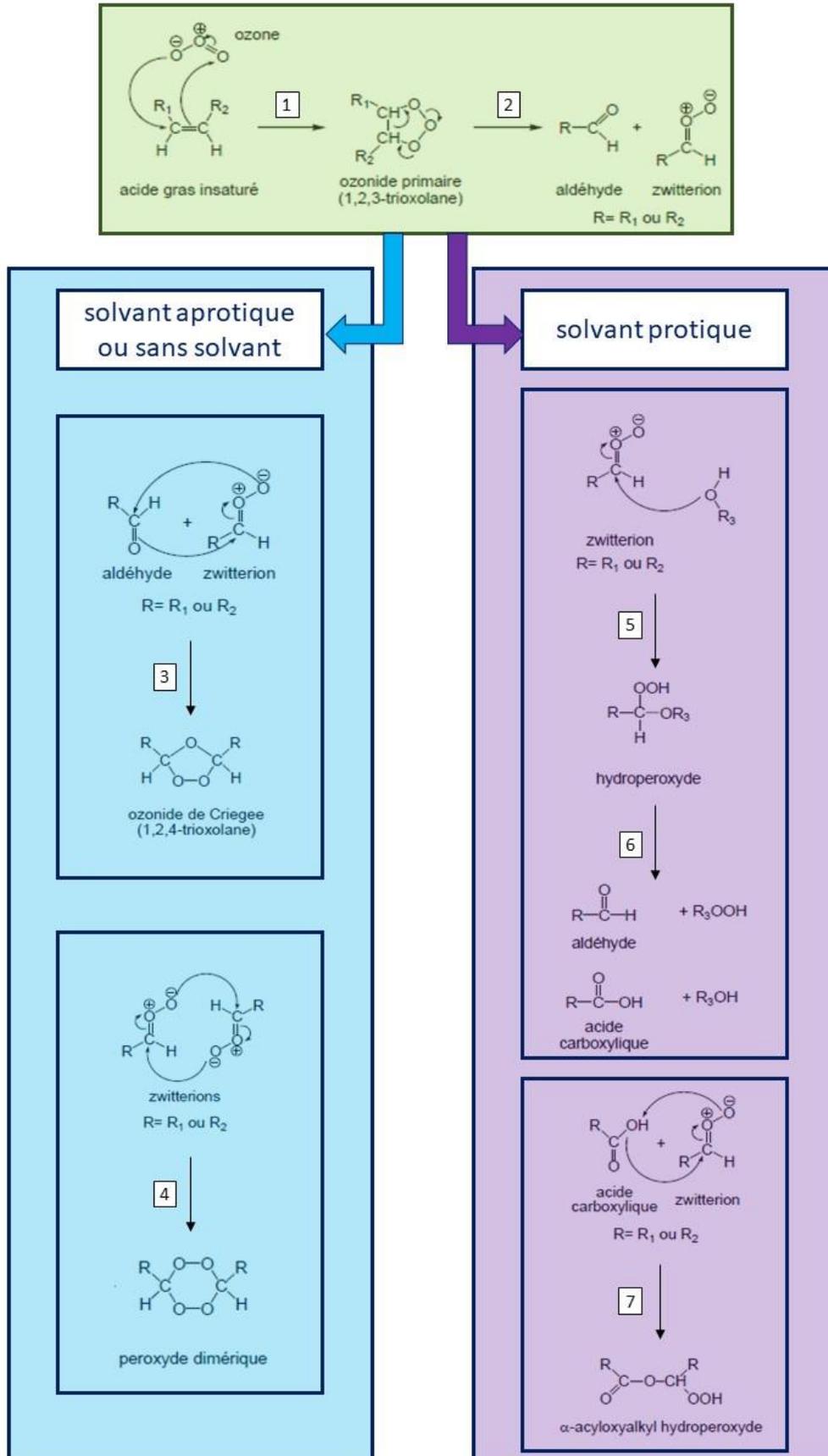


Figure 5. Mécanisme réactionnel de l'ozone sur une espèce insaturée (Criegee, 1975)

I.2.3 Les conditions opératoires de synthèses des huiles ozonées

En ayant connaissance du mécanisme réactionnel, il est possible de mettre en œuvre différents moyens technologiques pour obtenir une huile végétale ozonée. Bien que des procédures standardisées émergent, il est possible d'influencer différents paramètres réactionnels tels que :

- Le type de réacteur (bullage, bouteille de Dreschel, etc.)
- Le mélange réactionnel (origine et quantité de l'huile végétale, ajout ou non d'un solvant, nature et quantité de solvant)
- Les conditions d'ozonation (débit et concentration en ozone)
- Les autres facteurs cinétiques (température et durée de réaction)

Une liste non exhaustive présente un état des procédures existantes à ce jour pour la synthèse d'huiles ozonées (Tableau 4). On remarque à travers la littérature que les procédures possèdent certains points communs. Tout d'abord, elles engagent de petites quantités d'huile (une centaine de milligrammes ou de millilitres). De plus, la nature des solvants ajoutés est peu diversifiée. Il n'apparaît pas d'étude de plusieurs solvants combinés et de l'influence de la quantité de solvant. Ensuite, l'ozone est injecté par bullage dans un réacteur semi-continu. La réactivité est donc limitée par la surface d'échange entre la phase gazeuse et la phase liquide. Enfin, on observe la présence d'un contrôle thermique pour limiter le dégagement de chaleur produit par la réaction. La réaction d'ozonation d'une huile végétale est reconnue exothermique et l'application d'un échangeur de chaleur permet d'éviter un emballement de la réaction et de limiter les risques d'explosion.

Au regard des procédés actuellement utilisés, il est possible d'envisager des solutions innovantes pour optimiser la synthèse des huiles végétales notamment en favorisant les échanges entre les deux phases, en mélangeant des solvants et en appliquant un contrôle efficace de la température.

Une fois la synthèse d'une huile ozonée effectuée, il est nécessaire de caractériser le produit obtenu et plusieurs techniques existent en fonction des paramètres que l'on souhaite étudier.

Tableau 4. Exemples de conditions opératoires d'ozonation d'huile végétale dans la littérature (TA : température ambiante)

Nature du corps gras	Quantité de corps gras	Nature du solvant ajouté	Montage réactionnel	Débit d'ozone (L/h)	Concentration en ozone	Température (°C)	Durée de réaction	Référence
Huile de canola	100 g	éthanol ou méthanol ou acétate d'éthyle	Réacteur thermostaté avec agitation et bullage d'ozone	390	≈ 50 mg/L	0	90 min	Omonov 2010
Huile de noix de coco	150 g	eau ou éthanol ou aucun	Réacteur avec bullage d'ozone	54	37,5 mg/L	TA	74,4 min	Diaz, Nunez 2005
Huile d'olive	190 g	aucun	Bullage d'ozone dans la solution	60	10 ppm	30	50 h	Miura 2001
Huile d'olive	80 mL	eau	Réacteur avec bullage d'ozone	30	75,2 mg/L	25	5,73 h	Diaz, Hernandez 2006
Huile de tournesol		eau					8,05 h	
Huile de tournesol	150 g	rien	Réacteur avec bullage d'ozone	42	79,5 mg/L	TA	2h	Díaz, Gavín Sazatornil 2005
Huile de tournesol	192 g	eau	Réacteur avec bullage d'ozone	72	81,6 mg/L	TA	jusqu'à 3,5 h	Díaz, Gavín 2006
Huile de tournesol	150 mL	aucun	Réacteur colonne thermostaté avec bullage d'ozone	20	30 mg/L	TA	1 à 50 h	Skalska 2009
Huile de tournesol	150 mL	aucun	Réacteur avec bullage d'ozone	30	79 mg/L	25 °C	entre 1 et 4,75 h	Diaz-Gomez 2009
Huile de tournesol	200 mL	aucun	Réacteur avec bullage d'ozone	30	36 ou 75 mg/L	TA	Différentes durées	Diaz 2012
Huile de tournesol	50 g	eau ou aucun	Réacteur thermostaté et bullage d'ozone	30	65 mg/L	27	Différentes durées	Moureu 2015b

I.3 La caractérisation des huiles ozonées

Il existe un grand nombre de caractérisations possibles pour les huiles ozonées et les huiles végétales, qui permettent notamment de suivre l'évolution de la composition et de pouvoir comparer entre elles les réactions.

I.3.1 Les caractérisations chimiques

I.3.1.1 Mesure de la quantité d'insaturations

La méthode privilégiée pour déterminer la quantité d'insaturation est la détermination de l'indice d'iode (II). Ce paramètre est défini par la masse de diiode susceptible de se fixer sur les insaturations des chaînes grasses des triglycérides. Il s'agit d'un dosage iodométrique en retour (AFNOR 2011). On détermine l'indice d'iode (exprimée en g de I₂/100 g d'échantillon) à l'aide de la formule suivante :

$$II = \frac{12,69 * C * (V_1 - V_2)}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

avec C la concentration de la solution de thiosulfate de sodium (mol/L), V₁ le volume de solution titrante pour le blanc (mL), V₂ le volume de solution titrante pour l'essai (mL) et m la masse de la prise d'essai (g). Cette quantité est notamment soumise à la nature de l'huile végétale utilisée et la durée de la réaction. Ce phénomène a particulièrement bien été décrit par Moureu et al. (2015b) (Figure 6).

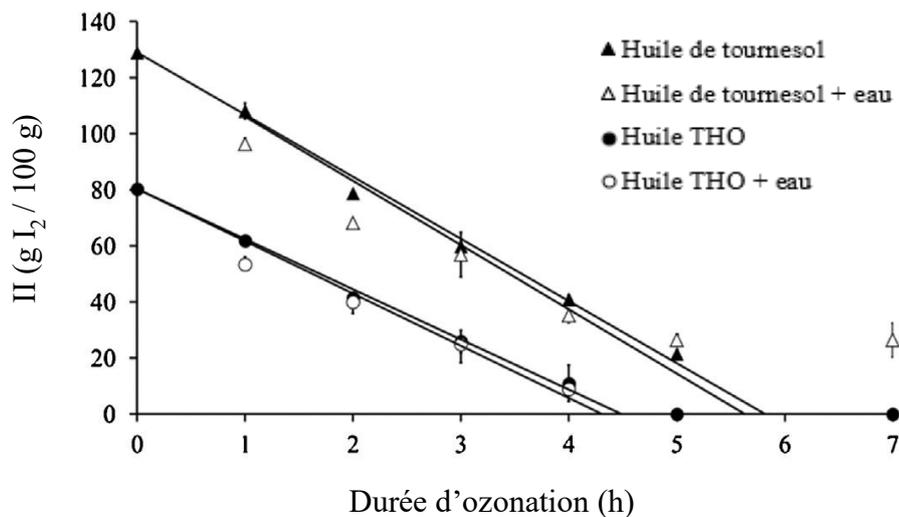


Figure 6. Evolution de l'indice de d'iode en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)

L'utilisation d'un hybride hautement oléique (THO) va permettre de diminuer l'indice d'iode initial par rapport à une huile de tournesol classique qui possède notamment un plus grand nombre de chaîne linoléique. De plus, plus la durée de réaction augmente et plus l'ozone réagit avec les insaturations et donc l'indice d'iode tant à diminuer pour atteindre une valeur nulle lorsqu'il n'y a plus d'insaturations disponibles.

Une méthode alternative possible est la mesure de l'insaturation totale (IT). Cette méthode brevetée consiste à déterminer la quantité d'insaturations qui peut réagir avec l'ozone dans un échantillon à l'aide d'un ozonogramme (Poznyak 2008). L'échantillon dissous et un standard de structure connue sont placés dans un analyseur d'insaturation totale (AIT). L'ozone nécessaire pour réagir avec l'échantillon est mesuré puis comparé à la quantité consommée lors d'une réaction avec le standard. On peut déterminer l'IT (mol d'insaturations/g d'échantillon) à l'aide de la formule suivante (Guerra-Blanco 2015) :

$$IT = \frac{C_S * V_S * S_e * V_{SOL}}{S_S * V_e * m_e} \quad (\text{Eq. 2})$$

avec C_s la concentration en standard (mol/L), V_s et V_e les volumes du standard et de l'échantillon analysé (mL), S_s et S_e les aires déterminées sur l'ozonogramme du standard et de l'échantillon analysée (unité SI), V_{SOL} le volume total de l'échantillon analysé (mL) et m_e la masse de l'échantillon.

I.3.1.2 Détermination de l'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) est associé à la quantité d'espèces peroxydées formées. Plus précisément, il s'agit de la quantité d'oxygène actif présent, à la suite de l'oxydation des triglycérides des huiles végétales. C'est aussi un dosage iodométrique (AFNOR 2010a) qui met en jeu une réaction entre les peroxydes et des ions iodures qui va former du diiode, qui pourra lui-même être dosé. On détermine l'indice de peroxyde (exprimée en milliéquivalent d'oxygène actif/kg d'échantillon) à l'aide de la formule suivante :

$$IP = \frac{(V - V_0) * C * 1000}{m} \quad (\text{Eq. 3})$$

avec V le volume de la solution de thiosulfate de sodium versé (mL), V_0 le volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc (mL), C la concentration de la solution de thiosulfate de sodium et m la masse de la prise d'essai (g)

L'évolution de cet indice est dépendant de la nature du solvant et de la durée de la réaction mais pas de la nature de l'huile végétale utilisée (Moureu et al. 2015b) (Figure 7).

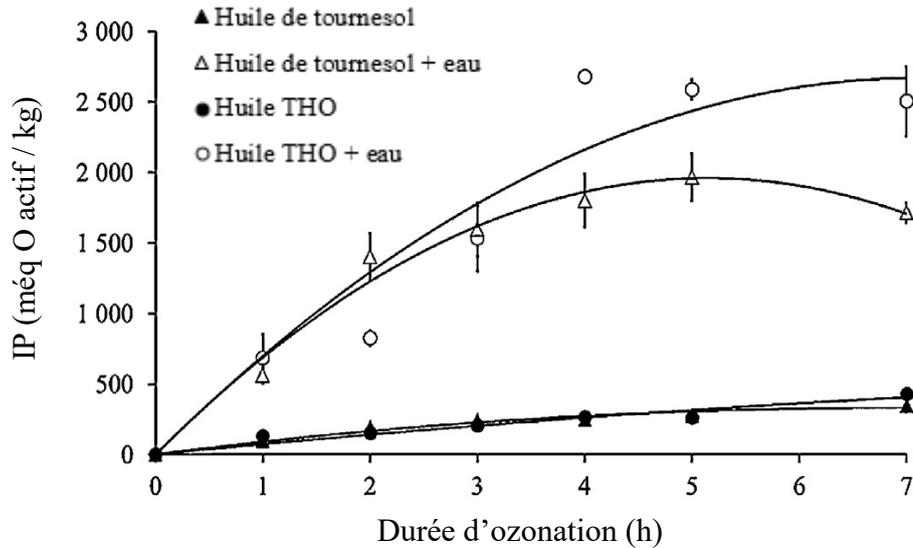


Figure 7. Evolution de l'indice de peroxyde en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)

L'IP connaît une augmentation pendant l'ozonation des huiles végétales, associée à la formation croissante des peroxydes (Réactions 4, 5 et 7 ; Figure 5). La formation de ces espèces est notamment influencée par la présence d'un solvant protique tel que l'eau. Il s'agit d'un indice global et ne permet pas d'avoir d'informations sur la nature des espèces formées.

I.3.1.3 Détermination de l'acidité

L'acidité (AV) peut être reliée simplement à la quantité d'acides présents dans le milieu. Il s'agit d'un dosage acido-basique (AFNOR 2009) dans lequel les acides présents viennent réagir avec de l'hydroxyde de potassium. On peut déterminer l'acidité grâce à la formule suivante (exprimée en mg de KOH/g d'huile) :

$$AV = \frac{56,1 \cdot V \cdot C}{m} \quad (\text{Eq. 4})$$

avec C la concentration exacte de la solution d'hydroxyde de potassium (mol/L), V le volume de la solution d'hydroxyde de potassium (mL) et m la masse de la prise d'essai (g).

L'augmentation de l'acidité avec la durée d'ozonation a été constatée (Moureu et al. 2015b) (Figure 8) et s'explique par la formation d'acides notamment favorisée en milieu protique (Réaction 6, Figure 5, p.22).

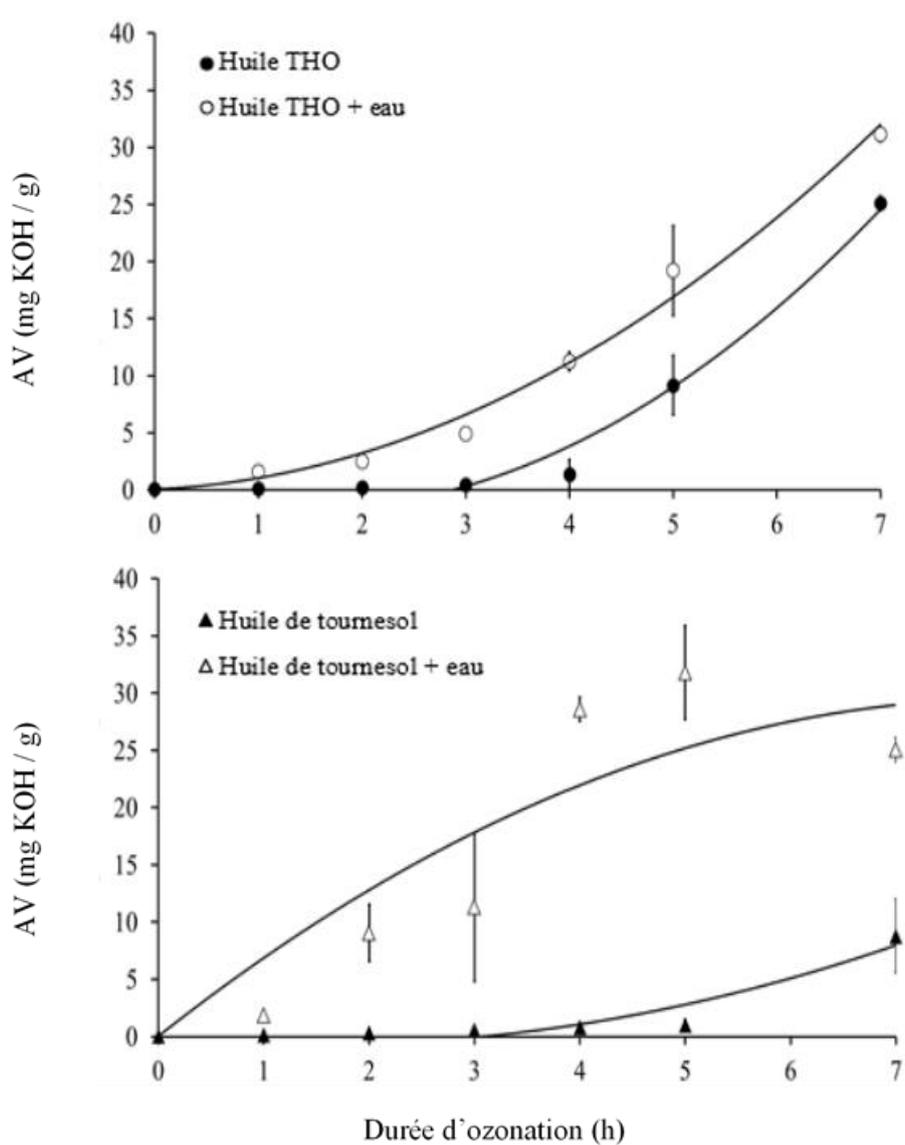


Figure 8. Evolution de l'acidité en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)

I.3.1.4 Suivi de la formation de formaldéhyde

Le formaldéhyde (Figure 9) est un sous-produit de réaction issu de la dégradation de la matière organique lors de l'ozonation des huiles végétales.

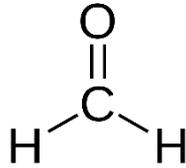


Figure 9. Structure de la molécule de formaldéhyde

Malgré le fait que cette molécule possède une activité antibactérienne, elle présente une certaine toxicité et peut affecter l'intégrité de la cellule à partir d'une concentration de quelques ppm. La présence de cette molécule peut être détectée par une réaction à chaud avec l'acide chromotropique en solution avec de l'acide sulfurique, ce qui va provoquer une couleur violette (Guinesi 2011). Les quantités d'aldéhydes peuvent aussi être déterminées en utilisant la méthode d'analyse de la p-Anisidine. Cette procédure met en jeu l'addition d'hydroxylamine libre et le résultat obtenu est exprimé en mmol d'aldéhydes par gramme d'échantillon (AFNOR 2007a).

I.3.1.5 Mesure de la viscosité

La mesure de la viscosité d'une huile ozonée peut être effectuée à l'aide d'un viscosimètre, à une température fixée de 35 à 40 °C et son unité est le Pa.s⁻¹ (ou Poiseuille). La viscosité est très dépendante de la température. Par exemple, une huile de sésame ozonée peut présenter une viscosité de 900 mPa.s⁻¹ à 22 °C tandis que celle-ci diminue à 400 mPa.s⁻¹ à 35 °C (Zanardi et al. 2008). Ce paramètre permet d'estimer la quantité d'insaturations présente dans l'huile. On peut associer une durée d'ozonation plus longue à une viscosité et une densité de produit plus élevée. La viscosité fournit une information sur les interactions de van der Waals, qui augmentent avec la diminution de la quantité d'insaturations présente dans le milieu réactionnel, mais surtout avec la production de composés polaires. On peut donc lier la valeur de la viscosité à la cinétique de réaction. De plus, une polymérisation peut se produire lors du processus d'ozonation, notamment avec l'apparition des peroxydes polymériques (Figure 10), ce qui peut aussi entraîner une augmentation de la viscosité. Des études ont, en utilisant des mesures de viscosité, déterminé que davantage d'ozonides polymériques étaient formés lors de l'ozonation d'une huile de pépin de raisin que lors d'une ozonation d'huile de tournesol

(Guerra-Blanco 2015). De plus, la viscosité peut être liée directement aux conditions de réaction, comme la présence d'un solvant, notamment l'eau, qui permet d'obtenir une viscosité de produit après réaction plus élevée (Rodrigues 2015).

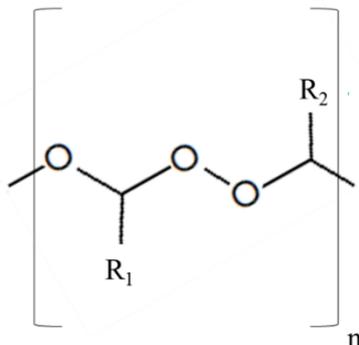


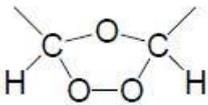
Figure 10. Structure d'un peroxyde polymérique

I.3.2 Les caractérisations spectrales

I.3.2.1 La RMN ^1H et ^{13}C

Cette technique spectroscopique peut être utilisée pour suivre les modifications de structure qui se produisent dans le mélange réactionnel. Les spectres sont obtenus par dissolution du corps gras dans du chloroforme deutéré (CDCl_3) avec ou sans ajout de tétraméthylsilane (TMS) comme étalon interne (Díaz Gavín et al. 2006). Tout d'abord, les signaux des protons et des carbones liés à l'insaturation (δ 5,3 ppm pour l'hydrogène et δ 128-130 ppm pour le carbone) tendent à disparaître, car il y a une réaction entre l'ozone et ces insaturations. On observe l'apparition de nouveaux signaux avec la formation de nouvelles molécules, par exemple des aldéhydes (δ_{H} 9,6-9,7 ppm et δ_{C} 202 ppm), des ozonides (δ_{H} 5,1-5,2 ppm et δ_{C} 103,4-104,5 ppm) et des hydroperoxydes (δ_{H} 2,4 et 5,5 ppm). On peut utiliser l'intégration des signaux des protons $-\text{OCH}_2$ du glycérol comme référence car ils ne subissent pas de modification pendant la réaction. La RMN en 2D (COSY, HMQC) permet de lier des signaux protons et carbones et donc d'apporter des justifications structurales sur l'apparition de nouveaux produits (Díaz, Gavín Sazatorni 2005, Segá et al. 2010). Les signaux cités précédemment sont regroupés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Différents signaux RMN liés aux différents groupes fonctionnels présents dans les huiles ozonées

Groupements fonctionnels	Déplacements chimiques (ppm)	
	¹ H	¹³ C
—CH ₃	0,8 – 0,9	14,28
—(CH ₂) _n —	1,3	29,15 – 31,89
—CH ₂ —CH ₂ —OCO—	1,6	24,84
—CH ₂ OCO—	2,3	34,08
—OCO—	—	172,98
—CH ₂ —CH=CH—CH ₂ —	5,35	128,0 – 130,0
—CH ₂ —CH=CH—CH ₂ —	2	27,18
	5,1 – 5,2	103,4 – 104,5
—COH	9,6 – 9,7	202
Hydroperoxydes	2,4	—
	5,5	—

I.3.2.2 La chromatographie en phase gazeuse

L'utilisation de la CPG couplée à un détecteur à ionisation de flamme permet de caractériser des huiles ozonées et notamment d'observer la disparition des chaînes grasses qui réagissent avec l'ozone (Díaz, Hernández et al. 2006). Il est possible de déterminer l'apparition de certains composés volatils. En effet la décomposition des peroxydes et des hydroperoxydes conduit à la formation d'aldéhydes et d'acides carboxyliques avec des longueurs de chaînes différentes. Il est possible de quantifier ces espèces en utilisant le p-anisaldéhyde comme étalon interne (Omonov et al. 2010). Il faut noter que certaines molécules observées peuvent être le résultat d'une dégradation thermique, notamment des ozonides, lors de l'injection. En effet, l'injecteur est à une température de 250 °C et il a été démontré que les ozonides se décomposent à une température proche de 150 °C pour former des aldéhydes et des acides carboxyliques (Cataldo 2015). Cette méthode a notamment permis de déterminer la structure de la fraction volatile de l'Oleozon® (Ledea 2001), ou d'observer les molécules issues de la dégradation du produit lors du stockage de ce dernier pendant une certaine période (Moureu et al. 2016).

I.3.2.3 La chromatographie liquide

La séparation des différents composés en fonction de leurs masses molaires est envisageable par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). On peut isoler trois groupes de composés en fonction de leurs masses molaires. Il s'agit tout d'abord des composés de masse molaire inférieure aux triglycérides (aldéhydes et acides carboxyliques), puis les triglycérides et triglycérides modifiés (ozonides) et enfin les composés de masse molaire supérieure aux triglycérides (polymères) (Ledea Lozano 2005). En utilisant un réfractomètre, on peut suivre par analyse SEC-RI l'évolution de la masse molaire des molécules de l'échantillon en comparant les temps de rétention à des standards (Omonov 2010).

L'analyse de la structure des triglycérides avant et après réaction avec l'ozone ainsi que la formation des ozonides de triglycérides est réalisable par HPLC en phase inverse couplée à une détection UV (210nm). La formation majoritaire de tri-ozonides de trioléine a notamment été déterminée lors de l'ozonation d'huile d'olive (Miura et al. 2001).

I.3.2.4 La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge repose sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et les liaisons chimiques qui composent le produit étudié. En effet, une partie de l'énergie du rayonnement électromagnétique peut être absorbée par une liaison chimique si les niveaux d'énergies de la liaison et du rayon infrarouge sont proches. Il peut y avoir ensuite transmission ou réflexion de l'énergie non absorbée qui peut être alors mesurée. Dans la gamme de longueur d'onde du spectre lumineux, l'infrarouge est situé juste avant le visible. L'infrarouge peut être divisé en trois régions : proche, moyen et lointain infrarouge (Figure 11).

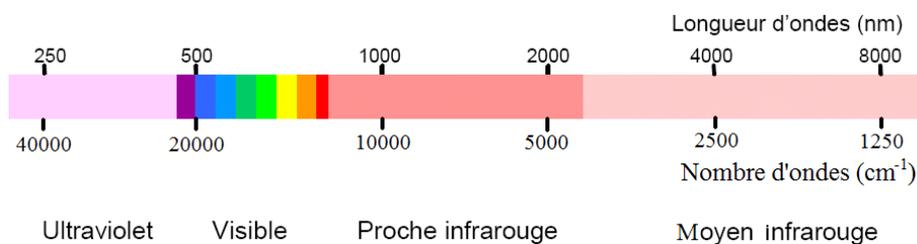


Figure 11. Les différentes zones du spectre lumineux

Le domaine du moyen infrarouge (MIR) est largement utilisé pour caractériser les huiles végétales avant et après ozonation et observer l'évolution du milieu (Yu 2007, Moureu 2015a,

An 2017, He et al. 2017, Amri et al. 2020). Pour ces analyses, on utilise la gamme du spectre allant de 2600 à 25000 nm (4000 à 400 cm^{-1}) (Travagli et al. 2010). Toutes les études menées utilisent des parties spécifiques du spectre apportant des informations sur les structures des liaisons chimiques. On peut donc observer la consommation des doubles liaisons du milieu, avec l'étirement de la liaison $\text{C}=\text{C}$ et de la liaison $=\text{C}-\text{H}$ associée avec la diminution de l'intensité des bandes vers 1700 cm^{-1} et vers 3000 cm^{-1} respectivement Cette consommation conduit à la formation d'ozonides et on remarque l'augmentation de l'intensité de la bande vers 1100 cm^{-1} , qui s'explique par l'étirement de la liaison $\text{C}-\text{O}$ des ozonides (Zanardi et al. 2008, Georgiev et al. 2015). On peut aussi déterminer la formation d'espèces hydroxylées (acides carboxyliques et/ou hydroperoxydes) avec l'apparition d'un large pic entre 3200 et 3600 cm^{-1} . Enfin, la formation d'espèces carbonylées est associée à l'augmentation de l'intensité de la bande vers 1750 cm^{-1} (Guillén and Cabo 2002, Soriano et al. 2003, John, Bhattacharya, and Raynor 2004).

Les études sur les huiles végétales non oxydées s'orientent aussi vers l'utilisation de la gamme du proche infrarouge (NIR), soit de 830 à 2600 nm (50000 à 4000 cm^{-1}) (Li 1999, Richard 2011, Adewale et al. 2014). Cette technique est mise en place en raison de plusieurs avantages : c'est une méthode rapide (acquisition des données de quelques secondes à quelques minutes), elle est non destructive (pas de dégradation de l'échantillon), nécessite peu de consommables et est peu toxique (pas ou peu d'utilisation de solvants comparé aux dosages volumétriques). La spectroscopie proche infrarouge est aussi une spectroscopie d'absorption mais la différence avec le moyen infrarouge provient du fait que les absorptions ne sont pas dues aux vibrations fondamentales des molécules (reliées directement aux fonctions chimiques), mais aux vibrations harmoniques et aux vibrations de combinaisons (Dufour 2009).

La spectroscopie infrarouge apporte une quantité importante de données et de variables. Pour en extraire un résultat exploitable, il est nécessaire d'employer la chimiométrie. Il s'agit de réaliser des prétraitements mathématiques des spectres réalisés sur les échantillons (par exemple effectuer des dérivations du premier ou second ordre) (Bertrand et Dufour 2006). Ces prétraitements permettent d'extraire les informations les plus significatives du spectre. Il est possible de réaliser ces prétraitements sur l'ensemble du spectre ou sur une partie seulement. Il est ensuite possible d'associer ces prétraitements à des modèles de prédictions. Une partie des échantillons vont constituer un set de calibration tandis qu'une autre partie va constituer un set de validation selon une proportion de 70% et respectivement 30%. Ces modèles vont permettre

d'associer des grandeurs chimiques ou physiques qui ont été standardisées aux données issues du spectres de l'échantillon. C'est ainsi que certains indices chimiques tels que l'indice d'iode ou l'indice de peroxyde ont été déterminés dans certaines huiles végétales (Li 1999, Adewale et al. 2014, An 2017, Seweh et al. 2019).

La Tableau 6 donne un inventaire non exhaustif des techniques de caractérisation mises en œuvre pour suivre la composition des huiles végétales ozonées.

Tableau 6. Exemples de caractérisations et d'analyses sur des corps gras ozonés

Caractérisation	Indice d'iode	Indice de peroxyde	Acidité	CPG	RMN	Infrarouge	HPLC	Viscosité
Miura 2001					X	X	X	
Soriano 2003					X	X		
Hernandez 2004		X			X			X
Diaz, Nunez 2005		X	X		X			X
Diaz, Gavin 2005		X			X			
Diaz-Gomez 2006	X	X	X	X				
Diaz, Hernandez 2006	X	X	X	X				
Diaz, Gavin 2006		X			X			
Martinez, Diaz 2006		X						
Sadowska 2008		X	X	X	X			X
Zanardi 2008	X	X	X		X	X		X
Skalska 2009	X	X	X					X
Diaz-Gomez 2009		X	X	X				
Omonov 2010				X	X		X	
Sega 2010	X	X			X			X
Valacchi 2011	X	X	X					X
Diaz 2012		X	X	X				X
Georgiev 2015			X	X	X	X		X
Rodrigues 2015	X	X	X					
Varol 2017	X	X	X					X

I.3.3 La stabilité des huiles ozonées

Après réaction et à température ambiante, l'huile ozonée présente une texture homogène, plus ou moins visqueuse allant même jusqu'à l'obtention d'une pâte. Il a donc été nécessaire d'étudier les conditions optimales de stockage pour un produit à des fins commerciales. Il existe peu de données sur la stabilité des huiles végétales ozonées intervenant dans la formulation de produits commerciaux. Généralement, l'évaluation de la stabilité utilise l'indice de peroxyde comme référence. Une stabilité de 6 mois minimum a été déterminée pour Neozone 4000, une huile de tournesol ozonée, lors d'un stockage en zone réfrigérée ou à température ambiante. Une diminution significative de la quantité d'ozonide a été déterminée lors d'une période de stockage plus longue (jusqu'à 1 an) et une température plus élevée (40 °C) (Cirlini 2012). Il a aussi été démontré que l'huile d'olive ozonée (OZO) peut être conservée pendant environ un an à température ambiante ou jusqu'à trois ou quatre ans dans un réfrigérateur (Boland-Nazar 2016).

Une étude complète sur l'huile de tournesol ozonée à haute teneur en acide oléique a permis de déterminer la stabilité du produit sous différentes conditions de stockage (Moureu et al. 2016). Le produit ozoné pendant 4 h a été stocké de 1 à 12 mois sous une température contrôlée variant de -20 °C à +37 °C. On observe sur les échantillons conservés à température ambiante et à une température plus élevée (+37 °C) une rapide diminution de l'indice de peroxyde, une augmentation de l'acidité, et une disparition des ozonides. Pour les échantillons stockés à des faibles températures (-20 °C et +4 °C), on observe une stabilité de ces paramètres. Cette étude suggère la dégradation favorisée des peroxydes et des ozonides dans certaines conditions, favorisant la formation d'acides carboxyliques. On observe donc une stabilité des propriétés chimiques du produit sur une durée d'un an lors d'un stockage au réfrigérateur ou congélateur. Cependant, l'activité antibactérienne contre *S. uberis* est restée inchangée malgré la dégradation chimique, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation de la quantité en acides nonanoïque et azélaïque qui compense la disparition des ozonides (Jang et al. 2012, Sieber et Hegel 2014).

I.4 Conclusion et objectifs de la thèse

Il a été démontré depuis longtemps l'utilité des huiles pour leurs propriétés antibactériennes. L'ajout d'ozone à ce produit a permis de confirmer qu'il était possible d'améliorer ces propriétés et les huiles ozonées présentent aujourd'hui un intérêt dans de nombreux domaines (cosmétique, alimentaire, thérapeutique). La synthèse de ce produit est maîtrisée sur de petites quantités en réacteur semi-continu mais une demande croissante en huile ozonée nécessite d'envisager des procédés à plus grande échelle avec l'amélioration de certains paramètres. Dans un souci de chimie plus responsable et pour gagner un temps considérable, les méthodes d'analyses actuelles doivent être repensées. Enfin, l'huile ozonée a démontré son potentiel pour la lutte contre les mammites mais il est nécessaire de déterminer plus précisément si ce produit peut se présenter comme une alternative aux antibiotiques actuels.

L'objectif de ces travaux de thèse est donc d'envisager l'optimisation de la synthèse d'huile ozonée, d'adapter les méthodes d'analyses et démontrer l'efficacité de ce produit contre une pathologie ciblée.

Dans un premier temps nous étudierons la possibilité d'obtenir un mélange ozoné à base d'huile de tournesol qui possède des caractéristiques chimiques intéressantes tout en conservant une viscosité faible. Cette étude a pour objectif d'envisager une synthèse en flux continu et ainsi optimiser la réaction pour une synthèse industrielle.

Comme le montre la littérature, il est possible de caractériser quantitativement les huiles ozonées à l'aide de méthodes chimiques de référence. Cependant, ces méthodes sont largement consommatrices en réactifs chimiques dangereux, destructrices pour l'échantillon et longues à mettre en œuvre. Les résultats sont obtenus au mieux en quelques heures voire plusieurs jours si les analyses sont groupées. Des moyens analytiques plus rapides et moins onéreux sont donc nécessaires. La spectroscopie infrarouge est une solution particulièrement bien adaptée. C'est une méthode rapide et non destructive. Cette méthodologie nécessite une phase d'étalonnage qui lie le spectre infrarouge aux résultats des mesures faites au laboratoire par des méthodes de référence. L'étalonnage doit être réalisé pour chacun des indices chimiques que l'on souhaite prédire par la suite. Cette méthode est déjà utilisée pour prédire avec succès des teneurs en acide, teneur en insaturation, etc. dans des huiles végétales mais aucune étude n'est encore disponible sur la prédiction d'indices caractérisant les huiles ozonées.

Enfin, les huiles ozonées sont le plus souvent étudiées dans le but d'une application chez l'homme mais leur efficacité sur des espèces bactériennes impliquées dans le développement de mammites est clairement établie. Toutefois, aucune étude n'a été réalisée sur un panel complet de germes isolés d'animaux. Nous évaluerons l'activité antibactérienne de l'huile de tournesol ozonée, sur un panel de souches bactériennes isolées à partir de lait recueilli sur des brebis atteintes de mammites

CHAPITRE II – MATERIELS ET METHODES

II.1 Les réactifs utilisés

L'ensemble des réactifs utilisés au cours de toutes les expériences est référencé dans le Tableau 7.

Tableau 7. Liste des réactifs utilisés lors des expériences

Réactif	Pureté (%)	Fournisseur
Acétate d'éthyle	99,9	Carlo-Erba
Acide acétique glacial	100	Carl Roth
Acide chlorhydrique	98	Sigma-Aldrich
Acide nonanoïque	97	Fisher
Agar de Mueller-Hinton	-	
Bouillon cœur-cervelle	-	
Cerium ammonium sulfate dihydraté	>94	Alfa-Aesar
Chloroforme deutéré	99,8	Sigma-Aldrich
Cyclohexane	>99,5	Carl Roth
Ethanol	>99,8	Carlo-Erba
Heptamolybdate d'ammonium tetrahydraté	-	VWR
Huile de tournesol à haute teneur en acide oléique	-	Atteris
Huile de tournesol classique	-	Carquefou
Hydroxyde de potassium	86,1	VWR
Iodate de potassium	>99,5	Sigma-Aldrich
Iodure de potassium	>99,5	Fisher
Isooctane	>99	Carl Roth
Méthanol	>99,9	Carlo-Erba
Méthyl tert-butyl éther (TBME)	>99,5	Sigma-Aldrich
Oléate de méthyle	>99	Sigma-Aldrich
Réactif de Wijs	-	Fisher
Thiosulfate de sodium	>99	Fisher
Toluène	>99	Fisher
Triméthylsulphonium hydroxyde (TMSH)	≈ 0,25 M dans méthanol	Sigma-Aldrich
Tween-80	-	Fisher
Undécanoate de méthyle	99	Sigma-Aldrich

L'eau milli-Q (ultra pure avec une résistivité de 18 mohm.cm⁻¹) utilisée est obtenue à l'aide d'un appareil de purification de l'eau de type Milli-Q® Integral 15 (Millipore). L'ensemble des synthèses utilisant l'eau comme solvant nécessite l'emploi d'eau milli-Q.

II.2 L'ozonation des matières grasses

II.2.1 Ozonation en réacteur semi-continu

II.2.1.1 Description du montage

Le poste d'ozonation est composé des quatre outils suivants (Figure 12) :

- Le générateur d'ozone (ou ozoneur) alimenté par de l'oxygène pur ou un mélange d'oxygène et d'air de qualité industrielle.
- Le réacteur d'ozonation, qui est le lieu même de la réaction entre l'ozone et les matières grasses.
- Les analyseurs d'ozone situés avant et après le réacteur.
- La destruction chimique de l'ozone gazeux résiduel avant un rejet dans l'atmosphère (réaction avec du KI en solution ou à l'aide d'une cartouche de CuMnO_3).

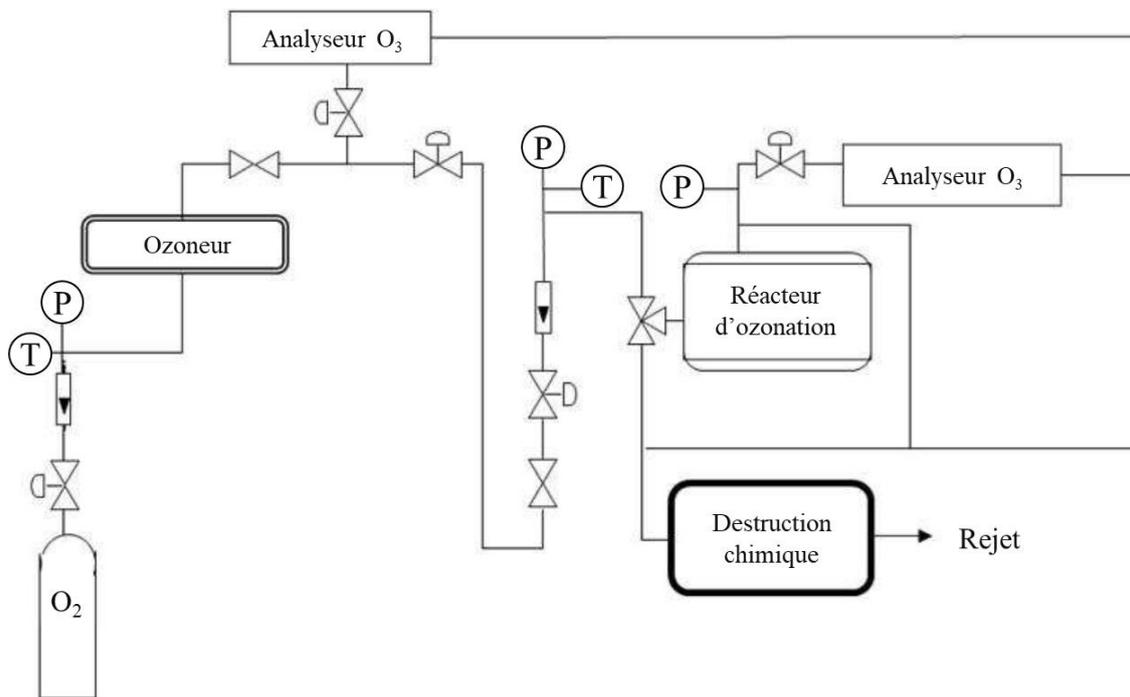


Figure 12. Schéma du poste pour l'ozonation des matières grasses

II.2.1.2 Le générateur d'ozone

Le générateur d'ozone était un ozoneur OZAT CFS-1 (Ozoniasuisse) à tubes diélectriques fonctionnant à une pression relative de 0,7 bar. Une circulation d'eau a été nécessaire pour permettre un refroidissement efficace du réacteur de production d'ozone. La

concentration en ozone obtenue à la sortie dépend essentiellement de la nature du gaz (air pur ou oxygène pur), du débit de gaz et de la puissance appliquée aux deux électrodes. Pour l'ensemble des manipulations, le gaz utilisé a été de l'oxygène pur (Air Liquide) afin d'avoir une concentration en ozone la plus élevée possible.

II.2.1.3 Le réacteur d'ozonation

La plupart des réactions d'ozonation des huiles végétales et des matières grasses ont été réalisées dans un réacteur gaz-liquide semi-continu (Figure 13). Ce réacteur en verre d'un volume maximal en réactif de 80 mL est muni d'un circuit de régulation de température à l'intérieur d'une double paroi en verre. L'ozone a été introduit dans le réacteur grâce à un fritté qui vient s'insérer dans la partie inférieure du réacteur et qui permet de faire buller le gaz dans l'échantillon.

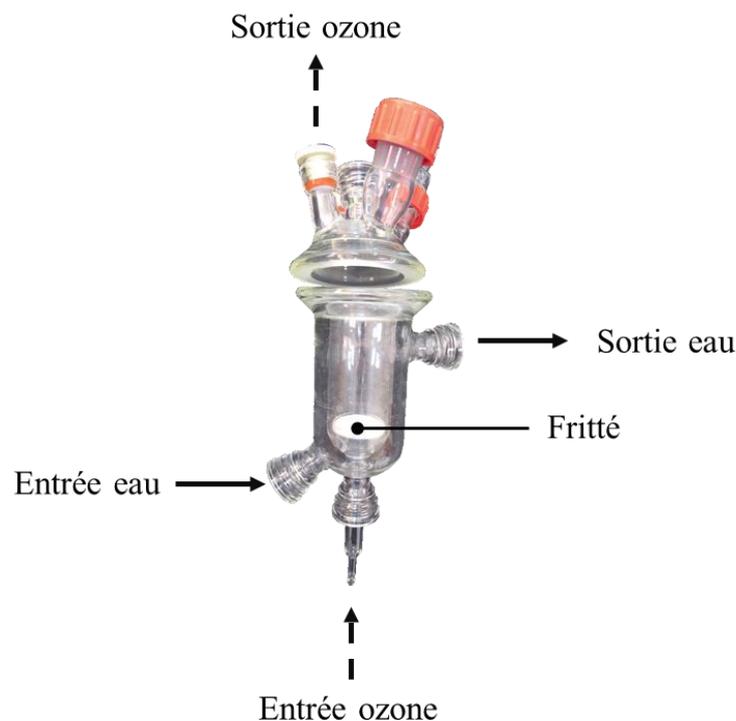


Figure 13. Réacteur semi-continu pour l'ozonation des huiles végétales et des matières grasses

II.2.1.4 Les analyseurs d'ozone

Deux analyseurs d'ozone à affichage digital (Ozone analyser BMT 961) sont placés avant l'entrée et après la sortie du réacteur. Ils effectuent des mesures en continu de la concentration en ozone dans la phase gazeuse par analyse UV à 254 nm (Mendez et al. 2003).

La concentration déterminée est affichée en g/m^3 et dépend de la pression et de la température de la phase gazeuse.

II.2.1.5 Destruction de l'ozone résiduel

L'installation comporte un système de destruction chimique à l'iodure de potassium (KI) pour éliminer les traces d'ozone en excès avant le rejet dans l'atmosphère.

II.2.1.6 Conditions opératoires standards

Dans l'ensemble des manipulations, sauf indications contraires, les conditions opératoires suivantes ont été appliquées :

- Débit ozone pur = 30 L/h
- Concentration en ozone = 65 g/m^3
- Quantité d'huile = 50 g
- Température du circuit d'eau dans le réacteur = $27 \text{ }^\circ\text{C}$
- Durée de réaction = 4 h

II.2.2 Cas particulier de la synthèse en flux continu

L'ozonation de matières grasses a été envisagée en réacteur en flux continu pour un transfert de technologie vers une échelle industrielle. Le poste d'ozonation possède des similitudes avec la synthèse en réacteur semi-continu et est composé de plusieurs outils disposés selon le schéma suivant (Figure 14) :

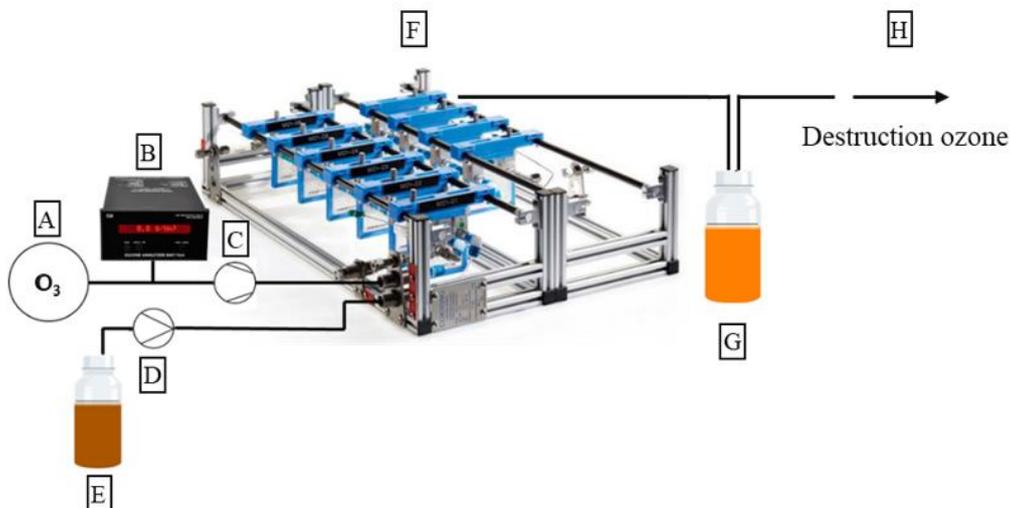


Figure 14. Dispositif expérimental utilisé pour l'ozonation en flux continu des corps gras

- Un générateur d’ozone OZAT-CFS-1 (Ozonía, Suisse) qui transforme l’oxygène pur (Air liquide) par système de décharge corona (A).
- Un analyseur d’ozone (Ozone analyser BMT 961) qui est placé en sortie du générateur d’ozone (B).
- Un compresseur qui permet de comprimer l’ozone avant de l’injecter dans le réacteur et permettant d’augmenter le rapport gaz/liquide (C).
- Une pompe type HPLC (D) qui permet de prélever l’échantillon (E).
- Un microréacteur thermostaté (F) (réacteur Low-Flow, Corning).
- Le produit est recueilli dans un récipient (bouteille par exemple) en sortie de réacteur (G).
- Un système de destruction de l’ozone en excès (H), par exemple un piège au KI ou un système de hotte aspirante.

Le microréacteur Low-Flow de Corning est composé d’une ou de plusieurs plaques (6 au maximum) qui associent plusieurs dizaines de réacteurs de taille microscopique en continu (Figure 15). Le volume d’une plaque est de 0,45 mL. Il est donc possible de moduler le volume total du système. Les réacteurs présentent une technologie en forme de « cœur » qui permet une succession de flux laminaires et continus qui entraîne un meilleur transfert gaz-liquide. L’ensemble des plaques est soumis à un circuit d’eau thermostaté qui permet de maintenir ou d’appliquer une température à l’ensemble du système.

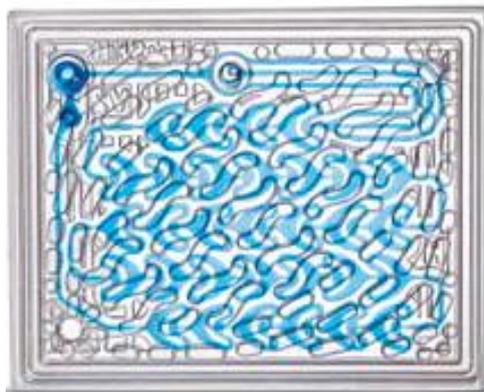


Figure 15. Vue d'une plaque de réacteurs du système Low-Flow de Corning

II.3 Les plans d'expériences

Un plan d'expériences permet d'étudier l'influence de plusieurs paramètres sur un procédé. Le plan est fondé sur deux approches principales : la recherche de l'importance des

facteurs (factor screening) et la modélisation mathématique du procédé étudié (Goupy 2006). Une corrélation mathématique permet de décrire une variable réponse (une grandeur d'intérêt comme un indice chimique par exemple) à l'aide de facteurs qui sont les paramètres du procédé étudié (Leardi 2009).

II.3.1 Plan de Doehlert à deux facteurs

Le plan de Doehlert a été choisi car il s'agit de l'un des plus efficaces et nécessite le moins d'expérimentations. De plus, il permet de décrire un comportement non-linéaire en raison du modèle mathématique de deuxième ordre et il est très utile pour optimiser le système (Ferreira et al. 2004). Les points d'expériences du plan proposé par David Doehlert en 1970 remplissent de manière uniforme l'espace expérimental à deux facteurs et présentent une forme d'hexagone régulier avec un point central (Figure 16).

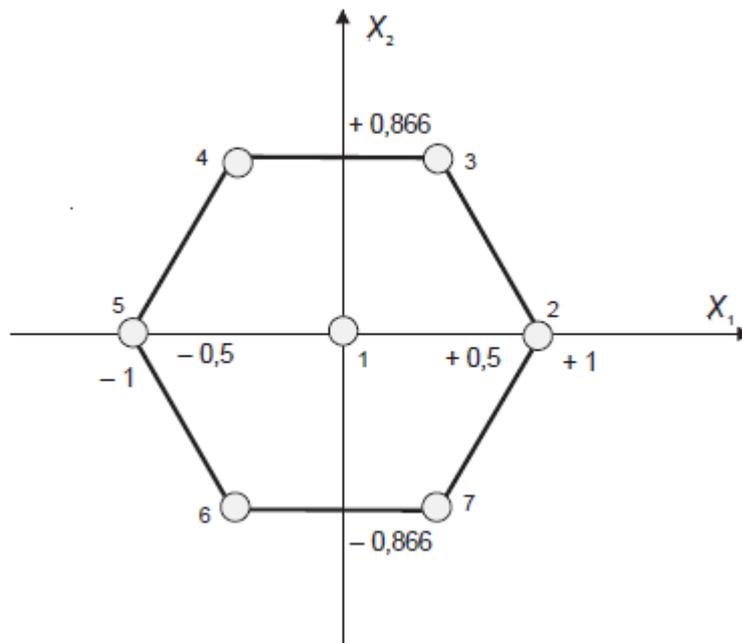


Figure 16. Plan de Doehlert pour l'étude de deux facteurs

Le Tableau 8 est une représentation sous forme de matrice d'expériences de la Figure 16. La disposition des points conduit à cinq niveaux pour le facteur X_1 et trois niveaux pour le facteur X_2 . Avant tout, il faut donc définir un niveau minimal (-1) et maximal (+1) qui sont les limites d'études pour chaque facteur.

Tableau 8. Plan de Doehlert pour deux facteurs

Essai	Facteur X ₁	Facteur X ₂
1	0	0
2	+ 1	0
3	+ 0,5	+ 0,866
4	- 0,5	+ 0,866
5	- 1	0
6	- 0,5	- 0,866
7	+ 0,5	- 0,866

Pour ces sept points expérimentaux, il est déterminé une réponse Y qui peut être représentée par une fonction mathématique du second degré :

$$Y(n) = f(X_1(n), X_2(n)) = a_0 + a_1 * X_1(n) + a_2 * X_2(n) + a_{12} * X_1(n) * X_2(n) + a_{11} * X_1(n) * X_1(n) + a_{22} * X_2(n) * X_2(n) + r(n)$$

Avec :

- n : le numéro de l'essai
- a₀ : terme constant qui correspond à la réponse au centre du domaine
- a₁ et a₂ : termes linéaires
- a₁₂ : terme d'interaction
- a₁₁ et a₂₂ : termes quadratiques
- r : le résidu qui correspond à l'écart entre la valeur observée et la valeur calculée

Les valeurs des coefficients ont été calculés par régression multilinéaire à l'aide des données obtenues expérimentalement. Les sept points expérimentaux permettent d'obtenir sept équations. Ce système peut être écrit sous forme matricielle de façon générale (Karam 2004) :

$$(Y) = (X) (A) + (R)$$

Avec :

- (X) : matrice du modèle
- (Y) : matrice des résultats d'essais pour une réponse donnée
- (A) : vecteur des estimateurs des coefficients
- (R) : matrice des résidus

L'estimation des coefficients à partir de la méthode des moindres carrés fait alors intervenir l'équation matricielle suivante :

$$(A) = ({}^tXX)^{-1} ({}^tX) (Y)$$

Une fois les valeurs de ces coefficients déterminés, il est nécessaire d'évaluer la variance du modèle ainsi que de chacun des coefficients. On simplifie les équations précédentes de la façon suivante :

$$Y(n) = M(n) + r(n)$$

Avec :

- n : le numéro de l'essai
- Y : réponse mesurée expérimentalement
- M : réponse calculée à partir du modèle développé
- r : résidu entre les deux mesures

Les analyses classiques de variances ne font pas intervenir les réponses mais les différences entre les réponses et leurs moyennes \hat{Y} , soit $(Y - \hat{Y})$ et $(M - \hat{Y})$. Ces termes peuvent être isolés à partir de la relation précédente sur le résidu en soustrayant \hat{Y} , on obtient alors :

$$Y - \hat{Y} = M - \hat{Y} + r$$

On élève ensuite les termes au carré et on réalise la somme sur toutes les réponses obtenues (on suppose n essais), ce qui donne dans notre cas la relation :

$$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_l)^2 = \sum_{i=1}^n (M_i - \hat{Y}_l)^2 + \sum_{i=1}^n r_i^2$$

On a donc réalisé une analyse de variance (ou test ANOVA) entre le modèle corrigé de la moyenne et les résidus, soit sur les facteurs $(M_i - \hat{Y}_i)$ et r_i . Cette analyse nous a permis d'observer si le modèle proposé était significatif et si les réponses calculées ont été statistiquement significatives.

Pour cette analyse, le degré de liberté des deux groupes était nécessaire. Le degré de liberté (ddl) de la variation du modèle corrigé de la moyenne correspond au nombre de coefficients calculés ($a_0, a_1 \dots$) moins un. Pour la variation des résidus, le degré de liberté est égal au nombre de réponses obtenus moins le nombre de coefficients. Ensuite, la variance, qui est aussi appelée « carré moyen » est déterminée par le rapport entre la somme des carrés et le degré de liberté. Enfin, un test F (ou test de Fisher) est effectué pour confirmer ou non que le modèle statistique soit représentatif ou non de la réalité. A partir de la valeur obtenue pour F, on peut déterminer une valeur de p qui correspond à la probabilité d'accepter la valeur du modèle alors qu'elle est fautive. Finalement, plus la valeur de p est faible et plus le modèle proposé est significatif. De la même manière, concernant les différents termes des modèles, lorsque leurs valeurs p ont été inférieures à 0,05, ces termes ont pu être considérés comme significatifs (Bourgin 2011)

La construction et l'analyse des plans d'expériences ont été réalisées à l'aide du logiciel JMP® et Minitab (version 18.1).

II.3.2 Plan de surface de réponse étendu

Un plan de surface de réponse personnalisé est mis en place de la même manière que le plan de Doehlert mais le nombre d'essais et les compositions des mélanges sont différents. Les compositions ont été choisies arbitrairement pour représenter plus efficacement l'ensemble du domaine expérimental.

Il faut considérer le passage entre les quantités de solvants et les variables codées à l'aide de l'équation suivante :

$$X = (m - N_0) / (N_1 - N_0)$$

Avec :

- X : la variable codée
- m : la quantité de solvant pour le facteur étudié
- N_1 : la valeur du niveau +1 dans le domaine expérimental
- N_0 : la valeur du niveau 0 dans le domaine expérimental

La détermination des coefficients, l'analyse de la variance du modèle et des différents coefficients suivent la même méthode que pour le plan de Doelhart.

II.4 Les caractérisations chimiques

L'appareil utilisé pour les dosages est un titrateur automatique Metrohm Ti-Touch 916 (Figure 17), équipé de 2 électrodes (une solvotrode qui est une électrode pH combinée pour la mesure et une électrode de platine pour l'électrode de référence).



Figure 17. Dispositif de dosage (Ti-Touch 916)

II.4.1 Détermination de l'indice d'iode

L'indice d'iode (II) est déterminé par la masse de diiode (exprimée en g) capable de se fixer sur les doubles liaisons carbone-carbone des acides gras de 100 g de matière grasse. L'indice d'iode a été déterminé par dosage iodométrique en retour (AFNOR 2011). L'ensemble de la méthode, notamment la masse de la prise d'essai, a été adaptée en fonction du type de corps gras, de la durée d'ozonation ou de la présence d'adjuvants.

La détermination de l'indice d'iode d'un échantillon nécessite au préalable la mesure de celui d'un « blanc » (absence d'échantillon) et le protocole suit les étapes suivantes :

- Dissoudre l'échantillon (entre 0,1 et 2,5 g) dans 20 mL d'un mélange cyclohexane/acide acétique glacial (1:1).
- Ajouter 20 mL de réactif de Wijs, pour réagir avec les insaturations du mélange, à l'obscurité pendant 1h pour les échantillons avant ozonation et pendant 2h pour les échantillons après ozonation (Réaction 1, Figure 18).

- Ajouter 20 mL de solution de KI (iodure de potassium) à 100 g/L. Il se forme alors du I₂ (diiode) en excès (Réaction 2, Figure 18).
- Doser le I₂ en excès par une solution thiosulfate de sodium à 0,1 mol/L (Réaction 3, Figure 18).

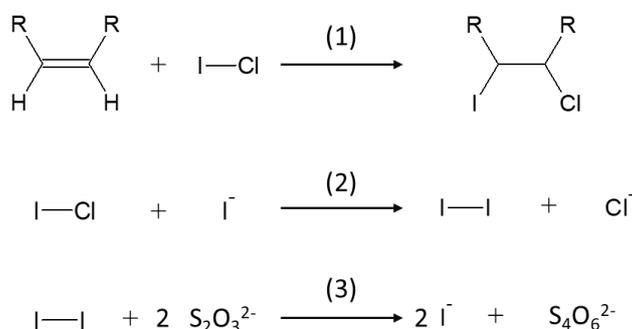


Figure 18. Réactions de dosages pour la détermination de l'II

On détermine finalement l'indice d'iode grâce à la formule suivante (exprimée en g de I₂/100g d'échantillon) :

$$II = \frac{12.69 * C * (V_1 - V_2)}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

C : concentration de la solution de thiosulfate de sodium (mol/L)

V₁ : volume de solution titrante pour le blanc (mL)

V₂ : volume de solution titrante pour l'essai (mL)

m : masse de la prise d'essai (g)

Il est nécessaire d'ajuster la prise d'essai (entre 0,1 et 2,5 g), en effet, si la masse de produit est trop élevée, V₂ pourrait tendre vers 0 (pas d'excès de réactif de Wijs) et, à l'inverse, si la prise d'essai n'est pas suffisante, la différence entre V₁ et V₂ pourrait être insuffisante et l'indice d'iode sera imprécis.

II.4.2 Détermination de l'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) est déterminé par la quantité de peroxydes formés durant l'ozonation des corps gras. L'indice de peroxyde a été déterminé par dosage iodométrique (AFNOR 2010a). L'ensemble de la méthode, notamment la masse de la prise d'essai, a été

adaptée en fonction du type de corps gras, de la durée d'ozonation ou de la présence d'adjuvants.

La détermination de l'indice de peroxyde d'un échantillon nécessite au préalable la mesure de celui d'un « blanc » (absence d'échantillon) pour corriger le volume équivalent. En effet, des substances oxydantes peuvent être présentes dans le mélange de solvant utilisé pour dissoudre l'échantillon. Le protocole suit les étapes suivantes :

- Dissoudre l'échantillon dans 20 mL d'un mélange iso-octane/acide acétique glacial (2:3).
- Ajouter 500 µL de solution saturée d'iodure de potassium.
- Placer l'échantillon à l'obscurité pendant 1 minute pour permettre la réaction entre les peroxydes et les ions iodures (Réaction 1, Figure 19).
- Ajouter 100 mL d'eau et doser le diiode formé lors de la réaction 1 par du thiosulfate de sodium à 0,01 mol/L (Réaction 2, Figure 19).

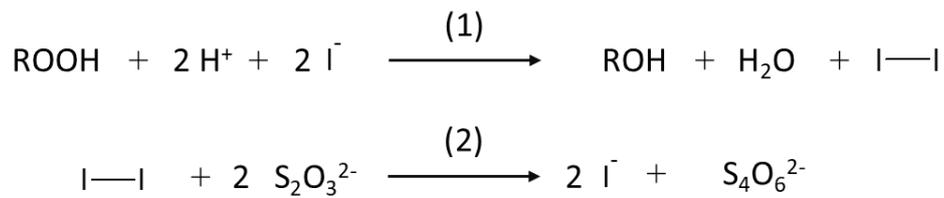


Figure 19. Réactions de dosages pour la détermination de l'IP

On détermine finalement l'indice de peroxyde grâce à la formule suivante (exprimée en kg d'oxygène actif/kg d'échantillon) :

$$IP = \frac{(V - V_0) * C * 1000}{m} \quad (\text{Eq. 3})$$

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium versé (mL)

V₀ : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc (mL)

C : concentration de la solution de thiosulfate de sodium (0,01 mol/L)

m : masse de la prise d'essai (g)

Il faut noter que plus l'indice de peroxyde est élevé et plus la prise d'essai doit être faible pour restreindre le volume de thiosulfate de sodium qui va réagir avec le diiode. Une quantité comprise entre 0,05 g et 0,3 g est alors engagée pour déterminer l'indice de peroxyde.

II.5 Les caractérisations spectrales

II.5.1 La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est utile pour déterminer le profil des acides gras présents dans un échantillon. Il est important de noter que l'on réalise une estérification suivie d'une méthylation des échantillons avant analyse. En effet, certaines molécules sont trop polaires pour être analysées directement (acides carboxyliques) ou non-volatils (triglycérides). Le protocole consiste donc à utiliser un agent de méthylation : le triméthylsulphonium hydroxyde (TMSH) (AFNOR 2010b). On utilise ensuite un étalonnage interne pour réaliser des analyses quantitatives. L'étalon est l'undécanoate de méthyle (C_{11:0}) car il n'est pas présent dans le milieu réactionnel d'étude et le pic de cet étalon est bien séparé des autres pics du mélange.

La préparation d'un échantillon suit le protocole suivant :

- Réaliser une solution à 50 mg/mL en échantillon et 10 mg/mL en étalon interne dans du méthyl tert-butyl éther (MTBE).
- Dans un vial avec un insert, mélanger 50 µL la solution précédente avec 50 µL de TMSH.

Les caractéristiques de l'appareil de CPG sous les suivantes :

- Appareil : Clarus 680 – Perkin Elmer
- Détecteur FID
- Colonne capillaire ZB-FFAB (L 30 m, Ø 0,25 mm, granulométrie 0,25 µm)
- Gaz vecteur : Hydrogène (débit : 3,2 mL/min, fuite : 50 mL/min)
- Température du four : 70 °C pendant 5 min puis une montée progressive jusqu'à 160 °C (5 °C/min) puis montée à 220 °C (2 °C/min), maintenir pendant 12min.
- Durée d'analyse : 65 min.
- Température du détecteur : 230 °C
- Température de l'injecteur : 250 °C

On distingue sur le chromatogramme obtenu la sortie successive de différents composés en fonction de l'affinité avec la colonne (Figure 20). La nature de ces composés peut être déterminée en fonction de la grandeur de la chaîne carbonée, de la fonction chimique et de la

présence d'insaturations. Les temps de rétention associés aux différents produits sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Temps de rétention de différents composés

	Produits	Temps de rétention (min)
1	Hexanal	3,05
2	Acide hexanoïque	4,53
3	Nonanal	9,75
4	Acide nonanoïque	12,19
5	Undécanoate de méthyle	17,01
6	Acide azélaïque	25,80
7	Acide palmitique	27,60
8	Acide stéarique	33,22
9	Acide oléique	33,75
10	Acide linoléique	35,16

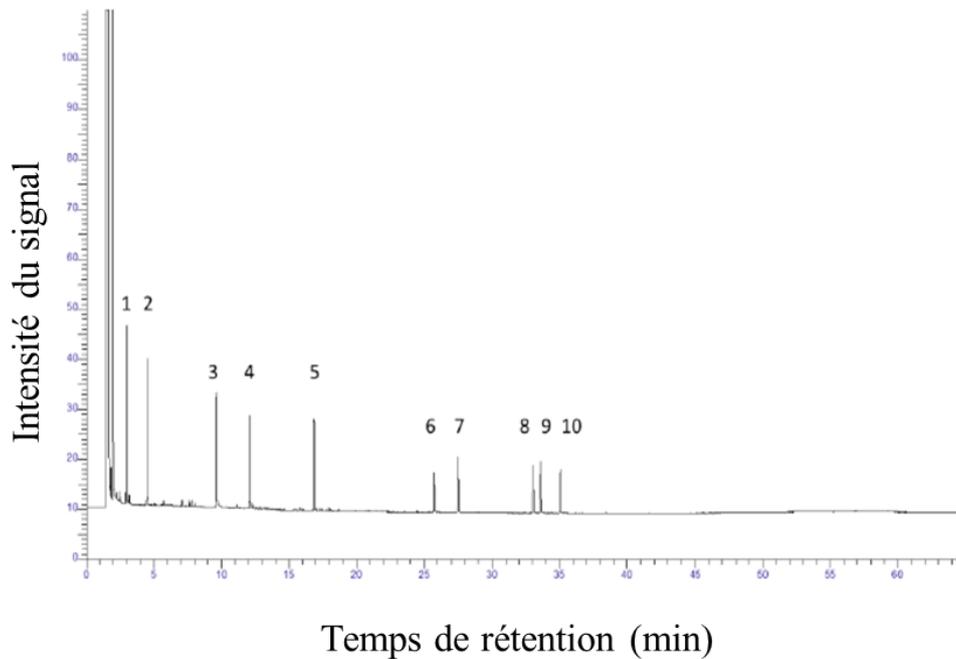


Figure 20. Chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'une solution de standards (composés identifiés dans le tableau 9)

II.5.2 La spectroscopie moyen infrarouge

La caractérisation en moyen infrarouge est une technique d'analyse qui utilise les caractéristiques de la spectroscopie. Elle utilise le principe sur lequel un rayonnement polychromatique va être en partie absorbé et en partie réfléchi par la matière à analyser. La mesure des absorbances sur l'ensemble des longueurs d'ondes du rayon qui est réfléchi

constitue un spectre. On estime que ce spectre constitue une empreinte spectrale propre à l'échantillon et sa composition chimique. Les spectres dans la gamme du moyen infrarouge sont obtenus à partir d'un spectromètre FT-IR Avatar 370 (Thermo Nicolet). On dépose une goutte d'échantillon sur une carte ST-IR en polyéthylène (Thermo Scientific) (Figure 21). Si l'échantillon est trop pâteux, cette technologie présente l'avantage de pouvoir répartir une petite quantité du produit sur la fenêtre de dépôt.



Figure 21. Carte ST-IR

Le spectre obtenu est le résultat de 32 balayages entre 400 et 4000 cm^{-1} et une résolution de 2 cm^{-1} . Dans le cas d'une huile THO ozonée selon différentes conditions, on observe la présence de bandes spécifiques qui peuvent être reliées à des fonctions chimiques précises telles que les insaturations ou les fonctions hydroxyles (Figure 22).

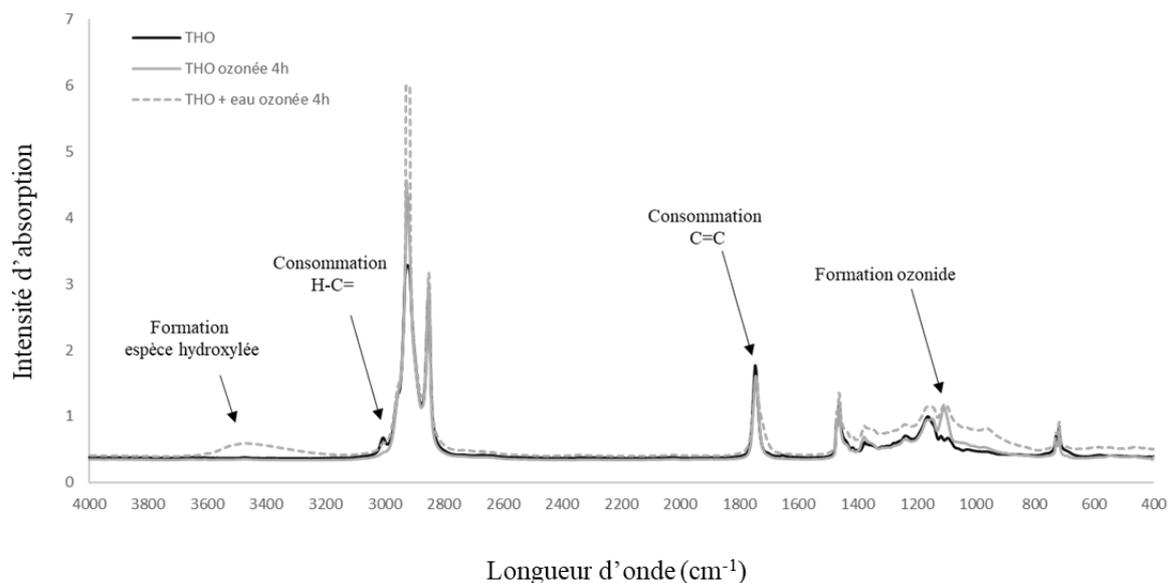


Figure 22. Exemples de spectre d'absorbance dans la gamme spectrale MIR pour une huile THO ozonée 4h avec différentes compositions

II.5.3 La spectroscopie proche infrarouge

La caractérisation en proche infrarouge utilise le même principe que précédemment mais dans une gamme de longueurs d'ondes différente. Le second appareil est un spectromètre de la marque ARCOptix (Arcoptix S.A., Suisse) couplant les régions de l'UV-Visible (UV-Vis) et du NIR (near-infrared). La source lumineuse UV-Vis-NIR est composée d'une lampe au deutérium émettant de 200 à 1040 nm et d'une lampe halogène émettant de 780 à 2600 nm. Elle est reliée par fibre optique à un spectromètre UV-Vis multicanaux, un spectromètre FT-NIR et une sonde déportée. Cette sonde effectue les mesures en réflexion sur l'échantillon, et la réflectance collectée pour chacune des deux lampes est distribuée au détecteur du spectromètre correspondant (Figure 23).

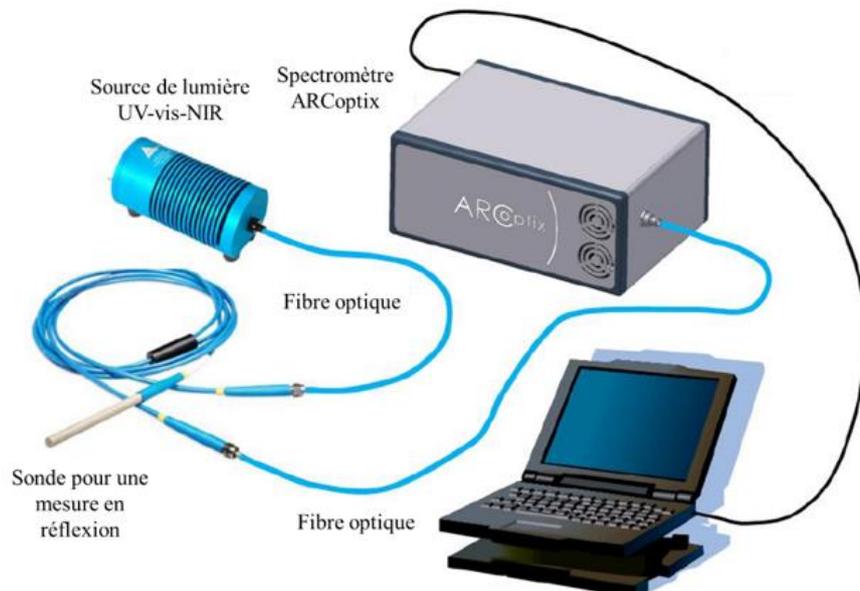


Figure 23. Dispositif de l'ARCOptix pour l'acquisition de spectres en réflexion

Il est possible de remplacer la sonde par un trajet optique direct entre la source lumineuse et le spectromètre dans lequel viendrait s'insérer un emplacement pour cuvette de spectrophotométrie (en PS ou quartz) (Figure 24). Il suffit de déposer l'échantillon dans la cuve et de mesurer l'absorbance en transmission.

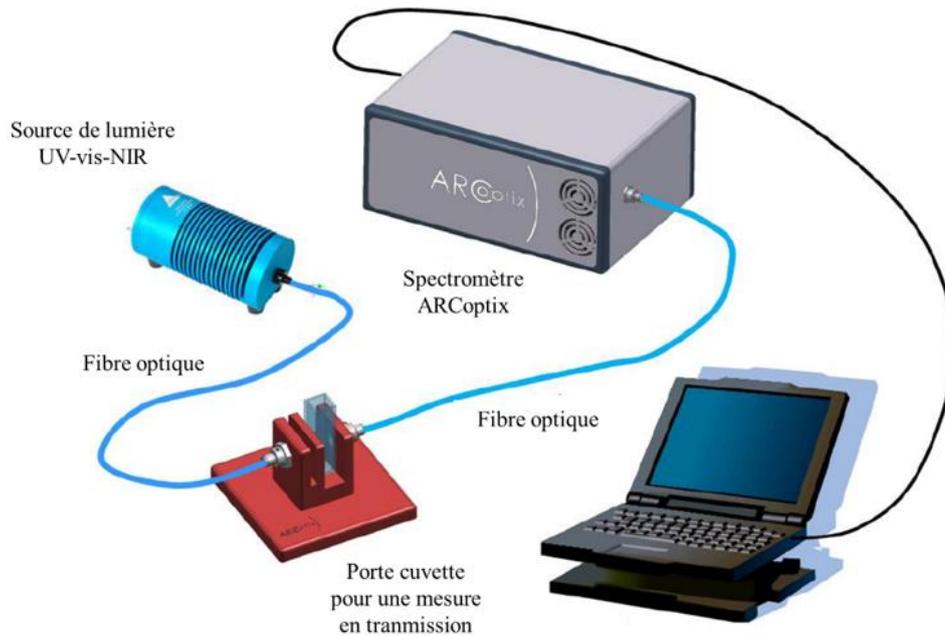


Figure 24. Dispositif pour insérer une cuvette dans le trajet optique pour le spectromètre ARCOptix

Il est alors possible de coupler l'acquisition UV-vis et NIR pour donner un spectre s'étendant de 200 à 2600 nm avec une résolution de 1 nm. Différents spectres obtenus pour différentes conditions d'ozonation sont présentés Figure 25. On observe qu'il est moins facile de lier une bande à une fonction chimique précise.

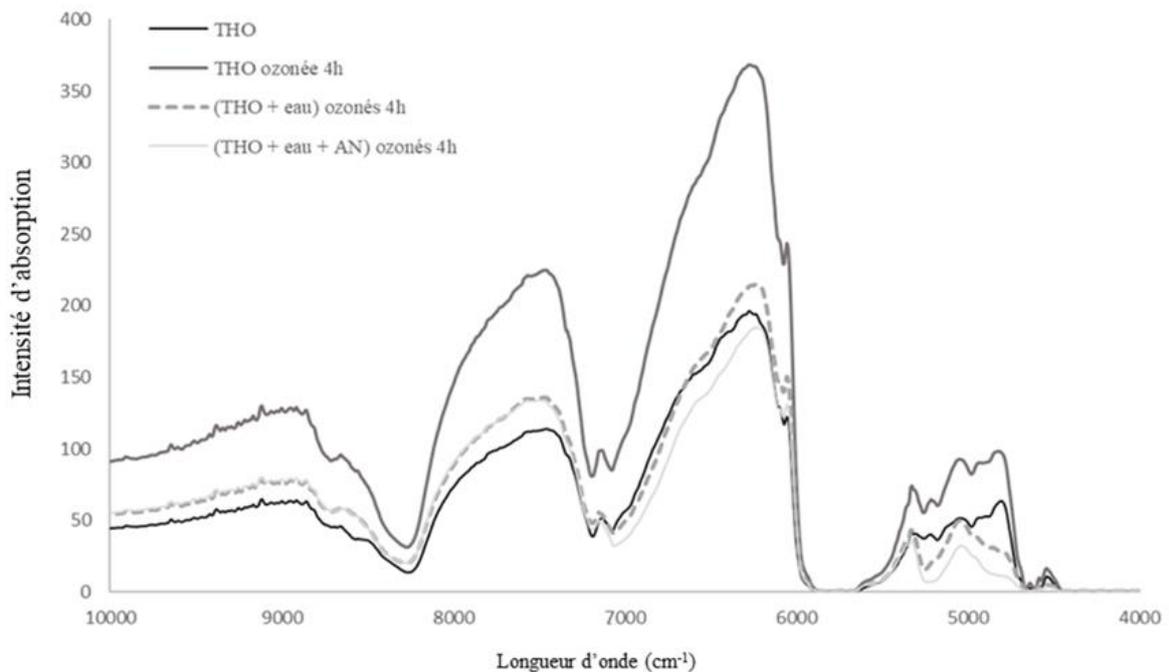


Figure 25. Exemples de spectre d'absorbance dans la gamme spectrale NIR pour une huile THO ozonée 4 heures avec différentes compositions

II.6 Les outils de chimiométrie

La spectroscopie infrarouge, lorsqu'elle est utilisée comme un outil d'analyse est une méthode indirecte qui nécessite le développement d'étalonnages (ou « calibrations »). Dans ce contexte, les étalonnages sont une mise en relation linéaire statistique entre les spectres et l'information à prédire (analyse). On utilise alors la chimiométrie, qui est l'application d'outils mathématiques, en particulier statistiques, pour obtenir le maximum d'informations à partir de données chimiques.

Pour calibrer un modèle en cours d'élaboration, 70% d'un ensemble de données a été sélectionné au hasard pour l'élaboration d'un ensemble de calibration et pour la validation croisée. Les 30% restants des échantillons non utilisés dans le modèle de calibrage PLS ont été utilisés pour produire un ensemble de validation externe pour chaque calibrage. L'ensemble d'échantillons a été sélectionné au hasard, avec des réaffectations utilisées pour garantir que les échantillons de l'ensemble de prédiction restent dans la plage des valeurs de référence de l'ensemble de formation. Pour le développement du modèle, la totalité ou une partie des données spectrales ont pu être utilisées. En effet, dans certains cas, seule l'étude d'une partie du spectre contenant une bande spectrale caractéristique d'un réactif ou d'un produit est nécessaire. Le prétraitement mathématique et les ajustements PLS ont été effectués à l'aide du logiciel The Unscrambler®X (version 10.3, CAMO, Trondheim, Norvège) ou à l'aide de l'environnement R Studio.

Pour réduire ou éliminer les facteurs non ciblés dans les spectres de l'échantillon, nous avons évalué les méthodes mathématiques de prétraitement suivantes : normalisation standard du vecteur (SNV), la correction multiplicative de la diffusion (MSC), dérivée première et dérivée seconde. La performance des modèles de calibration PLS résultants est quantifiée par le coefficient de détermination (R^2), l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et la déviation prédictive résiduelle (RPD).

Le coefficient de détermination ne dépend pas de l'échelle de la variable y et est donc particulièrement utile pour comparer directement des modèles basés sur différentes variables de réponse. Pour chaque modèle, deux coefficients R^2 ont été calculés : un pour les résultats de calibration de l'ensemble d'entraînement (R^2_{Cal}), et un pour la prédiction de l'ensemble de validation externe (R^2_{Pred}). R^2 est calculé par l'équation suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_{\text{expt}} - y_{\text{pred}})^2}{\sum y_{\text{expt}}^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

où y sont les valeurs expérimentales ou prédites.

Pour le RMSE, deux valeurs sont calculées pour chaque modèle, correspondant à l'étalonnage de l'ensemble de formation (RMSE_{Cal}) et à la prédiction de l'ensemble de test externe ($\text{RMSE}_{\text{Pred}}$). La RMSE est définie comme suit (Mevik et Cederkvist, 2004) :

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum(Y - \hat{Y})^2}{n}} \quad (\text{Eq. 6})$$

où Y se réfère aux valeurs mesurées expérimentalement, \hat{Y} est la valeur correspondante prédite par le modèle, et n est le nombre d'échantillons dans l'ensemble de formation (pour RMSE_{Cal}) ou dans l'ensemble de test (pour $\text{RMSE}_{\text{Pred}}$).

Le RPD a également été calculé pour chaque modèle afin de quantifier la prédiction basée sur l'ensemble d'échantillons de validation externe. Le RPD est défini comme l'écart-type des valeurs Y de l'ensemble de formation divisé par l'erreur standard de prédiction (SEP) (Wu et al. 2010), où la SEP est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$\text{SEP} = \sqrt{\frac{(\text{RMSE}_{\text{Pred}}^2 - \text{BIAS}^2)n}{n-1}} \quad (\text{Eq. 7})$$

où le BIAS est la moyenne arithmétique des erreurs de prédiction pour les échantillons de l'ensemble de test. Plus le RPD est élevé, plus le modèle est susceptible de prédire avec précision la composition chimique d'un nouvel ensemble d'échantillons. Des travaux antérieurs indiquent que la fourchette RPD 0,0-2,3 indique un modèle inutilisable, 2,4-3,0 indique un modèle utile uniquement pour un dépistage de qualité très grossière, 3,1-4,9 indique un modèle utile pour le dépistage de qualité, 5,0-6,4 indique un modèle utile pour le contrôle de qualité, et $> 6,5$ indique un modèle utile pour le contrôle de processus et toutes les applications mentionnées précédemment (Williams et al. 2001, Natsuga et al. 2006).

II.7 L'évaluation de l'activité antibactérienne

II.7.1 Le prélèvement et l'identification des souches

Le prélèvement du lait et la culture bactériologique ont été effectués de manière conventionnelle. Avant le prélèvement, les trayons ont été désinfectés, après élimination des premiers jets, puis à l'aide d'une gaze imbibée d'une solution alcoolisée à 70%. Au laboratoire, les échantillons de lait ont été étalés au minimum sur de la gélose trypticase soja enrichie de 5% de sang de mouton (BioMérieux, France), et parfois sur des milieux additionnels (d'orientation). Les géloses ont été incubées à 37 °C en atmosphères normales et en atmosphère enrichie en CO₂ en l'absence de pousse bactérienne observée. Les colonies ainsi cultivées ont été dénombrées, caractérisées (coloration de Gram), puis identifiées.

L'identification s'est faite à l'aide de deux méthodes en fonction du score de confiance. Premièrement, après le clonage, les colonies ont été identifiées en utilisant un système d'identification biochimique en microtubes API®/ID32 (BioMérieux), selon les instructions du fabricant. Les résultats ont été interprétés à partir de la base de données APIWEB® (BioMérieux). Les analyses sont arrêtées lorsque l'identification au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce était au moins supérieur à une précision de 99%, conformément à la coloration de Gram et aux tests biochimiques. Pour les scores de confiance inférieurs, l'identification a été réalisée à l'aide de la spectrométrie de masse à temps de vol par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF). Des surnageants de centrifugation bactérienne ont été placés sur une plaque cible polie (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne), puis les échantillons ont été analysés par un spectromètre de masse MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker Daltonics) avec le logiciel flexControl. L'identification a été basée sur le score le plus élevé pour la correspondance avec un spectre dans la base de données. Tous les isolats ont été stockés à -80 °C dans une solution contenant du glycérol (15%).

II.7.2 La mise en culture des bactéries

Les différentes souches bactériennes (isolats fournis par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse ou des souches de collection) sont conservées dans du lait glycérolé (15%) à -20 °C. Après décongélation, 50 µL sont mis en culture dans 5 mL de bouillon cœur-cerveille (BCC). Ces suspensions sont incubées à 37 °C sous agitation (≈120 rpm) jusqu'à ce que la croissance

bactérienne soit visible (milieu de culture trouble). La densité optique à 600 nm est alors mesurée pour chaque suspension. Les valeurs obtenues sont utilisées pour diluer les suspensions bactériennes afin d'obtenir des inocula bactériens standardisés à 1×10^6 UFC/mL. Les dilutions sont faites en utilisant du BCC et la relation $0,001 \text{ UA} = 1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$. Des dénombrements viables sont réalisés pour vérifier la concentration réelle de l'inoculum. Des facteurs de corrections peuvent alors être appliqués si l'inoculum est trop ou pas assez concentré.

II.7.3 La détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) servent à évaluer l'activité antibactérienne des différents corps gras ozonés et sont déterminées grâce à la méthode de microdilution (AFNOR 2007b). Des solutions de corps gras ozoné à différentes concentrations (entre 1,25 et 80 mg/mL) sont préparées dans du bouillon Mueller-Hinton. Pour permettre la dispersion du corps gras dans le milieu, 2% de Tween-80 sont ajoutés au bouillon. Les solutions sont réparties sur les microplaques selon le schéma présenté par la Figure 26. Cette méthode de remplissage des plaques permet de tester simultanément 4 corps gras ozonés et/ou 4 souches bactériennes différentes.

On peut observer sur la Figure 26 :

- Ligne 1 : solution ayant la plus forte concentration en corps gras ozoné (50 µL/puit)
- Lignes 2 à 7 : concentrations décroissantes en corps gras ozoné (50 µL/puit)
- Ligne 8 : bouillon Mueller-Hinton avec 2% de Tween-80 (50 µL/puit)

		1		2		3		4					
C (mg/mL)		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
40	1			Témoins négatifs									
20	2												
10	3												
5	4												
2,5	5												
1,25	6												
0,625	7												
	8	Témoins positifs											

Figure 26. Schéma de remplissage des microplaques servant à la détermination des CMI

Dans les colonnes grisées (C, F, I et L) 50 μL de BCC (témoins négatifs) sont ajoutés tandis que dans les autres colonnes, on ajoute 50 μL de suspension bactérienne. Le volume final contenu dans les puits est de 100 μL . Les suspensions bactériennes ont une concentration finale de 5×10^5 UFC/mL. Des dénombrements viables sont effectués pour s'assurer que la concentration finale de l'inoculum se rapproche de cette valeur. Les microplaques sont recouvertes d'un couvercle, scellées avec du parafilm puis placées à incuber à 37 °C pendant 24 ± 4 h. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de corps gras ozoné inhibant visiblement la croissance bactérienne (pas de trouble détecté à l'œil nu) (Figure 27).

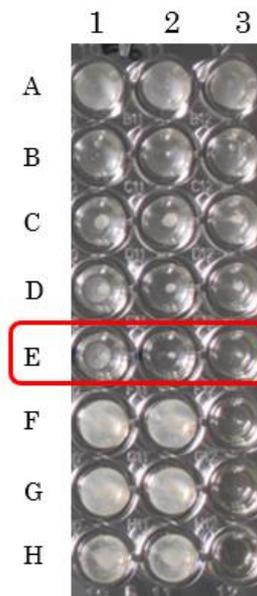


Figure 27. Exemple de détermination visuelle d'une CMI sur microplaque

II.7.4 La réalisation des antibiogrammes

La réalisation des antibiogrammes consiste à mettre une bactérie en présence d'un ou plusieurs agents antimicrobiens et de mesurer la croissance de la bactérie face à ces agents (Figure 28). La donnée obtenue est un diamètre d'inhibition, qui correspond à la distance entre l'agent antimicrobien et la première trace de croissance de la bactérie. Plus le rayon est petit, plus la bactérie va pousser proche de l'agent antimicrobien et plus la souche sera résistante à cet agent (et donc moins sensible). En comparant ce diamètre à des valeurs références pour chaque agent, on peut déterminer si la souche est classée résistante ou sensible à l'agent.

L'ensemble des antibiogrammes ont été réalisés en partenariat avec un laboratoire extérieur, LABOCEA (Ille-et-Vilaine, France).

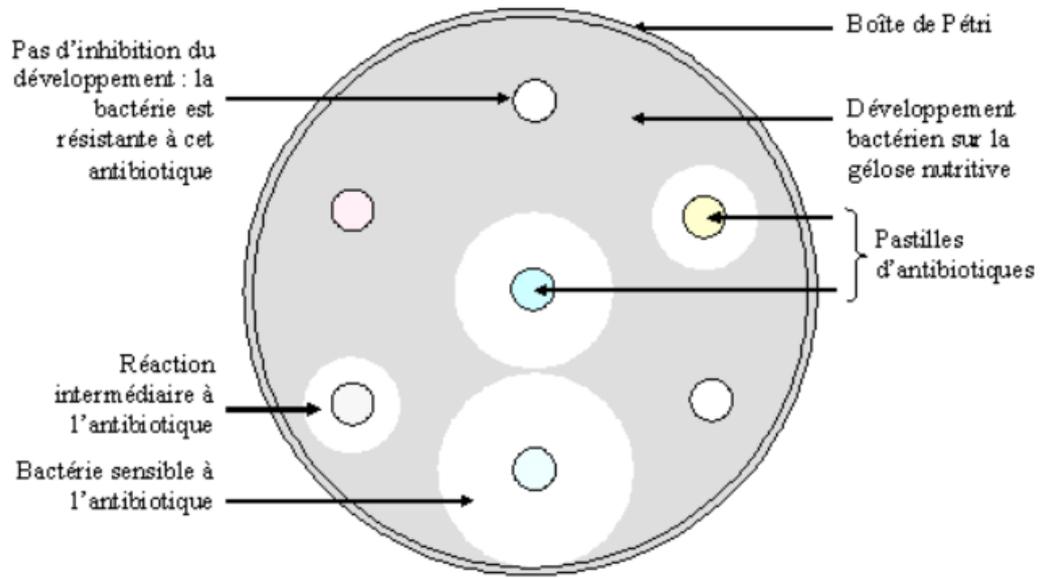


Figure 28. Schéma de principe d'un antibiogramme

**CHAPITRE III – ETUDE DE L’IMPACT DE SOLVANTS SUR
LA CINETIQUE ET LA NATURE DES PRODUITS
SYNTHETISES**

L'intérêt pour les huiles ozonées ne cesse d'augmenter notamment pour leurs propriétés antibactériennes qui couvrent un large spectre de pathologie. Il pourrait donc être intéressant d'envisager la synthèse de grandes quantités pour permettre de répondre à une demande croissante. Cependant, à la vue des procédures de synthèses existantes aujourd'hui, il n'est pas possible d'envisager des quantités supérieures à quelques centaines de grammes en une seule manipulation. Pour obtenir une quantité plus élevée de produit, il est nécessaire d'engager une synthèse en plus grande quantité d'huile en utilisant de plus grands réacteurs.

Une montée en échelle sur des réacteurs semi-continu est envisageable, cependant il s'agit d'un procédé à risque qui demande un équipement de haute technologie impliquant des difficultés techniques à grande échelle et des compétences en génie chimique adaptées. En effet la réaction d'ozonation sur les huiles végétales est exothermique et certains intermédiaires comme les ozonides sont explosifs (Schober 1995). Une alternative est possible avec la réalisation de la synthèse en flux continu. En effet, ce type de synthèse met en avant des réacteurs miniaturisés combinés les uns aux autres, ce qui permet de favoriser les échanges entre la phase gaz et la phase liquide. De plus, le fait de travailler avec ce type de réacteur permet de faciliter l'élimination de la chaleur produite à l'aide d'une surface d'échange de chaleur avec l'extérieur plus étendue. Nous avons dirigé nos recherches vers le système Low-Flow de Corning. Ce modèle de recherche pour un travail en laboratoire permet d'envisager une montée en échelle très rapide avec une adaptation des conditions de réactions optimales très efficaces. De plus, cette technologie utilise des réacteurs en forme de « cœur » qui permettent de réaliser des successions de flux laminaires et turbulents pour favoriser grandement les échanges gaz-liquides. Enfin, un échangeur de chaleur présent sur l'ensemble du système permet un contrôle efficace de la température et d'absorber les dégagements de chaleur lors de l'ozonation de matières grasses. Cette technologie de synthèse nécessite de pouvoir prélever la phase liquide à l'aide d'une pompe HPLC et d'assurer une circulation efficace dans l'ensemble du process. Cependant, les huiles végétales et les matières grasses avant et après ozonation sont des produits relativement visqueux et il est donc nécessaire d'ajouter un ou plusieurs solvants pour envisager l'ozonation en flux continu.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer un ou plusieurs co-solvants que l'on peut ajouter à l'huile de tournesol THO pour permette de réduire la viscosité tout au long du process d'ozonation. Une fois les co-solvants déterminés, nous avons étudié l'influence sur la cinétique de réaction et sur la nature des composés formés. Un plan de Doelhart à 2 facteurs

(composition de chacun des deux solvants déterminés) a tout d'abord été établi pour déterminer l'impact du taux d'acide nonanoïque et d'eau sur l'indice d'iode et l'indice de peroxyde du produit synthétisé. Ce plan d'expériences permet de créer un modèle précis du second ordre pour les réponses, à partir d'un nombre réduit d'expériences. Malgré tout, des manipulations supplémentaires ont été nécessaires pour obtenir des modèles robustes. L'ensemble des manipulations effectuées nous ont aussi permis d'observer l'impact des solvants sur des propriétés complémentaires telles que la consommation de l'ozone, la viscosité ou l'activité antibactérienne.

Enfin, nous avons pu dégager la composition d'un mélange qui possède des propriétés physiques intéressantes tout au long du process, tout en conservant des propriétés chimiques déterminées dans la littérature (Moureu et al. 2015b). C'est-à-dire obtenir un mélange liquide qui présente des indices chimiques similaires à ceux d'un mélange de 50 g d'huile THO et de 5 g d'eau (10% massique) ozoné pendant une durée de 4 heures ($II \approx 15 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ et $IP \approx 1900 \text{ méq d'oxygène actif/kg}$). Grâce à cette composition, nous avons pu développer les premiers tests sur le système Low-Flow de Corning.

III.1 Détermination des solvants et du domaine expérimental

III.1.1 Recherche d'un effet de dilution : ajout d'acide nonanoïque

L'une des premières exigences à l'ajout d'un solvant est de pouvoir modifier les propriétés physiques de notre produit avant et après réaction. L'acide nonanoïque présente un intérêt pour fluidifier les matières grasses avant ozonation et pour permettre de conserver cette propriété après réaction. Cet additif est en effet déjà utilisé dans l'industrie à grande échelle notamment pour l'ozonation de l'acide oléique et permet de réduire la viscosité du mélange après la formation d'ozonides (Gutsche et al. 2007, Godard 2012).

Dans un second temps, l'acide nonanoïque est un sous-produit de réaction lors de l'ozonation de chaînes grasses de type oléique (avec $R = C_8$) (Figure 29). C'est donc un produit qui ne sera pas soumis à une oxydation par l'ozone. En effet, la réactivité entre l'ozone et l'acide nonanoïque est très faible ($\leq 6.10^{-3} \text{ L/mol/s}$) (Bourgin 2011).

Ensuite, l'ajout d'eau conduit à une augmentation efficace de l'IP (Moureu et al. 2015b). Ce phénomène s'explique facilement par le mécanisme réactionnel et la formation d'hydroxy-hydroperoxydes en milieu aqueux (Figure 31).

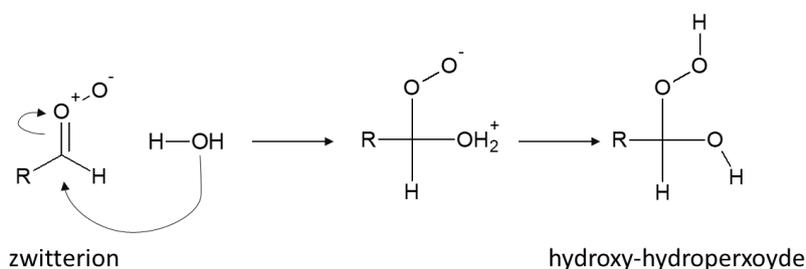


Figure 31. Formation d'hydroxy-hydroperoxydes en présence d'eau

Une étude préliminaire a donc été menée pour observer l'influence de l'ajout d'eau, d'ajout d'acide nonanoïque et de la combinaison des deux solvants pour pouvoir comparer les effets sur les propriétés chimiques et physiques.

Pour cette étude, nous avons réalisé des réactions d'ozonation selon les conditions opératoires suivantes :

- Quantité d'huile THO = 21 g
- Durée de réaction = 110 min
- Concentration en ozone = 65 g/m³
- Débit en ozone = 30 L/h

Nous avons ensuite ajouté de l'eau et/ou de l'acide nonanoïque selon les quantités suivantes :

- Essai 1 : aucun ajout
- Essai 2 : 2,1 g d'acide nonanoïque (10% massique)
- Essai 3 : 2,1 g d'eau (10% massique)
- Essai 4 : 2,1 g d'acide nonanoïque (10% massique) et 2,1 g d'eau (10% massique)

Les conditions ont été déterminées pour que la quantité d'ozone appliquée en fonction de la quantité d'huile soit similaire à des études précédemment effectuées (Moureu et al. 2015b) et que les résultats puissent être comparés. Tous les essais ont été réalisés en tripliquât puis un

II moyen et un IP moyen ont été déterminés et une comparaison avec l'huile THO non ozonée a été effectuée (Figure 32).

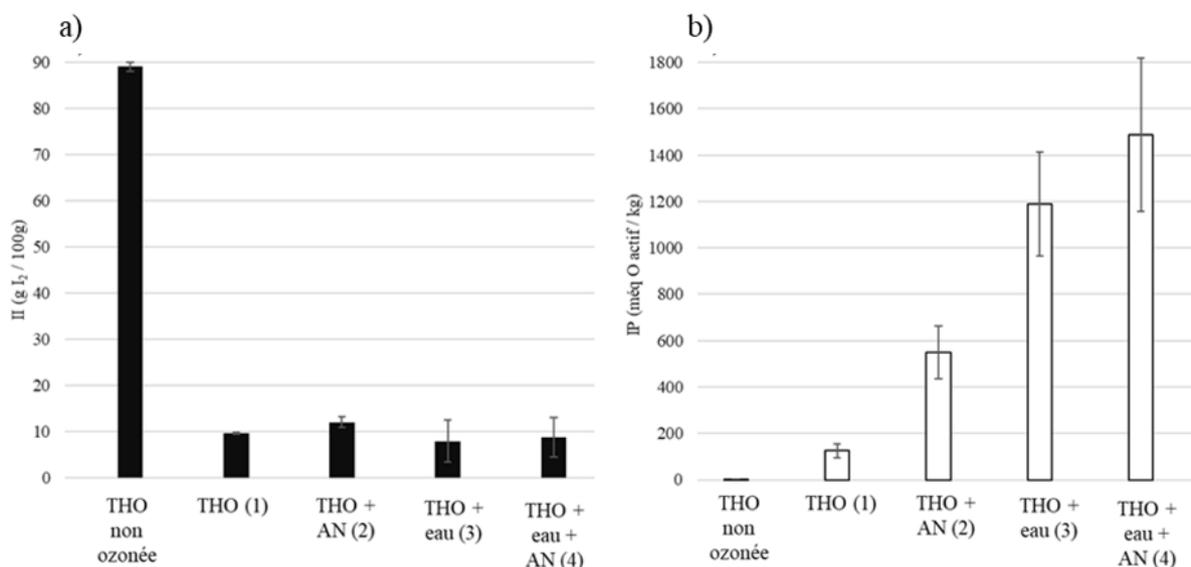


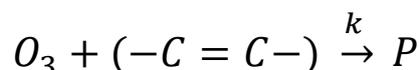
Figure 32. Indices chimiques déterminés pour l'huile THO non ozonée et différents mélanges soumis aux mêmes conditions d'ozonation, 110 min, $Q(\text{ozone}) = 30 \text{ L/h}$, $[\text{ozone}] = 65 \text{ g/m}^3$, (1) : 21 g THO, (2) 21 g THO et 2,1 g d'AN, (3) : 21 g THO et 2,1 g d'eau, (4) : 21 g

Tout d'abord, on observe une diminution efficace de l'II (figure 32a), quel que soit les essais 1 à 4, qui passe de 89 g I₂ / 100 g avant ozonation à des valeurs inférieures à 10 g I₂ / 100 g après 110 min de réaction. Les valeurs finales similaires d'II avec ou sans solvant (eau, acide nonanoïque) signifient que le milieu protique n'a pas d'impact sur le taux de consommation des insaturations par l'ozone.

Cependant, comme le montre l'évolution de l'IP (figure 32b), la composition finale du mélange réactionnel est différente. Les valeurs d'IP sont plus élevées avec l'ajout de composés protiques. En effet, cet indice évolue de 0,9 méq O actif / kg avant ozonation jusqu'à une valeur de 1487 méq O actif / kg en présence d'eau et d'acide nonanoïque. Cette augmentation est due à l'addition de l'ozone sur les insaturations entraînant la formation d'espèces oxygénées tels que les peroxydes. En milieu aprotique (essai 1), selon le mécanisme de Criegee, le molozonide (1,2,3 – trioxolane) est rapidement décomposé pour former des aldéhydes et des zwitterions induisant un IP faible. En milieu protique, les zwitterions réagissent avec l'eau ou l'acide nonanoïque. L'ajout d'eau dans le milieu favorise la formation d'hydroxy-hydroperoxydes qui contribuent par des réactions secondaires avec l'ozone à produire des espèces peroxydées et des

acides carboxyliques. La présence d'acide nonanoïque induit la formation d'alpha-hydroperoxyde. La combinaison des deux solvants permet d'augmenter la valeur de l'IP et donc la quantité globale de composés oxygénés. Ces résultats corroborent bien les attendus mécanistiques et montrent que l'association de différents solvants peut apporter une synergie pour augmenter la valeur d'IP.

En s'appuyant sur les propriétés d'adsorption de l'ozone gazeux en milieu liquide, on peut observer ici que quel que soit le milieu, l'ozone va être transféré de la phase gazeuse vers la phase liquide pour réagir avec les insaturations selon l'équation suivante :



avec k la constante cinétique de la réaction entre l'ozone et les insaturations, (-C=C-) les insaturations présentes dans le milieu et P le produit issu de cette réaction.

Les vitesses de consommation de l'ozone et des insaturations (respectivement r_{O_3} et $r_{c=c}$) sont donc généralement d'ordre 2 (ordre 1 par rapport à chacun des réactifs) (Roustan 2003) et peuvent s'écrire en fonction des concentrations en mol/L :

$$r_{O_3} = r_{c=c} = k * [O_3]_d * [-C=C-]$$

avec [-C=C-] qui représente la concentration en insaturations dans le milieu et $[O_3]_d$ la concentration en ozone dissous.

Enfin il apparaît que le produit formé lors de l'essai 4 est plus fluide que le produit formé lors de l'essai 3. Ainsi, l'acide nonanoïque (AN) va contribuer à la diminution de la viscosité du produit.

Dans la suite de l'étude, il apparaît donc intéressant d'étudier l'influence des deux composés simultanément. Bien que l'ajout d'acide nonanoïque permette de réduire la viscosité, il apparaît nécessaire d'ajouter de l'eau pour atteindre des valeurs d'IP plus élevée. Un plan de Doelhart à 2 facteurs a tout d'abord été mis en place pour évaluer l'influence des solvants sur les indices chimiques II et IP tout en limitant le nombre d'expériences. Les valeurs d'IP et d'II sont les deux données continues sur le domaine d'étude qui seront mesurables de manière répétable et reproductible pour l'ensemble des expériences. Pour mettre en place le plan d'expériences, il a tout d'abord fallu déterminer les domaines expérimentaux des deux facteurs.

III.1.3 Détermination des domaines expérimentaux des deux facteurs

III.1.3.1 Détermination du domaine expérimental de la quantité d'eau

Pour déterminer le domaine expérimental de la quantité d'eau, nous avons réalisé une étude préliminaire. De l'huile THO seule a été ozonée selon les conditions opératoires suivantes :

- Quantité d'huile THO = 50 g
- Durée de la réaction = 4 h
- Concentration en ozone = 65 g/m³
- Débit en ozone = 30 L/h

Différentes quantités d'eau ont été ajoutées en fonction des essais pour observer l'influence de ce solvant :

- Essai 1 : aucun ajout
- Essai 2 : 2,5 g d'eau (5% massique)
- Essai 3 : 5 g d'eau (10% massique)
- Essai 5 : 10 g d'eau (20% massique)

Les essais ont été réalisés en tripliquât et les indices chimiques II et IP ont été évalués à l'aide de dosages chimiques (Figure 33).

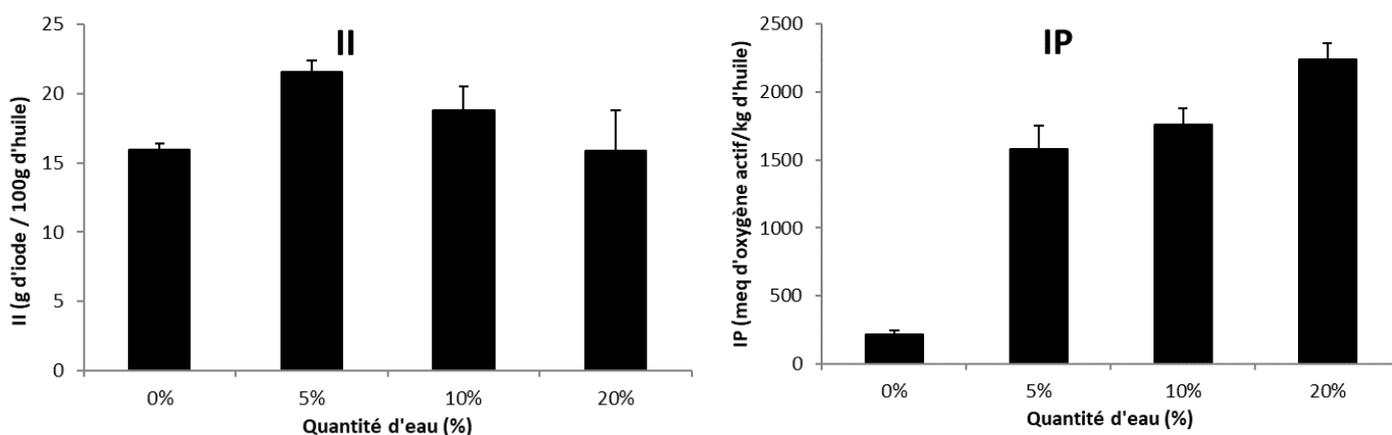


Figure 33. Evolution de l'II et l'IP en fonction de la quantité d'eau

Nous pouvons observer ici que la quantité d'eau n'a pas d'influence significative sur l'évolution de la valeur de l'II et que quelle que soit la quantité nous obtenons des valeurs comprises entre 15 et 22 g I₂ / 100 g. En ce qui concerne les valeurs d'IP, on observe qu'un

faible ajout d'eau (5% massique) permet de multiplier la valeur de l'IP par plus de 5. L'impact de la quantité d'eau n'apparaît pas linéaire. La réaction entre l'ozone et les insaturations n'est donc pas dépendante de la nature du milieu mais celui-ci influence la nature des produits obtenus. De plus, il a également été observé que la viscosité est d'autant plus élevée que la quantité d'eau dans le milieu est grande, la texture du mélange pouvant conduire à l'obtention de pâtes. Ce phénomène est expliqué par la présence dans le milieu réactionnel de molécules de masses molaires élevées, comme des dimères ou polymères de peroxydes dont la formation semble favorisée par la présence d'eau. Un ajout d'eau trop élevé n'a donc pas d'intérêt pour notre étude et nous nous limiterons à des proportions de 0 à 20% massique par rapport à la quantité d'huile, soit de 0 à 10 g d'eau pour une quantité de 50 g d'huile THO.

III.1.3.2 Détermination du domaine expérimental de la quantité d'acide nonanoïque

En ce qui concerne l'acide nonanoïque, le domaine a été défini en fonction des données industrielles à notre disposition et des limites imposées par notre procédé. En effet, l'acide nonanoïque est notamment utilisé au ratio 1:2 pour une dilution lors de l'ozonation de l'acide oléique (Gutsche et al. 2007). De plus, notre réacteur semi-continu possède une contenance maximale en réactif de 80 mL. Nous avons donc décidé d'étudier des compositions allant de 0 à 15 g d'acide nonanoïque ce qui nous a permis d'atteindre un mélange limite de 75 g (50 g THO + 10 g d'eau + 15 g d'AN).

III.2 Utilisation des plans d'expériences pour identifier l'impact des solvants

III.2.1 Plan de Doehlert à 2 facteurs

Outre les avantages communs d'un plan expérimental multivarié (comme l'optimisation et l'évaluation des paramètres ayant le plus d'impact et de leurs effets positifs ou négatifs), un plan de Doehlert a été choisi pour sa grande efficacité (plan expérimental avec un nombre limité d'expériences). Il peut facilement optimiser le système et décrire une interaction non linéaire en raison de son modèle d'ajustement du second ordre. C'est aussi une conception adaptable, en raison de la possibilité de se déplacer dans le domaine expérimental.

III.2.1.1 Détermination des modalités expérimentales pour le plan de Doelhart

Les valeurs des domaines expérimentaux pour les deux facteurs étudiés sont résumées dans le Tableau 10 :

Tableau 10. Domaines expérimentaux des facteurs étudiés

Variable	Facteur	Unité	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
X ₁	Quantité d'eau	g	0	5	10
X ₂	Quantité d'acide nonanoïque	g	0	7,5	15

Les expériences ont ensuite pu être menées selon le plan d'expériences établi. L'ensemble des réactions ont été conduites selon les conditions opératoires suivantes fixes :

- Quantité d'huile THO : 50 g
- Durée de réaction : 4h
- Concentration en ozone : 65 g/m³
- Débit d'ozone : 30 L/h
- Température du circuit d'eau dans le réacteur : 27 °C

Les expériences menées au cours de ce plan d'expériences sont présentées dans le Tableau 11 :

Tableau 11. Expériences selon le plan de Doelhart à 2 facteurs

Essai	X ₁	Quantité d'eau (g)	X ₂	Quantité d'AN (g)
1	0	5	0	7,5
2	1	10	0	7,5
3	0,5	7,5	0,866	14
4	- 0,5	2,5	0,866	14
5	- 1	0	0	7,5
6	- 0,5	2,5	- 0,866	1
7	0,5	7,5	- 0,866	1

Une visualisation schématique permet de placer facilement les 7 essais en fonction des compositions (Figure 34) :

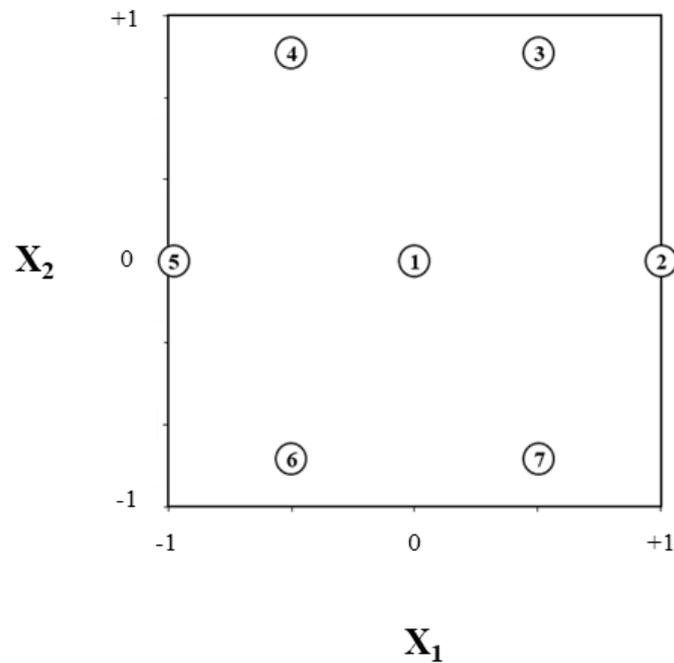


Figure 34. Représentation des expériences issues du plan de Doehlert par rapport à l'ensemble du domaine expérimental

III.2.1.2 Réponses obtenues et détermination des coefficients de Doehlert

Une fois les compositions des différents essais déterminées, les indices chimiques ont été définis comme les réponses à étudier :

- L'indice d'iode (Y_1)
- L'indice de peroxyde (Y_2)

Les 7 essais ont été réalisés en tripliquât et un II moyen ainsi qu'un IP moyen ont été déterminés par dosages volumétriques (Tableau 12).

Tableau 12. Détermination des indices chimiques moyens des essais du plan d'expériences, DS : déviation standard

Essai	Quantité d'eau (g)	Quantité d'AN (g)	II moyen ± DS (g I ₂ / 100 g) (Y ₁)	IP moyen ± DS (még O actif/kg) (Y ₂)
1	5	7,5	6,92 ± 0,91	2198,55 ± 102,25
2	10	7,5	5,63 ± 0,65	2248,21 ± 277,95
3	7,5	14	9,08 ± 0,82	2038,61 ± 160,35
4	2,5	14	9,86 ± 0,73	2313,67 ± 78,89
5	0	7,5	4,07 ± 0,69	1250,86 ± 123,74
6	2,5	1	12,40 ± 1,08	1582,87 ± 112,28
7	7,5	1	7,28 ± 0,98	2503,24 ± 223,86

On observe une diminution efficace de l'II pour l'ensemble des essais. Avant ozonation, l'huile THO présente un II de 89 g I₂ / 100 g. On a donc consommé de 86,1% (essai 6) à 95,4% (essai 5) des insaturations présentes dans le milieu. L'ozone réagit donc efficacement avec les insaturations sur l'ensemble des réactions effectuées et les valeurs obtenues sont de grandeurs similaires à celle d'une THO ozonée seule 4 h (Moureu et al. 2015b). L'essai 6 avec de faibles quantités en eau et en acide nonanoïque présente l'II le plus élevé.

En ce qui concerne l'IP, les valeurs sont réparties entre 1250 et 2500 még d'O actif / kg, ce qui montre que l'IP semble être plus impacté par les différentes quantités d'eau et d'acide nonanoïque. Comme il a été montré précédemment, l'essai 5, avec notamment l'absence d'eau, présente l'IP le plus faible tandis que la présence d'eau augmente la valeur de l'IP.

Chaque réponse peut être représentée par une fonction mathématique du second degré :

$$Y_i = f(X_1, X_2) = a_0 + a_1 * X_1 + a_2 * X_2 + a_{12} * X_1 * X_2 + a_{11} * X_1^2 + a_{22} * X_2^2$$

avec :

Y_i : la réponse (indices chimiques)

X_1 : quantité d'eau (en g)

X_2 : quantité d'acide nonanoïque (en g)

Ces coefficients permettent d'expliquer différents phénomènes :

- a_0 représente un terme constant qui correspond à la réponse au centre du domaine d'expériences
- a_1 et a_2 représentent l'influence directe des différents facteurs sur la réponse Y
- a_{12} représente l'interaction possible entre les deux facteurs
- a_{11} et a_{22} représentent les interactions du second degré

Les valeurs des coefficients de chaque équation ont été calculées par régression multilinéaire sur les données obtenues expérimentalement (Tableau 13).

Tableau 13. Coefficients des équations du second degré pour les deux indices chimiques

Coefficients	Valeurs pour l'indice d'iode	Valeurs pour l'indice de peroxyde
a_0	6,92	2198,55
a_1	-0,47	440,00
a_2	-0,21	76,78
a_{12}	2,51	-689,67
a_{11}	-2,07	-449,01
a_{22}	4,34	31,03

III.2.1.3 Fiabilité des modèles de prédiction développés avec le plan de Doelhart

Les différents coefficients calculés permettent d'obtenir deux équations polynomiales de second ordre pour les réponses Y_1 et Y_2 . En appliquant les valeurs de X_1 et X_2 dans les deux équations polynomiales, des valeurs dites prédites ont été obtenues pour les deux indices chimiques et comparées avec les valeurs obtenues expérimentalement.

III.2.1.3.1 Modèle de prédiction de l'indice d'iode à l'aide du plan de Doelhart

Les compositions de essais 1 à 7 ont permis de prédire des valeurs d'II que nous avons comparées avec les valeurs mesurées (Tableau 14).

Tableau 14. Différences observées entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites pour l'indice d'iode

Essai	Indice d'iode (g I ₂ / 100 g)			Erreur (%)
	Mesure	Prédiction	Différence	
1	6,92	6,92	0,00	0
2	5,63	4,38	-1,25	22,15
3	9,08	10,32	1,24	13,66
4	9,86	8,61	-1,25	12,65
5	4,07	5,31	1,24	30,53
6	12,40	11,15	-1,25	10,06
7	7,28	8,51	1,23	16,95

On constate ici que les différences sont plutôt faibles en valeur absolue avec une différence maximale de 1,39 g I₂ / 100 g. Cependant, bien que ces valeurs soient faibles, elles peuvent représenter jusqu'à 30% d'erreur, ce qui reste assez conséquent. Il n'y a pas de tendance à sous-estimer ou surestimer la valeur de l'II.

En représentant, les valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées (Figure 35), la valeur du R² de 0,802 montre bien un manque de précision dans le modèle développé.

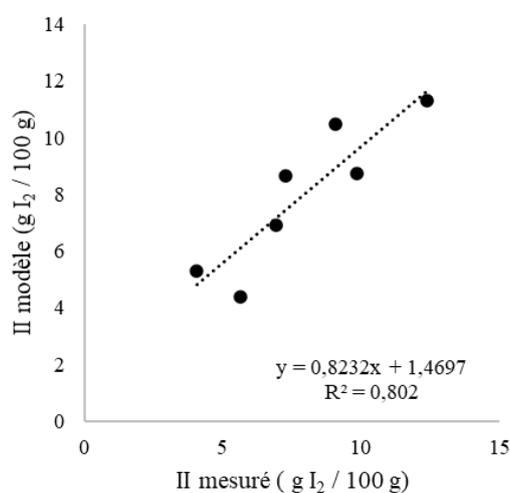


Figure 35. II prédit en fonction de l'II mesuré

III.2.1.3.2 Modèle de prédiction de l'indice de peroxyde à l'aide du plan de Doelhart

Les compositions des essais 1 à 7 ont permis de prédire des valeurs d'IP que nous avons comparées avec les valeurs mesurées (Tableau 15).

Tableau 15. Différences observées entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites pour l'indice de peroxyde

Essai	Indice de peroxyde (még O actif / kg)			Erreur (%)
	Mesure	Prédiction	Différence	
1	2198,55	2198,55	0	0
2	2248,21	2189,53	-58,68	2,68
3	2038,61	2097,42	58,81	2,80
4	2313,67	2254,68	-58,99	2,62
5	1250,86	1309,53	58,67	4,48
6	1582,87	1524,44	-58,43	3,83
7	2503,24	2561,70	58,46	2,28

On observe que les différences obtenues sont très faibles en termes de valeurs absolues et en termes de pourcentages d'erreur (moins de 5% d'erreur). Ainsi le modèle présente une précision avérée, que l'on peut aussi constater avec la représentation des valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées notamment avec un R² de 0,98 (Figure 36). Il n'y a pas de tendance à sous-estimer ou surestimer la valeur de l'IP.

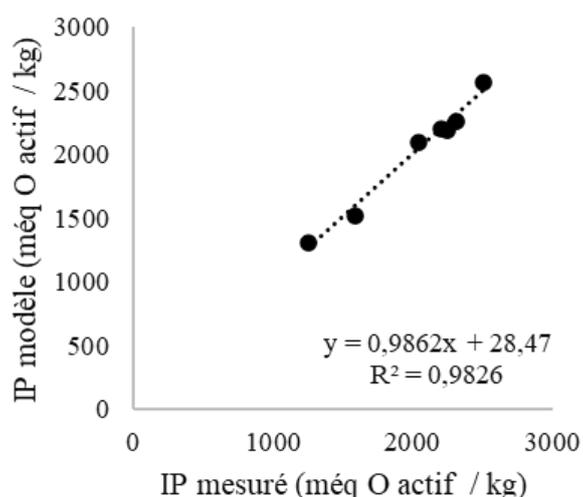


Figure 36. IP prédit en fonction de l'IP mesuré

III.2.1.4 Analyse des variances pour le plan de Doelhart

La différence entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites est appelée résidu qui suit donc la relation suivante :

$$Y_i = M_i + r_i$$

Avec :

Y_i : réponse mesurée expérimentalement, (II (i=1) ou IP (i=2))

M_i : réponse calculée à partir du modèle (II (i=1) ou IP (i=2))

r_i : résidu entre les deux mesures, (II (i=1) ou IP (i=2))

Les analyses classiques de variances ne font pas intervenir les réponses mais les différences entre les réponses et leurs moyennes \hat{Y}_i , soit $(Y_i - \hat{Y}_i)$ et $(M_i - \hat{Y}_i)$. Ces termes peuvent être isolés à partir de la relation précédente sur le résidu en soustrayant \hat{Y}_i , on obtient alors :

$$Y_i - \hat{Y}_i = M_i - \hat{Y}_i + r_i$$

On élève ensuite les termes au carré et on réalise la somme sur toutes les réponses obtenues (on suppose donc n essais), ce qui donne dans notre cas la relation :

$$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (M_i - \hat{Y}_i)^2 + \sum_{i=1}^n r_i^2$$

On a donc réalisé une analyse de variance (ou test ANOVA) entre le modèle corrigé de la moyenne et les résidus, soit sur les facteurs $(M_i - \hat{Y}_i)$ et r_i . Cette analyse nous a permis d'observer si le modèle proposé était significatif et si les réponses calculées ont été statistiquement significatives.

Pour cette analyse, le degré de liberté des deux groupes était nécessaire. Le degré de liberté (ddl) de la variation du modèle corrigé de la moyenne correspond au nombre de coefficients calculés ($a_0, a_1 \dots$) moins un. Pour la variation des résidus, le degré de liberté est égal au nombre de réponses obtenus moins le nombre de coefficients. Ensuite, la variance, qui est aussi appelée « carré moyen » est déterminée par le rapport entre la somme des carrés et le degré de liberté. Enfin, un test F (ou test de Fisher) est effectué pour confirmer ou non que le

modèle statistique soit représentatif ou non de la réalité. A partir de la valeur obtenue pour F, généralement égale au rapport entre les variances du modèle et des résidus, on peut déterminer une valeur de p qui correspond à la probabilité d'accepter la valeur du modèle alors qu'elle est fausse. Finalement, plus la valeur de p est faible et plus le modèle proposé est significatif. De la même manière, l'analyse de variance a été effectuée sur les coefficients calculés pour le modèle afin de déterminer les coefficients significatifs.

Les résultats obtenus pour nos deux modèles sont représentés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Analyse de la variance des modèles quadratiques de surface de réponse obtenus avec le plan d'expériences de Doelhart

Modèle	Indice d'iode		Indice de peroxyde	
	R ²			
		0,801		0,983
	Valeur p	0,684		0,222
Coefficients		Valeur p		
constante	a ₀	0,264		0,042
m _{eau}	a ₁	0,836		0,119
m _{AN}	a ₂	0,923		0,524
m _{eau} X m _{eau}	a ₁₁	0,677		0,238
m _{AN} X m _{AN}	a ₂₂	0,452		0,889
m _{eau} X m _{AN}	a ₁₂	0,606		0,150

On constate donc que pour les deux modèles, les valeurs des réponses calculées ne sont pas statistiquement significatives. De même, aucun coefficient, hormis la constante a₀ pour le modèle de l'IP, ne ressort comme significatif car aucune valeur de p n'est inférieure à 0,05. Il est donc difficile de considérer ces modèles comme utilisables pour étudier l'impact des solvants sur l'ozonation d'huile THO. Nous avons donc décidé de réaliser un plan d'expériences étendu en augmentant notamment le nombre d'essais pour mettre au point des modèles plus robustes.

III.2.2 Plan de surface de réponse étendu

III.2.2.1 Détermination des modalités expérimentales pour le plan de surface étendu

Nous avons conservé les mêmes facteurs et le même domaine expérimental que précédemment ainsi que les essais 1 à 7. Les modalités expérimentales des essais supplémentaires ont notamment été fixées de manière à pouvoir évaluer plus précisément l'influence de l'ajout d'acide nonanoïque sur la consommation de l'ozone. Les compositions déterminées sont présentées dans le Tableau 17.

Tableau 17. Modalités expérimentales pour le plan de surface de réponse personnalisé

Essai	X ₁	Quantité d'eau (g)	X ₂	Quantité d'AN (g)
1	0	5	0	7,5
2	1	10	0	7,5
3	0,5	7,5	0,866	14
4	-0,5	2,5	0,866	14
5	-1	0	0	7,5
6	-0,5	2,5	-0,866	1
7	0,5	7,5	-0,866	1
A	-0,5	2,5	-0,333	5
B	-0,5	2,5	0,333	10
C	0	5	-1	0
D	0	5	-0,333	5
E	0	5	0,333	10
F	0	5	1	15
G	1	10	-1	0
H	1	10	-0,33	5
I	1	10	0,333	10
J	1	10	1	15

La Figure 37 permet de visualiser la disposition des nouvelles modalités expérimentales étudiées (en bleu) par rapport aux essais 1 à 7. Les conditions opératoires sont similaires aux manipulations précédentes. Une fois l'ensemble des manipulations effectuées en tripliquât, nous avons procédé à l'analyse des indices chimiques.

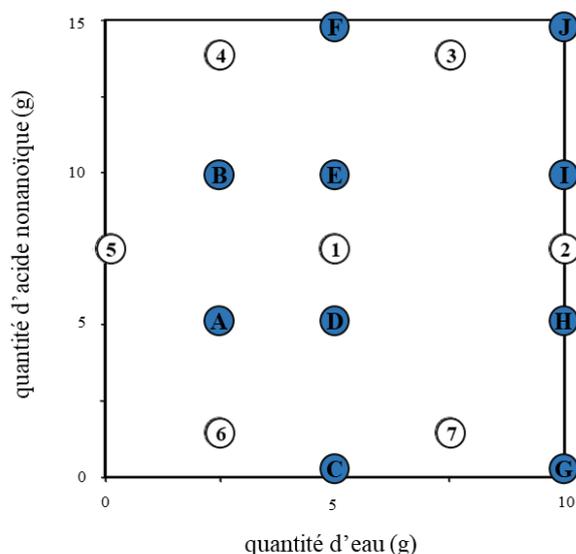


Figure 37. Représentation des modalités expérimentales des essais du plan de Doelhart (1 à 7) et des essais complémentaires (A à J, en bleu)

III.2.2.2 Réponses obtenues et détermination des coefficients pour le plan de surface étendu

Une fois les compositions des différents essais déterminées, les indices chimiques ont été définis comme les réponses à étudier :

- L'indice d'iode (Y_1)
- L'indice de peroxyde (Y_2)

Les 10 essais complémentaires ont été réalisés en tripliquât et une valeur d'II moyen ainsi qu'une valeur d'IP moyen ont été déterminées par dosages volumétriques (Tableau 18).

On observe encore une diminution efficace des valeurs d'II pour l'ensemble des essais. Les insaturations présentes dans le milieu ont été consommées de 85,2% (essai C) à 95,5% (essai I). L'ozone réagit donc efficacement avec les insaturations sur l'ensemble des réactions effectuées. L'essai C qui présente une absence d'acide nonanoïque et une faible quantité d'eau possède l'II le plus élevé. En ce qui concerne l'IP, les valeurs des essais supplémentaires sont comprises dans la gamme des essais du plan de Doelhart.

Tableau 18. Détermination des indices chimiques moyens des essais du plan d'expériences personnalisé, DS : déviation standard

Essai	Quantité d'eau (g)	Quantité d'AN (g)	II moyen ± DS (g I ₂ / 100 g)	IP moyen ± DS (még O actif / kg)
1	5	7,5	6,92 ± 0,91	2198,55 ± 102,25
2	10	7,5	5,63 ± 0,65	2248,21 ± 277,95
3	7,5	14	9,08 ± 0,82	2038,61 ± 160,35
4	2,5	14	9,86 ± 0,73	2313,67 ± 78,89
5	0	7,5	4,07 ± 0,69	1250,86 ± 123,74
6	2,5	1	12,40 ± 1,08	1582,87 ± 112,28
7	7,5	1	7,28 ± 0,98	2503,24 ± 223,86
A	2,5	5	5,29 ± 0,89	1563,48 ± 125,15
B	2,5	10	5,79 ± 0,75	1755,70 ± 135,26
C	5	0	13,18 ± 1,02	2349,50 ± 201,28
D	5	5	6,93 ± 0,86	2268,10 ± 189,56
E	5	10	6,73 ± 0,79	2026,08 ± 142,15
F	5	15	8,27 ± 0,83	2002,90 ± 138,69
G	10	0	8,91 ± 0,91	2237,27 ± 148,68
H	10	5	6,49 ± 0,78	2116,25 ± 157,81
I	10	10	4,01 ± 0,64	2276,58 ± 201,28
J	10	15	10,06 ± 1,08	2151,53 ± 197,65

De même que précédemment, les réponses obtenues peuvent s'écrire comme la combinaison de différents facteurs. Pour les différencier, nous les nommons ici b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} , b_{22} et b_{12} . La significativité des coefficients reste cependant la même :

- b_0 représente un terme constant qui correspond à la réponse au centre du domaine d'expériences
- b_1 et b_2 représentent l'influence directe des différents facteurs sur la réponse Y
- b_{12} représente l'interaction possible entre les deux facteurs
- b_{11} et b_{22} représentent les interactions du second degré

Les valeurs des coefficients de chaque équation ont été calculées par régression multilinéaire sur les données obtenues expérimentalement (Tableau 19).

Tableau 19. Coefficients des équations du second degré pour les deux indices chimiques

Coefficients	Valeurs pour l'indice d'iode	Valeurs pour l'indice de peroxyde
b ₀	6,13	2127,21
b ₁	-0,14	467,05
b ₂	-1,06	38,89
b ₁₂	1,44	-219,37
b ₁₁	-1,33	-418,06
b ₂₂	4,85	59,32

III.2.2.3 Fiabilité des modèles de prédictions pour le plan de surface étendu

Les différents coefficients calculés permettent d'obtenir deux équations polynomiales de second ordre pour les réponses Y₁ et Y₂. En appliquant les valeurs de X₁ et X₂ dans les deux équations polynomiales, des valeurs dites prédites ont été obtenues pour les deux indices chimiques et comparées avec les valeurs obtenues expérimentalement.

III.2.2.3.1 Modèle de prédiction de l'indice d'iode pour le plan de surface étendu

Les compositions de essais 1 à 7 et A à J ont permis de prédire des valeurs d'II que nous avons comparées avec les valeurs mesurées (Tableau 20). On constate des différences faibles en valeurs avec une erreur maximale de 2,37 g I₂ / 100 g. Cependant, cette erreur peut représenter jusqu'à 32% de la valeur totale. On peut émettre l'hypothèse que cette erreur est due aux faibles valeurs d'II obtenues sur toute l'étendue du domaine expérimental. La Figure 38 permet de visualiser que la précision du modèle n'est pas parfaite, cependant, il n'a pas de tendance à sous-estimer ou surestimer la valeur de l'II.

Tableau 20. Différences obtenues entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées pour l'indice d'iode

Essai	Indice d'iode (g I ₂ / 100 g)			Erreur (%)
	Mesure	Prédiction	Différence	
1	6,92	6,13	-0,79	11,49
2	5,63	4,65	-0,98	17,42
3	9,08	9,06	-0,02	0,23
4	9,86	7,95	-1,91	19,34
5	4,07	4,94	0,87	21,31
6	12,40	11,05	-1,35	10,91
7	7,28	9,65	2,37	32,61
A	5,29	6,98	1,69	31,98
B	5,79	5,80	0,01	0,22
C	13,18	12,04	-1,14	8,66
D	6,93	7,00	0,07	1,07
E	6,73	6,30	-0,43	6,37
F	8,27	9,91	1,64	19,81
G	8,91	9,12	0,21	2,36
H	6,49	5,05	-1,44	22,15
I	4,01	5,30	1,29	32,22
J	10,06	9,88	-0,18	1,83

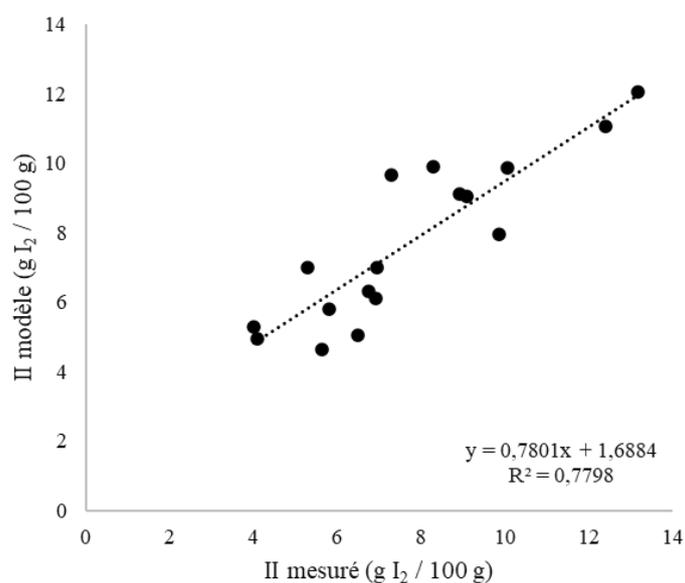


Figure 38. II prédit en fonction de l'II mesuré

III.2.2.3.2 *Modèle de prédiction de l'indice de peroxyde pour le plan de surface étendu*

Les compositions des essais 1 à 7 et A à J ont permis de prédire des valeurs d'IP, valeurs comparées aux valeurs mesurées (Tableau 21).

Tableau 21. Différences entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées pour l'indice de peroxyde

Essai	Indice de peroxyde (még O actif / kg)			Erreur (%)
	Mesure	Prédiction	Différence	
1	2198,55	2127,21	-71,34	3,24
2	2248,21	2176,20	-72,01	3,20
3	2038,61	2239,40	200,79	9,85
4	2313,67	1962,32	-351,35	15,19
5	1250,86	1242,10	-8,76	0,70
6	1582,87	1705,00	122,13	7,72
7	2503,24	2362,02	-141,22	5,64
A	1563,48	1746,60	183,12	11,71
B	1755,70	1844,66	88,96	5,07
C	2349,50	2147,65	-201,85	8,59
D	2268,10	2120,84	-147,26	6,49
E	2026,08	2146,50	120,42	5,94
F	2002,90	2225,42	222,52	11,11
G	2237,27	2416,01	178,74	7,99
H	2116,25	2242,22	125,97	5,95
I	2276,58	2123,10	-153,48	6,74
J	2151,53	2055,04	-96,49	4,48

La première observation porte sur le pourcentage d'erreur de la prédiction, l'erreur peut atteindre 15% alors que le modèle de Doelhart n'atteignait pas plus de 5% d'erreur. Le modèle développé ici apparaît donc moins précis. La figure 39 montre bien cette dispersion avec un R² de 0,74. Il n'y a pas de tendances à sous-estimer ou surestimer la valeur de l'IP.

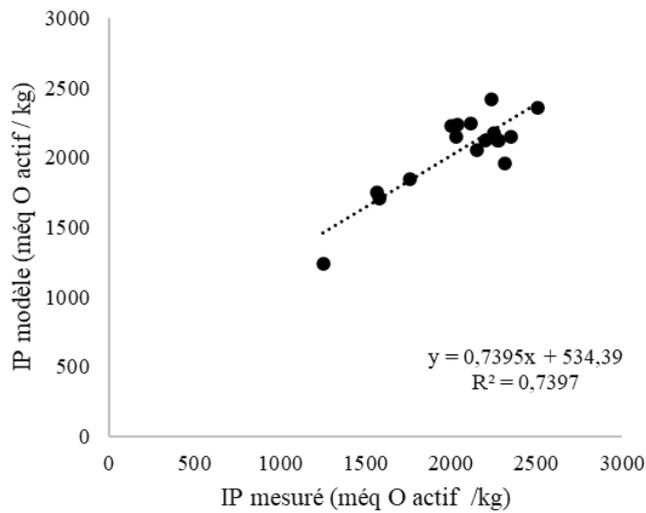


Figure 39. IP prédit en fonction de l'IP mesuré

III.2.2.4 Analyse des variances pour le plan de surface étendu

En reprenant la méthode précédemment évoquée, nous avons réalisé une analyse de la variance du modèle et des différents coefficients du modèle quadratique mis au point (Tableau 22).

Tableau 22. Analyse de la variance des modèles quadratiques de surface de réponse obtenus avec le plan d'expériences personnalisé

Modèle	Indice d'iode		Indice de peroxyde	
	R ²			
	R ²	0,780	0,740	
	Valeur p	0,002	0,006	
Coefficients		Valeur p		
constante	b ₀	0,000	0,000	
m _{eau}	b ₁	0,839	0,000	
m _{AN}	b ₂	0,102	0,644	
m _{eau} X m _{eau}	b ₁₁	0,223	0,013	
m _{AN} X m _{AN}	b ₂₂	0,000	0,647	
m _{eau} X m _{AN}	b ₁₂	0,157	0,121	

Bien que les nouveaux modèles soient apparus moins précis, on peut donc affirmer qu'ils sont malgré tout significatifs car les valeurs p sont inférieures à 0,06%. Par conséquent,

les valeurs des réponses calculées par les modèles ont été statistiquement significatives. On peut toutefois noter un manque de précision sur les valeurs obtenues.

Concernant les différents termes des modèles, lorsque leurs valeurs p ont été inférieures à 0,05, on peut considérer ces termes comme significatifs. Pour le modèle de l'indice d'iode, seuls les termes b_0 et b_{22} sont significatifs. En revanche, dans le cas de l'indice de peroxyde, les termes significatifs sont b_0 , b_1 et b_{11} . On observe donc que certains facteurs ne sont pas significatifs pour expliquer la variation des indices chimiques.

Les équations peuvent donc être simplifiées de la manière suivante :

$$Y_1 = 6,13 + 4,85 * (X_2)^2$$

$$Y_2 = 2127,21 + 467,05 * X_1 - 418,06 * (X_1)^2$$

Les effets de chaque facteur seront décrits, par la suite, grâce aux surfaces de réponse.

III.2.3 Illustrations de l'effet des facteurs sur les différentes propriétés du mélange

III.2.3.1 Effets des facteurs sur l'indice d'iode

Pour donner suite aux observations précédentes, on peut donc affirmer que l'acide nonanoïque est le seul facteur qui possède un impact sur l'évolution de l'II dans l'ensemble du domaine expérimental. L'ajout d'eau a déjà prouvé avoir peu d'impact sur la cinétique de consommation des insaturations (Moureu et al. 2015b), ce qui est cohérent avec nos résultats. Puisque notre modèle est significatif, on peut évaluer l'influence de la quantité de solvants sur l'II à l'aide des mesures prédites. En appliquant l'équation simplifiée de l'indice d'iode, obtenue précédemment, aux quantités d'acide nonanoïque, on obtient la représentation graphique suivante (Figure 40).

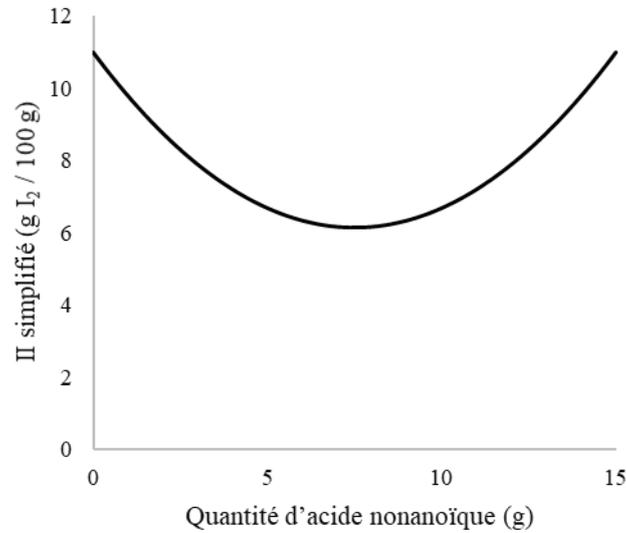


Figure 40. II simplifié en fonction de la quantité d'acide nanoïque

Une explication possible de cette évolution est liée à la relation entre les valeurs d'II et la consommation des insaturations par l'ozone. La vitesse de réaction qui entre en jeu ici suit la relation :

$$r_{O_3} = r_{C=C} = k * [O_3]_d * [-C=C-]$$

On peut représenter l'influence de l'ajout d'acide nanoïque sur la vitesse de réaction à l'aide de la Figure 41 suivante.

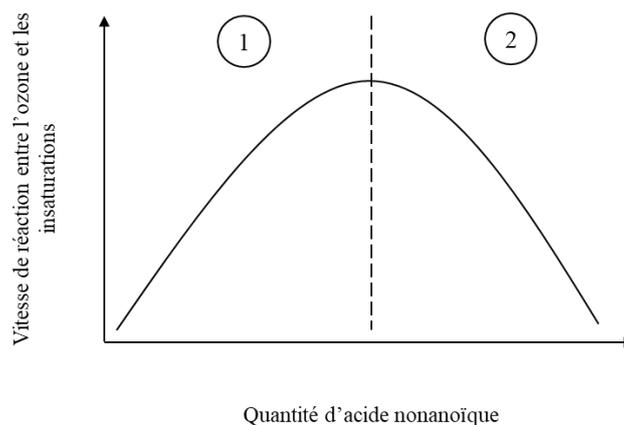


Figure 41. Représentation de l'évolution de la réactivité entre l'ozone et les insaturations en fonction de la quantité d'acide nanoïque

On peut suggérer la présence des deux phénomènes suivants :

(1) Une faible quantité d'acide nonanoïque va favoriser la réaction entre l'ozone et les insaturations en modifiant la nature du milieu et permettre une meilleure solubilisation de l'ozone. On observe ainsi une augmentation de la concentration en ozone dans le milieu. On améliore ainsi la vitesse de réaction et on obtient une meilleure consommation des insaturations et donc la valeur de l'II va diminuer. Ce phénomène va s'observer jusqu'à une quantité d'acide optimale.

(2) En présence d'une quantité trop importante d'acide nonanoïque, un phénomène de dilution de l'huile va apparaître. La concentration en insaturation dans le milieu va donc diminuer, ce qui va ralentir la cinétique de réaction. Ainsi, la quantité d'insaturation dans le milieu va diminuer moins rapidement. Ainsi, dans le cadre de notre étude, la valeur finale obtenue pour l'II sera plus élevée.

On observe donc une augmentation de la solubilité de l'ozone en présence d'une quantité modérée d'acide nonanoïque. Ce phénomène peut s'expliquer par le caractère acide du composé qui permet de diminuer le pH et donc d'augmenter la solubilité. Dans une autre mesure, le caractère lipophile de l'acide nonanoïque peut avoir un impact sur la solubilité de l'ozone. Il faut toutefois nuancer cet apport avec le fait que plus de 85% des insaturations sont consommées dans l'ensemble du domaine expérimental. En resituant l'objectif d'obtenir un II $\approx 15 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$, une grande partie, voire l'ensemble des modalités expérimentales apparaissent favorables. Il peut néanmoins être intéressant de travailler avec une certaine quantité d'acide (environ 7,5 g) pour favoriser la réaction au-delà de la modification de la viscosité du milieu.

III.2.3.2 Effets des facteurs sur l'indice de peroxyde

Pour compléter les observations précédentes, on peut donc affirmer que l'eau est le seul facteur qui possède une influence sur l'évolution de l'IP au sein du domaine expérimental. Puisque notre modèle est significatif, on peut évaluer l'influence de la quantité de solvants sur l'IP à l'aide des mesures prédites. En appliquant l'équation simplifiée de l'indice de peroxyde, obtenue précédemment, aux quantités d'eau, on obtient la représentation graphique suivante (Figure 42).

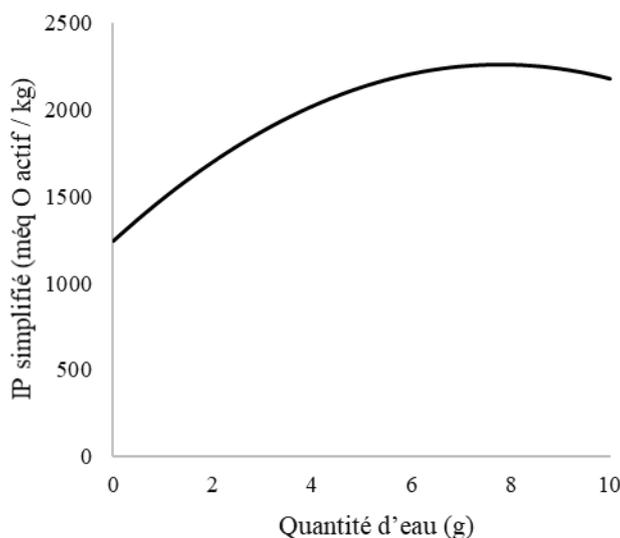


Figure 42. IP simplifié en fonction de la quantité d'eau

On peut déjà noter que malgré la présence de caractère protique de l'acide nonanoïque, la formation d'alpha-hydroperoxyde semble cinétiquement limitée en comparaison de la formation d'hydroxy-hydroperoxyde en présence d'eau. En effet, l'IP tient compte de l'ensemble des espèces oxygénées formées et apparaît influencé seulement par les espèces produites en présence d'eau. Il apparaît ensuite un phénomène de plateau de valeurs pour l'IP lorsque la quantité d'eau est trop élevée. La formation des espèces oxygénées n'est donc pas linéaire. Il s'avère qu'il n'est pas nécessaire de travailler avec une quantité trop élevée d'eau. Pour expliquer ce phénomène de palier, on peut suggérer qu'au-dessus d'une certaine quantité d'eau, l'excès va réagir avec l'ozone et non plus avec les insaturations. Une seconde explication serait l'apparition d'un phénomène de dilution qui défavoriserait la formation des hydroxy-hydroperoxydes.

III.2.3.3 Effets des facteurs sur la consommation de l'ozone

A la vue des résultats précédent, et plus particulièrement sur l'évolution de l'II, nous cherchons à démontrer l'intérêt de l'ajout d'acide nonanoïque en regardant l'impact de l'ajout sur la consommation en ozone pendant la réaction d'ozonation. Sur les expériences C à J ayant des quantités en eau fixe mais des quantités en acide nonanoïque variables, le suivi de la concentration d'ozone en sortie du réacteur semi-continu a donc présenté un intérêt particulier. La durée de la réaction a été fixée à 4 heures pour l'ensemble des essais, durée après laquelle

on peut observer les premières traces d'ozone d'après les travaux de Moureu menés sur l'ozonation d'huile THO seule (Moureu 2015a). Les résultats sont présentés sur la Figures 43.

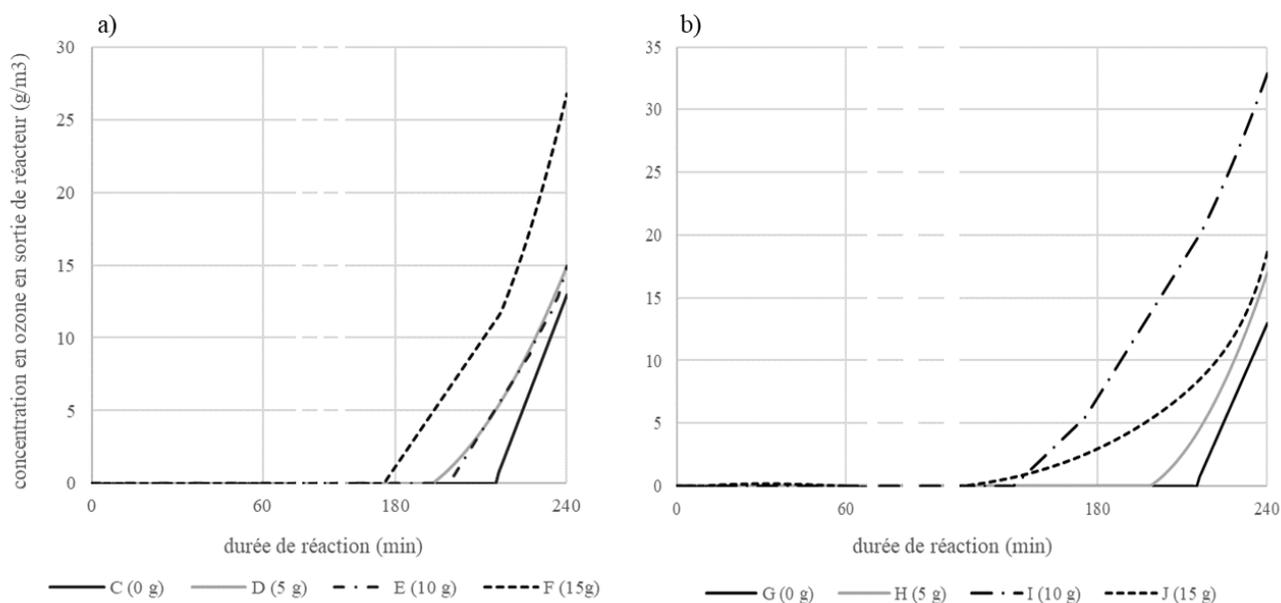


Figure 43. Evolution de la concentration en ozone en sortie de réacteur en fonction de la durée de réaction et de la quantité d'acide nonanoïque, pour une quantité d'eau fixée : a) 5 g, b) 10 g

On remarque dans les deux cas que l'ajout d'acide nonanoïque entraîne l'apparition d'ozone gazeux non consommé plus tôt dans la réaction. Les mélanges C et G révèlent aussi que pour un ajout d'eau uniquement, l'ozone gazeux tend vers un excès au bout de 210 minutes au lieu de 240 min pour une ozonation d'huile THO seule (Moureu 2015a). Il apparaît une linéarité entre la quantité d'acide nonanoïque ajoutée et l'observation d'ozone non consommé. En effet, le mélange F, composé de 15 g d'acide nonanoïque, présente une réaction totale entre l'ozone et les insaturations au bout de 180 minutes, contre 200 minutes environ pour les mélanges D et E et plus de 210 minutes pour le mélange F en l'absence d'acide nonanoïque. Le même phénomène est observable sur le Figure 43b.

L'apparition d'ozone en excès peut être expliquée par deux phénomènes. Soit il n'y a plus de matières réactives dans le milieu, soit l'ozone a un accès restreint à cette matière réactive. Dans le cas de l'ozonation des huiles végétales, l'ozone va réagir avec les insaturations. Plus le temps s'écoule et plus les insaturations sont consommées par l'ozone. Les observations faites ici peuvent être mises en relation avec celles observées sur l'évolution de l'II. Un faible ajout d'acide nonanoïque dans le milieu réactionnel permettrait de favoriser la

solubilité de l'ozone et d'améliorer la réactivité, ce qui induirait l'apparition d'ozone en excès plus rapidement qu'en absence d'acide nonanoïque dans le mélange initial. Si la quantité d'acide nonanoïque introduite est trop importante, alors un phénomène de dilution de l'huile est observé. La réactivité de l'ozone sur les insaturations est diminuée, l'ozone n'est plus consommé et une quantité d'ozone n'ayant pas réagi se dégage.

III.2.3.4 Effets des facteurs sur la viscosité du mélange

Pour comparer l'état physique des différents échantillons entre eux, nous avons utilisé les caractérisations suivantes :

- Un échantillon est dit « fluide » si on peut le prélever aisément à la pipette et donc envisager un prélèvement par une pompe HPLC.
- Un échantillon est dit « visqueux » si son état physique est similaire à celui d'une huile.
- Un échantillon est dit « pâteux » s'il est nécessaire d'utiliser une spatule pour pouvoir le prélever (Figure 44).



Figure 44. Produit obtenu caractérisé comme "pâteux"

Les observations faites sur les essais 1 à 7 et A à J avant et après ozonation sont reportées dans le Tableau 23.

Tableau 23. Propriétés physiques des mélanges avant et après ozonation

Essai	Etat physique avant réaction	Etat physique après réaction
1	Visqueux	Fluide
2	Visqueux	Pâteux
3	Fluide	Pâteux
4	Fluide	Fluide
5	Fluide	Fluide
6	Visqueux	Visqueux
7	Visqueux	Pâteux
A	Visqueux	Fluide
B	Fluide	Fluide
C	Visqueux	Pâteux
D	Visqueux	Pâteux
E	Fluide	Fluide
F	Fluide	Fluide
G	Visqueux	Pâteux
H	Visqueux	Pâteux
I	Fluide	Pâteux
J	Fluide	Pâteux

Pour visualiser l'effet de la composition du mélange sur les paramètres physiques, nous avons représenté les états des mélanges avant et après réaction à l'aide d'une surface de réponse (Figure 45).

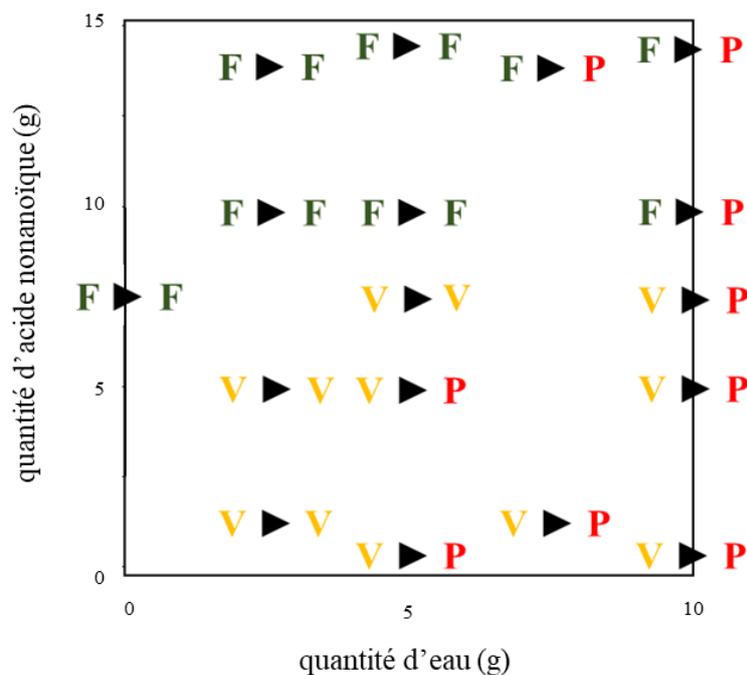


Figure 45. Viscosité du mélange en fonction de la composition, avant réaction ► après réaction, F : fluide, V : visqueux, P : pâteux

On peut distinguer deux états physiques distincts avant réaction. On observe que l'ajout d'acide permet de fluidifier le mélange. En ce qui concerne les mélanges après réaction, trois états physiques sont obtenus. Tout d'abord, certains mélanges conservent une certaine viscosité et présentent un état similaire à une huile. Ensuite, l'ajout d'eau peut être lié à l'obtention de mélanges pâteux, et l'ajout d'acide nonanoïque à des mélanges fluides.

L'augmentation de la viscosité d'une huile ozonée avec l'ajout d'eau a déjà été démontrée dans la littérature (Rodrigues 2015). Elle peut être expliquée par la présence de composés avec une masse molaire élevée tels que des polymères. En effet, une polymérisation peut se produire lors du processus d'ozonation, notamment avec l'apparition des peroxydes polymériques, et donc la formation d'agrégats moléculaires plus grands, ce qui va avoir tendance à augmenter la viscosité du produit final. La viscosité faible du produit fini en présence d'acide nonanoïque peut également être expliquée par le phénomène de dilution du produit. La présence de ce composé au caractère protique peut aussi défavoriser la formation de composés à hautes masses molaires en limitant la formation de polymères de peroxydes par exemple. En effet, la formation de peroxyde en présence d'acide nonanoïque apparaît plus faible qu'en présence d'eau et il y a donc une répercussion sur la formation des polymères de peroxydes.

On peut donc conclure que l'ajout d'acide nonanoïque et l'ajout d'eau ont un effet sur les propriétés physiques du mélange avant et après réaction. Il est donc possible d'envisager des compositions en huile, eau et acide permettant de conserver un aspect fluide et pouvant faire l'objet d'une synthèse sur un réacteur en flux continu.

III.2.3.5 Effets des facteurs sur les propriétés antibactériennes

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des produits issus des essais 1 à 7 et A à J à l'aide de la méthode de microdilution. L'activité antibactérienne des produits a été testée contre des souches de collections obtenues grâce à l'Institut Pasteur : *E. coli* (CIP 76.24) et *S. uberis* (CIP 105450). Les déterminations ont été réalisées en tripliquât, nous obtenons donc 6 valeurs de CMI par échantillon. Nous avons établi les CMI₅₀ et CMI₉₀ comme les valeurs de concentrations minimales qui présentent une inhibition dans 50% et respectivement 90% des 6 valeurs déterminées. Pour effectuer des comparaisons, les activités antibactériennes de l'huile THO avant réaction, de l'huile THO ozonée pendant 4 heures seule et de l'acide nonanoïque seul ont aussi été évaluées (Tableau 24).

Tableau 24. Activité antibactérienne des s mélanges et composés sur *E. coli* et *S. uberis*

Essai	Indice d'iode (g I ₂ / 100 g)	Indice de peroxyde (még O actif / kg)	<i>E. coli</i>		<i>S. uberis</i>	
			CMI ₅₀ (mg/mL)	CMI ₉₀ (mg/mL)	CMI ₅₀ (mg/mL)	CMI ₉₀ (mg/mL)
1	6,92	2198,55	20	40	10	40
2	5,63	2248,21	10	20	5	5
3	9,08	2038,61	10	40	10	20
4	9,86	2313,67	40	Pas d'effet	10	20
5	4,07	1250,86	40	Pas d'effet	10	40
6	12,4	1582,87	40	Pas d'effet	5	5
7	7,28	2503,24	5	5	2,5	5
A	5,29	1563,48	40	Pas d'effet	5	5
B	5,79	1755,7	40	Pas d'effet	10	10
C	13,18	2349,5	5	5	2,5	10
D	6,93	2268,1	20	40	10	40
E	6,73	2026,08	20	40	10	20
F	8,27	2002,9	20	40	10	20
G	8,91	2237,27	5	5	1,25	1,25
H	6,49	2116,25	10	20	2,5	5
I	4,01	2276,58	10	20	5	10
J	10,06	2151,53	10	40	10	20
THO avant ozonation			Pas d'effet		Pas d'effet	
THO après 4h d'ozonation			Pas d'effet		Pas d'effet	
Acide nonanoïque			5		1,25	

Une représentation des CMI₅₀ et CMI₉₀ en fonction de la composition du mélange permet de visualiser facilement l'influence des additifs sur l'activité antibactérienne (Figure 46). Certains mélanges n'ont montré aucun effet antibactérien dans la gamme de concentration testée.

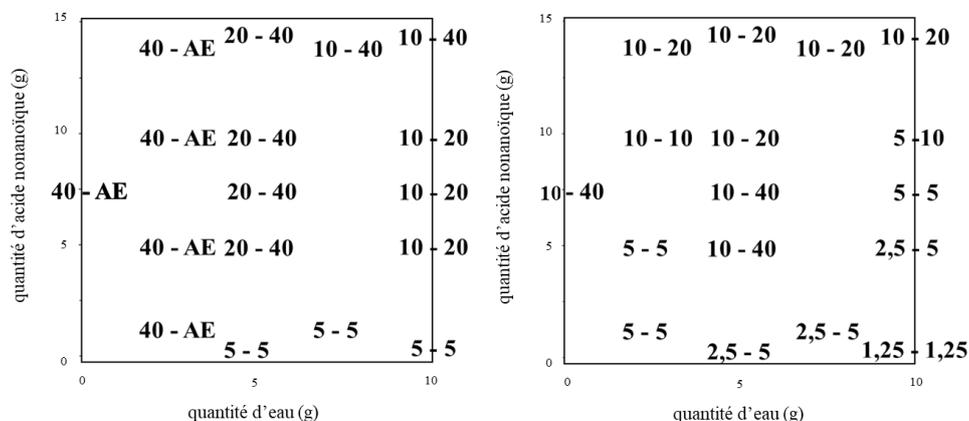


Figure 46. CMI₅₀ - CMI₉₀ en fonction de la composition du mélange sur *E.coli* (gauche) et *S.uberis* (droite), AE : aucun effet

On observe tout d'abord que *S. uberis* est plus sensible que *E. coli* sur l'ensemble des mélanges testés. L'ajout d'eau a un effet positif sur l'activité antibactérienne. Ces deux phénomènes ont déjà été démontrés dans la littérature (Moureu et al. 2015b). Il a été prouvé que l'ajout permettait d'améliorer les propriétés antibactériennes notamment avec la formation des peroxydes favorisée en milieu aqueux. Cependant, l'ajout d'acide nonanoïque semble avoir peu d'effet, il tend même à augmenter les valeurs des CMI, alors que nous avons mesuré des milieux composés d'acide nonanoïque et avec des IP élevés (par exemple : l'essai E). Les composés de la famille des hydroxy-hydroperoxydes, formés en présence d'eau exclusivement, semble donc avoir plus d'influence sur l'activité antibactérienne que les composés du type alpha-hydroperoxyde, formés en présence d'acide nonanoïque.

L'acide nonanoïque seul possède une activité antibactérienne avérée sur les deux souches alors que les mélanges obtenus après ozonation en présence d'acide nonanoïque présentent une activité bactérienne plus faible. Deux hypothèses peuvent être avancées sur la dégradation chimique de l'acide nonanoïque présent dans le milieu réactionnel : soit par une réaction acido-basique, soit par une réaction avec un autre composé du milieu. Un dosage de la quantité d'acide nonanoïque présent dans le milieu après réaction par CPG pourrait être envisagé ici.

Bien que l'activité antibactérienne ne soit pas fortement améliorée avec l'ajout des deux composés, elle apparaît toutefois meilleure que l'huile THO ozonée seule, qui ne présente aucun effet visible sur les 2 souches comme présenté dans le Tableau 24.

Pour conclure sur l'ensemble des résultats établis, il apparaît intéressant d'ajouter de l'acide nonanoïque pour améliorer la cinétique de réaction et diluer les produits initiaux et finaux. L'ajout d'eau permet d'atteindre des valeurs d'IP élevée avec la formation favorisée d'hydroxy-hydroperoxydes. Nous avons déterminé que ces composés avaient le plus d'influence sur l'activité antibactérienne et qu'il fallait donc prendre en considération une quantité d'acide et une quantité d'eau pour favoriser l'ensemble des propriétés. Pour donner suite à l'ensemble des essais, nous avons été en mesure de déterminer une composition de mélange pour envisager des premiers essais de synthèse en flux continu.

III.3 Essais préliminaires de synthèse au flux continu

III.3.1 Détermination d'une composition de mélange pour envisager une synthèse en flux continu

En combinant l'ensemble des résultats obtenus, il est possible de dégager une zone de composition d'intérêt qui répond à notre seconde problématique pour envisager une synthèse sur le microréacteur Corning.

Un des premiers objectifs était d'obtenir un mélange avec un indice d'iode faible (< 15 g I_2 / 100 g). A l'aide de la représentation des indices d'iode obtenus en fonction de la composition du mélange (Figure 47). On observe que l'ensemble des compositions permettent d'obtenir ce résultat. Avec les observations faites tout au long de ce chapitre, il apparait intéressant de travailler avec une certaine quantité d'acide nanoïque. Nous avons donc déterminé une surface de compositions optimales avec un ajout d'acide nanoïque compris entre 4 et 10 g.

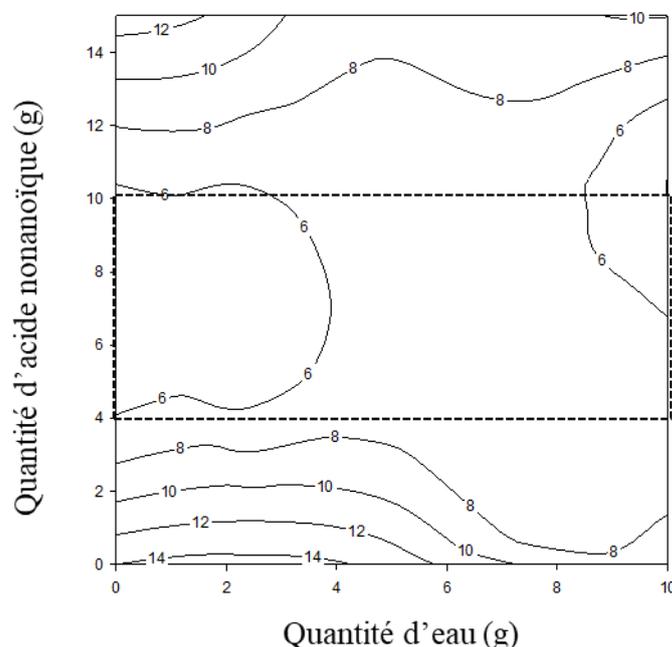


Figure 47. Indice d'iode en fonction de la composition du mélange, en pointillé : surface de compositions optimales

En ce qui concerne l'indice de peroxyde, une valeur d'environ 1900 méq O actif / kg a été fixée comme limite. A l'aide de la représentation de l'indice de peroxyde en fonction de la composition (Figure 48), on peut déterminer une surface de compositions optimales pour l'objectif fixé.

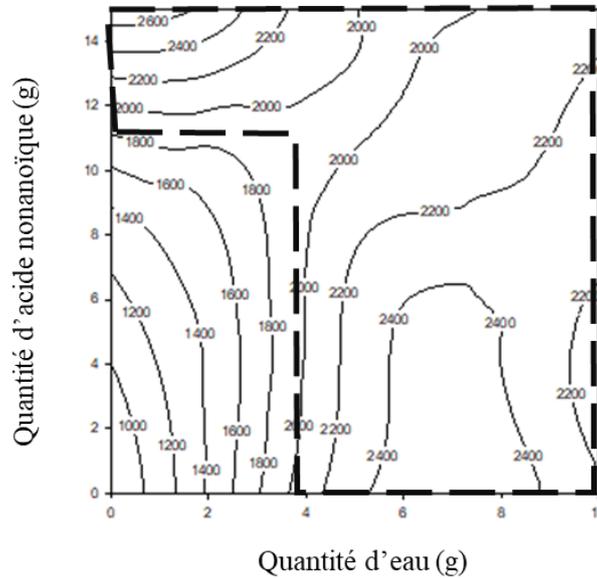


Figure 48. Indice de peroxyde en fonction de la composition du mélange, en pointillé : surface de compositions optimales

Pour pouvoir être prélevé à l'aide d'une pompe HPLC et ne pas créer de bouchons dans le process, la viscosité du produit se doit d'être fluide tout au long du process. Il est possible de déterminer une surface de compositions qui répond à cette caractéristique à l'aide de la Figure 45. En combinant l'ensemble des trois surfaces de compositions optimales, il est possible de dégager une zone où les compositions permettent d'obtenir un mélange qui répond à l'ensemble des critères définis (Figure 49).

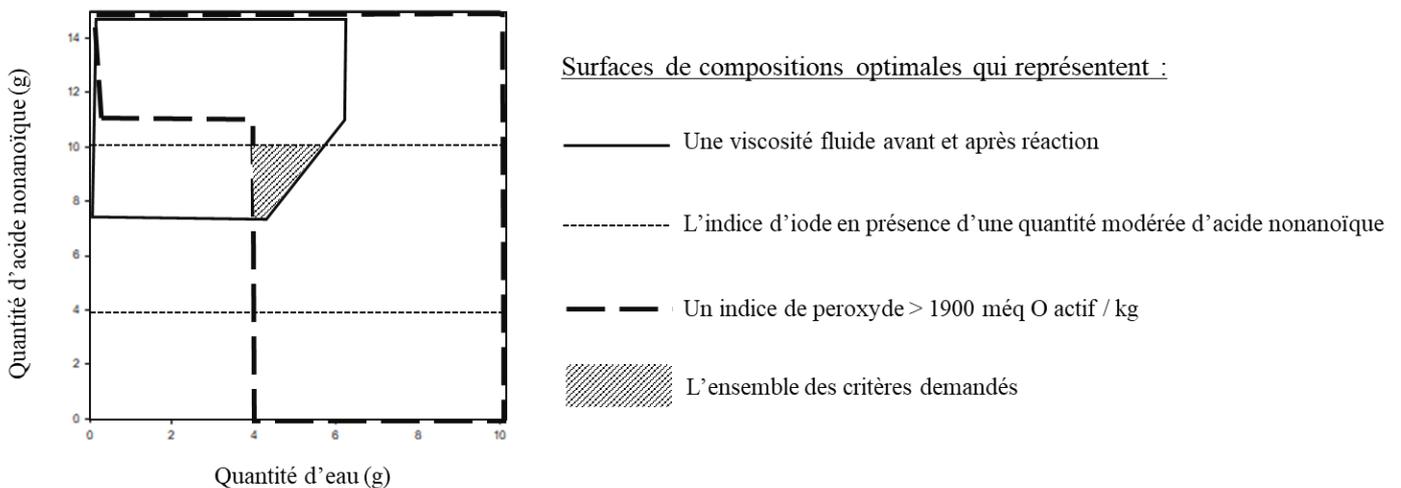


Figure 49. Surfaces de compositions optimales pour l'ensemble des critères désirés

Dans cette zone optimale, la composition de l'essai E avec 5 g d'eau et 10 g d'acide nonanoïque est présente. Cette composition sera donc utilisée pour les premiers tests effectués en flux continu. Comme énoncé précédemment, cette zone ne présente pas l'activité bactérienne la plus intéressante mais ce paramètre sera écarté pour les premières études en flux continu.

III.3.2 Etude sur le microréacteur Low-Flow de Corning

III.3.2.1 Spécificités de l'appareil

L'utilisation de la technologie de synthèse en flux continu de Corning présente un intérêt pour la mise en place de réaction entre un gaz et des insaturations. Des premières recherches sur l'ozonation d'alcènes sont notamment disponibles (Wada, Schmidt, Jensen 2006, McMullen, Jensen 2010, Nieves-Remacha, Kulkarni, Jensen 2013, Nieves-Remacha, Jensen 2015). La spécificité de construction de l'appareil et les outils que nous avons associés permettent d'apporter une plus-value sur certaines conditions expérimentales.

Tout d'abord, une compression de l'ozone est réalisée avant l'injection dans le système afin d'augmenter la concentration en ozone dans le gaz. Le rapport gaz / liquide est ainsi augmenté et la réaction est favorisée.

La géométrie même du réacteur est innovante et favorise grandement les échanges entre la phase gaz et la phase liquide (Figure 50). En effet, la forme de « cœur » permet de réaliser des successions de flux turbulents (A) et de flux laminaires (B) ce qui conduit à obtenir un mélange efficace des deux phases et à améliorer la réactivité.

L'utilisation d'un thermostat sur l'ensemble du procédé permet dans un premier temps de contrôler efficacement la réaction exothermique telle que l'ozonation de matières grasses mais aussi d'appliquer une température de réaction qui pourrait favoriser ou non la formation de certaines espèces.

Cette technologie permet de travailler sur des petites quantités de produit pour évaluer l'influence des paramètres et d'envisager ensuite facilement une transposition d'échelle sur des modèles de plus grandes dimensions de la gamme Corning.

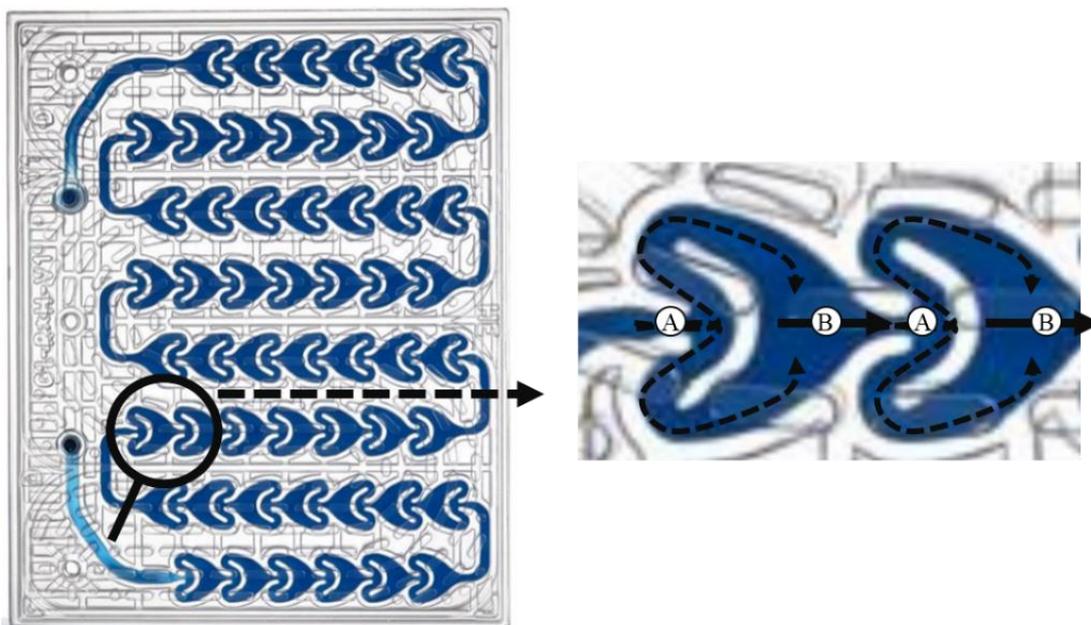


Figure 50. Représentation d'une plaque de réacteurs et zoom sur deux réacteurs pour visualiser la succession des flux turbulents (A) et laminaires (B)

Pour finir, l'utilisation d'un flux continu de réactif implique d'apporter la notion de durée de séjour dans le réacteur de ce flux. Cette durée est notamment influencée par le débit de la pompe permettant de prélever le réactif en question. Il faut aussi anticiper la quantité de produit désirée pour réaliser la réaction sur la bonne quantité de réactif. Il est nécessaire de travailler avec des produits peu visqueux tout au long du procédé, ce qui justifie notre étude précédente.

III.3.2.2 Conditions opératoires appliquées pour la synthèse en flux continu

Il est désormais possible de faire varier plusieurs paramètres :

- La composition du mélange réactif
- Le débit de flux réactif
- Le débit d'ozone
- La concentration en ozone
- La température de réaction
- Le volume total de la chaîne de réacteurs en modifiant le nombre de plaques, ce qui va aussi avoir un impact sur le temps de séjour du réactif.

Des études préliminaires sur des matières organiques ont permis d'observer que les paramètres qui possédaient le plus d'influence étaient les débits de la solution réactive et de gaz ainsi que la concentration du gaz. Nous avons donc arbitrairement décidé de fixer pour l'ensemble des essais la température et le nombre de plaques. Les gammes de valeurs étudiées ont été déterminées par les limites technologiques de nos appareils. En ce qui concerne le débit de réactif, la viscosité du mélange reste malgré tout présente et il n'est pas possible de travailler à des débits trop élevés, afin d'éviter des bouchons dans le procédé. Les premiers tests ont été effectués avec les modalités suivantes :

- Mélange huile THO, eau (10% massique), acide nonanoïque (20% massique). Ce mélange est homogénéisé en permanence pour être prélevé par une pompe HPLC.
- Le débit de réactif varie entre 0,125 et 1 mL/min.
- Le débit d'ozone varie entre 33,3 mL/min et 66,6 mL/min.
- La concentration en ozone varie entre 52 et 90 g/m³.
- La température est fixée à 20 °C
- Le volume du réacteur est fixé à 6 plaques ($V_{TOTAL} = 2,7$ mL)
- Le volume de produit récupéré en sortie de réacteur est fixé à 50 mL pour pouvoir effectuer des analyses chimiques (II et IP) et faire une comparaison avec le volume de synthèse en procédé semi-continu.

L'étude qui suit permettra d'affirmer ou d'infirmer si ce concept de microréacteur permet de réaliser des réactions d'ozonation d'huile de tournesol. Aucune étude sur l'usage de cette technologie dans cet objectif n'a été publiée. Cette étude a été menée sur un nombre restreint d'essais, cinq modalités expérimentales permettant d'observer l'influence des différents paramètres. Ces essais ont été réalisés en tripliquât (Tableau 25).

Tableau 25. Conditions opératoires appliquées aux essais en microréacteur

Essai	Q _{réactif} (mL/min)	Q _{ozone} (mL/min)	[O ₃] (g/m ³)	Durée pour obtenir 50 mL (min)	m _{ozone} injectée (g)
1	0,25	66,60	52,00	199,80	0,69
2	0,25	66,60	90,00	199,80	1,20
3	0,13	66,60	52,00	400,20	1,39
4	0,13	33,30	90,00	400,20	1,20
5	1,00	33,30	90,00	49,80	0,15

Après réalisation des essais, la quantité nécessaire de produit est collectée, les caractérisations chimiques ont été réalisées. L'analyse des résultats sera subdivisée en deux parties selon les étapes du mécanisme réactionnel. Tout d'abord, la réaction entre les insaturations et l'ozone sera observée par l'évaluation de l'II. Puis l'efficacité d'un tel procédé pour la formation d'espèces oxygénées sera évaluée par l'IP.

III.3.2.3 Résultats obtenus pour les essais de synthèse en flux continu

III.3.2.3.1 Analyse de la réaction entre l'ozone et les insaturations

L'indice d'iode de chaque répétition a été déterminé et un indice moyen par essai a été calculé (Tableau 26). A partir de la masse de l'échantillon, il est possible d'obtenir la quantité d'insaturations présente dans l'échantillon avant ozonation (THO non ozonée) et après réaction pour les différents essais. On peut ainsi isoler la quantité de matière d'insaturations consommées et donc le pourcentage d'insaturations consommées.

Tableau 26. Indices d'iode des différents essais, quantité et pourcentage d'insaturations consommées

Essai	II moyen (g I ₂ / 100 g)	m (g)	n (insaturations) (mol)	n (insaturations consommées) (mol)	% insaturations consommées
THO non ozonée	89,00	50,00	0,175	0,000	0,000
1	30,07	44,10	0,052	0,123	70,26
2	13,15	43,20	0,022	0,153	87,16
3	22,18	42,50	0,037	0,138	78,87
4	23,60	43,60	0,041	0,134	76,83
5	23,59	45,10	0,042	0,133	76,03

On peut constater qu'il y a une diminution importante de la quantité d'insaturation pour l'ensemble des essais (de 70 à 87%). L'essai 1 présente l'II le plus élevé et l'essai 2 possède la valeur la plus faible. La seule différence entre les deux essais est la concentration en ozone. Ce paramètre a donc une influence significative sur la réaction entre l'ozone et les insaturations.

Les essais 4 et 5 permettent de révéler qu'en se plaçant à une concentration élevée, un temps de séjour plus long de la solution réactive dans le réacteur ne permet pas d'améliorer la consommation des doubles liaisons. En effet, on observe un débit plus important de la solution

réactive d'un rapport 10 entre les essais 4 et 5, ce qui permet donc de faire circuler une quantité 10 fois plus faible d'ozone, cependant l'indice d'iode et donc la réactivité est similaire.

En s'appuyant sur l'essai 4, l'essai 3 permet de déterminer qu'il est possible d'augmenter le débit de gaz et de diminuer la concentration en ozone pour obtenir une consommation aussi efficace.

Pour conclure, il apparait plus intéressant de travailler à débit de réactif et à concentration de gaz élevés afin d'obtenir des valeurs d'indices d'iode faible tout en introduisant le moins d'ozone possible. Quoi qu'il en soit, la réaction de l'ozone sur les insaturations est réalisable et efficace sur le modèle Low-Flow de Corning.

III.3.2.3.2 Analyse de la formation d'espèces oxygénées

L'indice de peroxyde de chaque répétition a été déterminé et un indice moyen par essai a été calculé (Tableau 27).

Tableau 27. Indices de peroxyde des différents essais

Essai	IP (még O actif / kg)
THO non ozonée	0,90
1	177,44
2	501,98
3	236,03
4	258,34
5	172,43

On constate directement que la formation d'espèces oxygénées a bien lieu en comparant nos essais à l'huile THO non ozonée. Cependant, l'IP ne dépasse pas la valeur de 500 még d'oxygène actif / kg, ce qui n'est pas très élevé dans le domaine des huiles ozonées en milieu aqueux. Seul l'essai 2 permet d'augmenter quantitativement la valeur de l'IP, ce qui justifie l'application d'un débit et d'une concentration plutôt élevés en ozone. Une première hypothèse est la dégradation simplifiée de certaines espèces, tels que les zwitterions, au sein du microréacteur ce qui va mener à une quantité plus faible de peroxydes formés. Une seconde hypothèse se base sur le fait que l'IP est très influencé par la quantité d'hydroxyhydroperoxyde, et donc par la présence d'eau, comme nous l'avons démontré précédemment.

Il apparaîtrait donc que la réaction entre l'eau et les zwitterions ne soit pas efficace ici et que la quantité d'hydroxy-hydroperoxydes formés soit faible. Ce phénomène peut aussi être lié à un problème d'homogénéité de la solution et que le mélange injecté dans le réacteur ne possède pas la composition en eau désirée. Une dernière hypothèse envisagée réside dans le fait que la quantité d'ozone injectée n'est peut-être pas suffisante et qu'il faut travailler avec des conditions opératoires différentes. L'obtention de composés peroxydés apparaît donc plus compliquée dans le modèle Low-Flow et nécessite des études complémentaires.

III.3.3 Comparaison entre le flux continu et le procédé semi-continu

Pour comparer les performances du procédé semi-continu et du flux continu appliqué au modèle Low-Flow, nous avons décidé de prendre en compte une ozonation standard issue de la littérature (Moureu et al. 2015b) et l'essai qui présente les meilleurs résultats (II le plus faible et IP le plus élevé) pour nos essais sur le microréacteur Corning (Tableau 28).

Tableau 28. Comparaison entre un essai standard en semi-continu et l'essai 2 en flux continu

Paramètre	Réacteur semi-continu	Réacteur Low-Flow Essai 2
Volume d'huile ozonée (mL)	50	50
Débit gaz (L/h)	30	4
Concentration gaz (g/m ³)	65	90
Durée de réaction (h)	4	3,33
m (ozone injecté) (g)	7,8	1,2
II moyen (g I ₂ / 100 g)	12,5	13,15
% insaturations consommées	87,96	87,16
IP moyen (még O actif / kg)	2000	501,98

On constate que la durée de réaction nécessaire en flux continu est plus faible qu'en semi-continu pour obtenir une consommation des insaturations similaires. La quantité d'ozone injectée est alors plus de 5 fois plus faible pour le système Low-Flow que pour le semi-continu. La réaction de consommation des insaturations apparaît donc plus favorable dans le système Corning qu'en réacteur semi-continu. Cependant, la formation d'espèces oxygénées est loin d'être équivalente entre les deux systèmes dans nos conditions expérimentales étudiées. L'hypothèse de la quantité trop faible d'ozone injectée se révèle donc probable à la vue de la différence entre les deux procédés. Le système Corning révèle donc, dans le cadre de nos études, un intérêt pour réaliser des réactions entre des insaturations et de l'ozone mais nécessite

des études complémentaires pour envisager d'utiliser ce système pour la synthèse de composés oxygénés.

III.4 Conclusion

La forte demande en huile ozonée nécessite d'envisager des méthodes de synthèses alternatives. L'utilisation d'un microréacteur Corning se présente comme une option intéressante mais nécessite de modifier les propriétés physiques du mélange tout en conservant des propriétés chimiques acceptables.

Grâce à l'ensemble des expériences menées, nous avons démontré qu'il était possible de réaliser des mélanges d'huile THO et de différents solvants pour modifier les propriétés physico-chimiques du produit fini.

L'acide nonanoïque et l'eau sont deux composés protiques qui vont avoir un impact sur l'ensemble des propriétés. L'ajout d'une faible quantité d'acide nonanoïque va permettre d'améliorer la réactivité entre l'ozone et les insaturations et de diminuer l'II. La consommation de l'ozone est aussi plus efficace avec l'apparition plus rapide d'ozone en excès dans le milieu et le produit fini tend à être plus liquide. Une quantité modérée d'eau permet d'augmenter largement la quantité de composés peroxydés et donc la valeur de l'IP. L'activité antibactérienne apparaît bien plus liée aux composés formés par la présence d'eau que par ceux formés en présence d'acide nonanoïque. Cependant, l'ajout d'eau entraîne l'augmentation de la viscosité du mélange final.

La combinaison des deux solvants permet de moduler l'ensemble de ces propriétés et il est possible de dégager des compositions pour obtenir un mélange fluide avec des indices chimiques d'intérêts, c'est-à-dire un indice d'iode faible et un indice de peroxyde élevé. Une composition particulière s'est dégagée : huile THO + 10% massique d'eau + 20% massique d'acide nonanoïque.

Ce mélange particulier a été soumis à des premiers tests sur le système de microréacteur Low-Flow de Corning. Nous avons démontré une preuve de concept sur l'utilisation du flux continu pour la réactivité entre l'ozone et les insaturations avec notamment une bonne diminution de l'II. Cependant la formation d'espèces oxygénées apparaît plus compliquée et

nécessite des travaux complémentaires. La modification de la température au sein du réacteur est une voie envisagée pour notamment diminuer un peu plus la viscosité du produit formé et permettre une meilleure réactivité. Une seconde voie est la mise en place d'une deuxième entrée d'ozone au sein du réacteur en flux continu pour augmenter la quantité d'ozone au sein du mélange et se rapprocher des quantités utilisées en procédé semi continu.

L'utilisation du microréacteur apparaît malgré tout comme une alternative qui consomme moins que la synthèse en réacteur semi-continu et présente désormais un intérêt pour l'ozonation de matières grasses. Des projets à envergure industrielle s'intéresse d'ailleurs à cette technologie pour l'ozonation d'acide oléique dans le but de former de l'acide azélaïque et de l'acide nonanoïque. Nous avons aussi démontré l'intérêt du flux continu dans d'autres domaines oxydatifs. En effet, des études sur des matières organiques ont notamment permis de déterminer que cette technologie permettait de réduire de 50% la quantité d'ozone utilisée pour obtenir un état d'oxydation similaire à celui obtenu en réacteur semi-continu.

L'ensemble de notre étude nous a conduit à caractériser un grand nombre d'échantillons par dosages volumétriques, ce qui a nécessité du temps et une grande consommation de produits chimiques. Il a donc été intéressant d'envisager une méthode d'analyse alternative en combinant les propriétés spectrales des huiles végétales ozonées et leurs propriétés chimiques. On pourrait alors envisager de réaliser ces analyses en temps réel sur des réactions que ce soit au sein d'un réacteur semi-continu adapté ou en sortie du modèle Low-Flow de Corning.

**CHAPITRE IV – MISE AU POINT D’UNE METHODE DE
PREDICTION D’INDICES CHIMIQUES PAR ANALYSES
SPECTRALES**

La caractérisation des huiles par leurs indices d'iode et de peroxyde est une étape nécessaire pour pouvoir comparer différents échantillons entre eux. Ces méthodes de référence ont été appliquées dans un grand nombre d'études (Valachi et al. 2011, Rodrigues et al. 2015, Moureu et al. 2015b, Varol et al. 2017). Cette détermination est le plus souvent réalisée par dosage volumétrique (AFNOR 2007, AFNOR 2010a.). Ces méthodes nécessitent une dizaine de minutes pour obtenir une mesure sur un échantillon, consomment des produits chimiques toxiques (solvants) et entraînent la destruction de l'échantillon analysé.

Il semble donc nécessaire de s'intéresser à une méthode alternative, rapide, non destructive pour l'échantillon et consommant moins de produits chimiques. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge s'inscrit dans cette dynamique. En effet, une analyse ne prend que quelques secondes et peut être multiparamétrique. La technologie utilisée permet d'éviter d'engager une trop grande quantité d'échantillon (carte ST-IR, cuvette ou module ATR par exemple). La spectroscopie dans la gamme du moyen infrarouge est utilisée dans le domaine des huiles ozonées pour déterminer la présence de fonctions chimiques (Soriano et al. 2003, Georgiev et al. 2015) et comparer de manière qualitative des échantillons entre eux (Moureu 2015a). Il est alors possible d'envisager de combiner cette technique spectroscopique à l'utilisation de la chimiométrie pour établir des modèles de prédiction des paramètres chimiques. Cette méthodologie a déjà été utilisée pour estimer la valeur des indices d'iode et de peroxyde dans certaines huiles végétales ou certaines matières grasses. Cependant, ces études ne concernent pas les huiles ozonées, et les gammes de valeurs des paramètres chimiques sont parfois trop restreintes (Tableau 29).

Nous avons donc développé deux sets d'échantillons pour effectuer une étude dans le domaine du moyen infrarouge dans un premier temps et une étude dans le domaine du proche infrarouge dans un second temps. Ces sets se sont adaptés aux technologies pour l'analyse spectrale dans les deux gammes désirées. En effet, une analyse sur carte ST-IR en moyen infrarouge a été réalisée sur un échantillon plus visqueux tandis qu'une analyse en cuvette de spectrophotométrie a été effectuée dans le domaine du proche infrarouge. Pour que ces sets soient représentatifs de la gamme étudiée, ils devaient posséder des valeurs de paramètres chimiques répartis sur l'ensemble des valeurs désirées. Nous avons réalisé l'ozonation d'huile de tournesol classique et d'huile de tournesol THO. Pour que l'étude soit plus complète, nous avons aussi étudié l'ozonation de l'oléate de méthyle et du linoléate de méthyle, deux matrices aux compositions plus simples que l'huile de tournesol. Une fois les échantillons obtenus, une

analyse chimique de l'II et de l'IP, puis une analyse spectrale dans le domaine étudié sont réalisées. Grâce à différents prétraitements mathématiques, des modèles de prédiction sont établis et les performances sont évaluées à l'aide de différents paramètres (R^2 , RMSE et RPD).

Tableau 29. Revue de gamme de teneurs en II et IP utilisées dans les modèles de prédiction par spectroscopie infrarouge sur des composés gras

Gamme spectrale	Indice chimique étudié	Matière première	Gamme de valeurs	Référence
MIR	IP (méq O actif / kg)	huile de colza	0 -20	Ma et al. 1997
		huile comestible	3 - 300	Guillen & cabo 2002
	II (g I ₂ / 100 g)	huile comestible	80 -140	Meng et al 2013
		huile végétale	119 - 211	Tavassoli-Kafrani 2017
NIR	IP (méq O actif / kg)	huile comestible	19 -200	An 2017
		huile de palme	2 - 10	Moh et al. 1999
		triacylglycerols	0 - 15	Li et al. 2000
	II (g I ₂ / 100 g)	huile de karité	2 - 3	Seweh et al. 2019
		huile comestible	60 - 120	Li et al. 1999
		graisse de porc	52,5 - 75,5	Prieto et al. 2018
	huile de karité	38 - 45	Seweh et al. 2019	

La première étape de cette étude a été de caractériser les matières premières et de mettre au point les échantillons de référence.

IV.1 Les échantillons de référence pour l'étude

IV.1.1 Caractérisations des matières premières utilisées

IV.1.1.1 Composition des matières premières

Pour cette étude, nous avons décidé de travailler avec quatre matières premières différentes. L'oléate de méthyle (OM) et le linoléate de méthyle (LM) sont des produits purs issus du commerce (> 97%, Sigma-Aldrich, France). Ce sont des esters méthyliques avec une (oléate de méthyle) ou deux (linoléate de méthyle) insaturations sur la chaîne grasse (Figure 51).

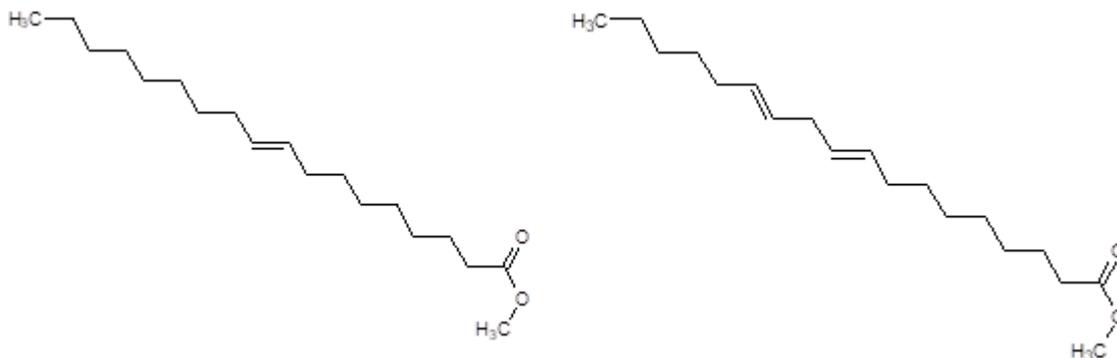


Figure 51. Structure chimique de l'oléate de méthyle (gauche) et linoléate de méthyle (droite)

L'huile de tournesol « classique » est issue du commerce (Carrefour, France) et l'huile de tournesol à « haute teneur en acide oléique » (THO) provient d'un fournisseur local (Arterris, France). Nous avons donc à notre disposition quatre profils différents de matières premières qu'il a fallu caractériser pour obtenir des valeurs de référence avant de faire réagir ces composés avec l'ozone.

IV.1.1.2 Analyses des matières premières avant ozonation

Tout d'abord, les profils en acide gras des deux huiles de tournesol sont déterminés au préalable par chromatographie en phase gazeuse (Tableau 30). Les huiles de tournesol non ozonées ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse après transestérification avec le TMSH. Des solutions à ≈ 50 mg/mL d'huiles ont été préparées dans du MTBE. Dans un

insert, 50 μ L de la solution ont été mélangés avec 50 μ L de TMSH. Un microlitre de ce mélange a été injecté. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C.

Tableau 30. Composition en acide gras des huiles de tournesol, DS : déviation standard

Composition en acide gras (%)	THO	Huile classique
	Moyenne \pm DS	Moyenne \pm DS
Acide palmitique (C ₁₆)	3,11 \pm 0,06	5,52 \pm 0,09
Acide stéarique (C ₁₈)	2,18 \pm 0,04	3,28 \pm 0,02
Acide oléique (C _{18:1})	89,1 \pm 0,11	34,73 \pm 0,27
Acide linoléique (C _{18:2})	3,78 \pm 0,13	54,75 \pm 0,08

On remarque donc bien deux profils différents. L'huile THO présente une grande majorité de ses chaînes de type oléique et sa composition tend à se rapprocher d'une trioléine (Figure 52). De son côté, l'huile classique possède une majorité de chaînes de type linoléique, elle contient donc plus d'insaturations et nécessite des conditions d'ozonation plus poussées que l'huile THO pour atteindre un même état d'oxydation.

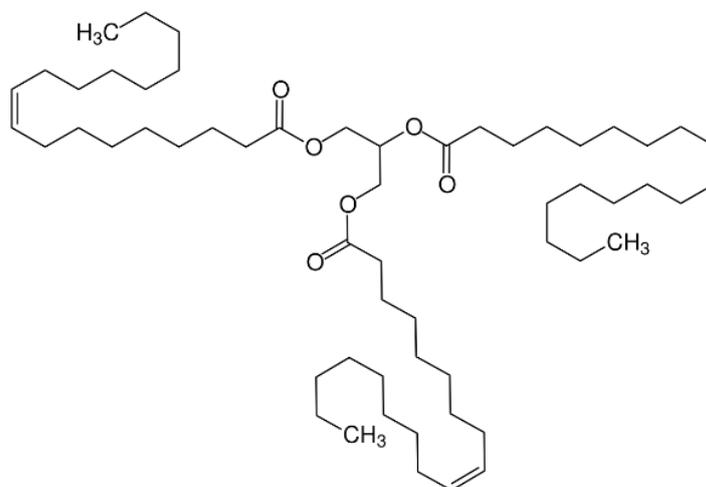


Figure 52. Structure chimique de la trioléine

Nous avons ensuite déterminé un II et un IP moyen pour l'ensemble des matières premières (Tableau 31).

Tableau 31. Indices chimiques moyens des matières premières

Matière première	II moyen (g de I₂/100g d'échantillon)	IP moyen (még d'O actif/kg d'échantillon)
Huile classique	120,0	0,8
THO	88,9	3,1
LM	132,6	4,9
OM	86,0	0,9

On observe bien une distribution des II en fonction de la quantité d'insaturation dans le composé. L'huile classique, composée en majorité de chaînes de type linoléique, présente un II plus faible que le linoléate de méthyle pur, mais plus élevé que l'huile THO. Cette dernière est essentiellement composée de chaînes de type oléique et son II est légèrement plus élevé que l'oléate de méthyle pur.

En ce qui concerne l'IP, les composés sont très peu oxydés avant réaction, il est donc normal de déterminer des valeurs si faibles.

IV.1.2 Conditions opératoires appliquées pour l'étude

Etant donné que l'objectif de l'étude était de pouvoir réaliser une estimation des indices chimiques sur un large panel de valeurs, il fallait que nos échantillons atteignent un maximum de valeurs possibles dans la gamme à notre disposition.

Pour l'indice d'iode, les valeurs extrêmes de la gamme sont comprises entre les valeurs des matières premières avant ozonation et des valeurs très faibles proche de zéro. En effet, il a déjà été démontré que l'II va diminuer avec la durée d'ozonation et tendre vers zéro au bout d'une certaine durée (Moureu et al. 2015b). Cette étude mettait en avant qu'une durée de 7 heures pour une huile classique et une durée de 4 heures pour une huile THO étaient nécessaires pour atteindre de très faibles valeurs d'II. De plus, nous avons démontré dans le chapitre précédent que la nature du milieu avait peu d'impact sur la consommation des insaturations. Pour obtenir une gamme étalée de valeurs, nous avons donc la possibilité d'étudier plusieurs durées de réactions.

La gamme de valeurs pour l'IP est moins restreinte et a permis d'envisager plus de conditions opératoires. En effet les valeurs les plus faibles étaient représentées par les matières premières avant ozonation. En théorie, il n'existe pas de valeur limite haute à l'IP. Pour influencer cette caractéristique chimique et obtenir une large gamme de valeurs, il est possible d'étudier plusieurs paramètres. Tout d'abord, la durée d'ozonation a un impact sur la valeur de l'IP. Il a été décrit dans la littérature que l'IP tend à augmenter avec la durée d'ozonation (Moureu et al. 2015b). Cette étude montre la présence d'un plateau de valeurs atteint lorsque la durée de réaction est trop longue, ce qui limite l'augmentation des valeurs de l'IP. Il est ensuite connu que la nature du milieu influence la formation d'espèces oxygénées et donc l'indice de peroxyde. À la suite du chapitre précédent, nous savons que l'ajout d'eau et d'acide nonanoïque a permis de moduler les valeurs de l'IP et qu'une quantité trop élevée ne permettait plus de favoriser fortement la formation de peroxydes.

Nous avons ensuite adapté nos technologies d'analyses à la nature des échantillons obtenus. En effet, il est possible d'analyser des produits pâteux, visqueux et fluides par spectroscopie en moyen infrarouge. Pour le choix des conditions opératoires, il est donc important d'anticiper les propriétés physiques du produit. L'étude menée dans le Chapitre 3 nous a notamment permis d'envisager des conditions de synthèse permettant d'obtenir des produits peu visqueux ou fluides, un aspect nécessaire pour une analyse spectroscopique en proche infrarouge.

A l'aide de l'ensemble de ces informations, nous avons tout d'abord mis au point deux ensembles d'échantillons. Le premier ensemble, composé de 64 échantillons, a été mis au point pour des analyses spectrales dans le domaine du moyen infrarouge (Annexe 1). L'ensemble est constitué de différentes matières premières, ozonées selon différentes durées, en présence ou non de solvants. Les durées et quantités de solvants sont adaptées des études déjà menées sur le sujet.

Le deuxième ensemble d'échantillons est composé de 40 échantillons et nous a permis de réaliser des analyses spectrales dans le domaine du proche infrarouge (Annexe 2). L'ensemble est composé de différentes matières premières, ozonées selon différentes durées, et en présence de différents solvants, en différentes quantités. Les conditions opératoires sont notamment adaptées de précédentes recherches. La viscosité trop importante de l'huile de

tourne-sol classique ozonée ne permet pas ici d'envisager des analyses spectrales dans cette gamme d'étude.

La quantité d'échantillons et la diversité des conditions opératoires appliquées à ces deux ensembles nous ont permis d'atteindre l'ensemble de la gamme de valeurs possible pour l'II.

En ce qui concerne l'indice de peroxyde, nous avons pris la décision de réaliser davantage d'échantillons pour obtenir une gamme de teneurs plus étendue. Un dernier set d'échantillons a été rajouté. Il comprend 48 échantillons pour des analyses spectrales dans la gamme du moyen infrarouge et 35 échantillons pour des analyses dans la gamme spectrale du proche infrarouge. Ces essais ont été réalisés exclusivement sur de l'huile THO, en présence de différentes quantités de solvants et selon différentes durées de réactions (Annexe 3).

Nous obtenons finalement un nombre conséquent d'échantillons pour nos deux analyses spectrales à notre disposition (Tableau 32). Ces échantillons ont notamment été soumis à une grande diversité de conditions opératoires et représentent donc une grande variété de produits ozonés.

Tableau 32. Nombre d'échantillons soumis aux différentes analyses spectrales

Analyse spectrale	Nombre d'échantillons caractérisés par II	Nombre d'échantillons caractérisés par IP
MIR	64	112
NIR	40	75

Une fois l'ensemble des ozonations réalisées, nous avons déterminé par les méthodes de référence les indices chimiques des échantillons à notre disposition.

IV.1.3 Caractérisations chimiques des échantillons synthétisés

IV.1.3.1 Détermination de l'indice d'iode

Pour chaque échantillon, cinq mesures ont été effectuées et un résultat moyen est obtenu. Nous avons observé une dispersion des valeurs d'II allant de 0 à 132,6 g I₂/100 g d'échantillon.

La valeur la plus élevée correspond au LM dans son état de matière première et une valeur de 0 correspond à une consommation totale des insaturations lors de la réaction avec l'ozone. Que ce soient les échantillons destinés à une analyse spectrale dans le domaine du MIR ou ceux dans le domaine du NIR, nous pouvons observer une représentation effective de l'ensemble des valeurs comprises entre 0 et 132,6 g I₂ / 100 g (Figure 53). Cette gamme peut être comparée à des gammes étudiées dans la littérature que ce soit dans le domaine MIR ou NIR (Li et al. 1999, Cox et al. 2000, Meng et al. 2013, An 2017).

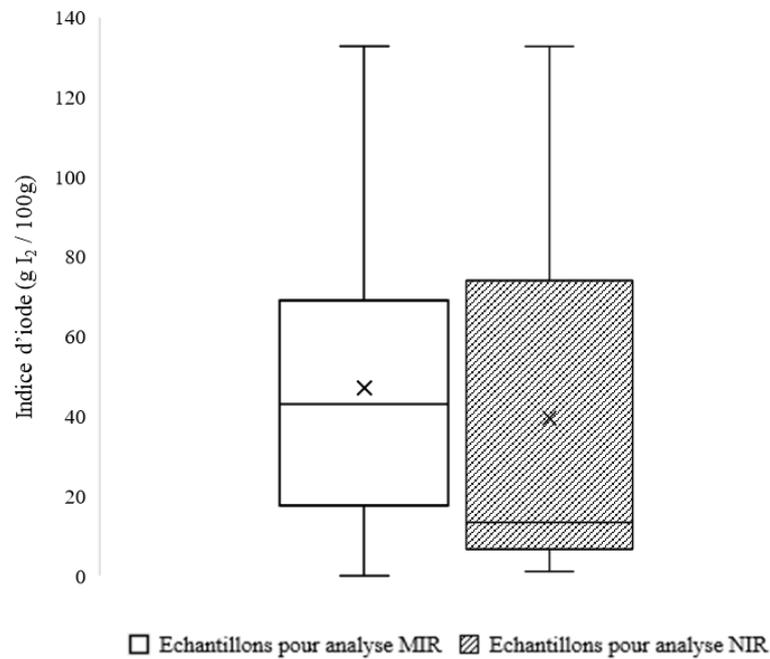


Figure 53. Gammes des indices d'iode mesurés pour les ensembles en fonction des analyses spectrales associées

La Figure 54 représente l'évolution des valeurs de l'II en fonction de la durée de réaction et de la composition du mélange réactionnel. On observe une diminution de l'II pour l'ensemble des matières premières avec l'augmentation de la durée de réaction.

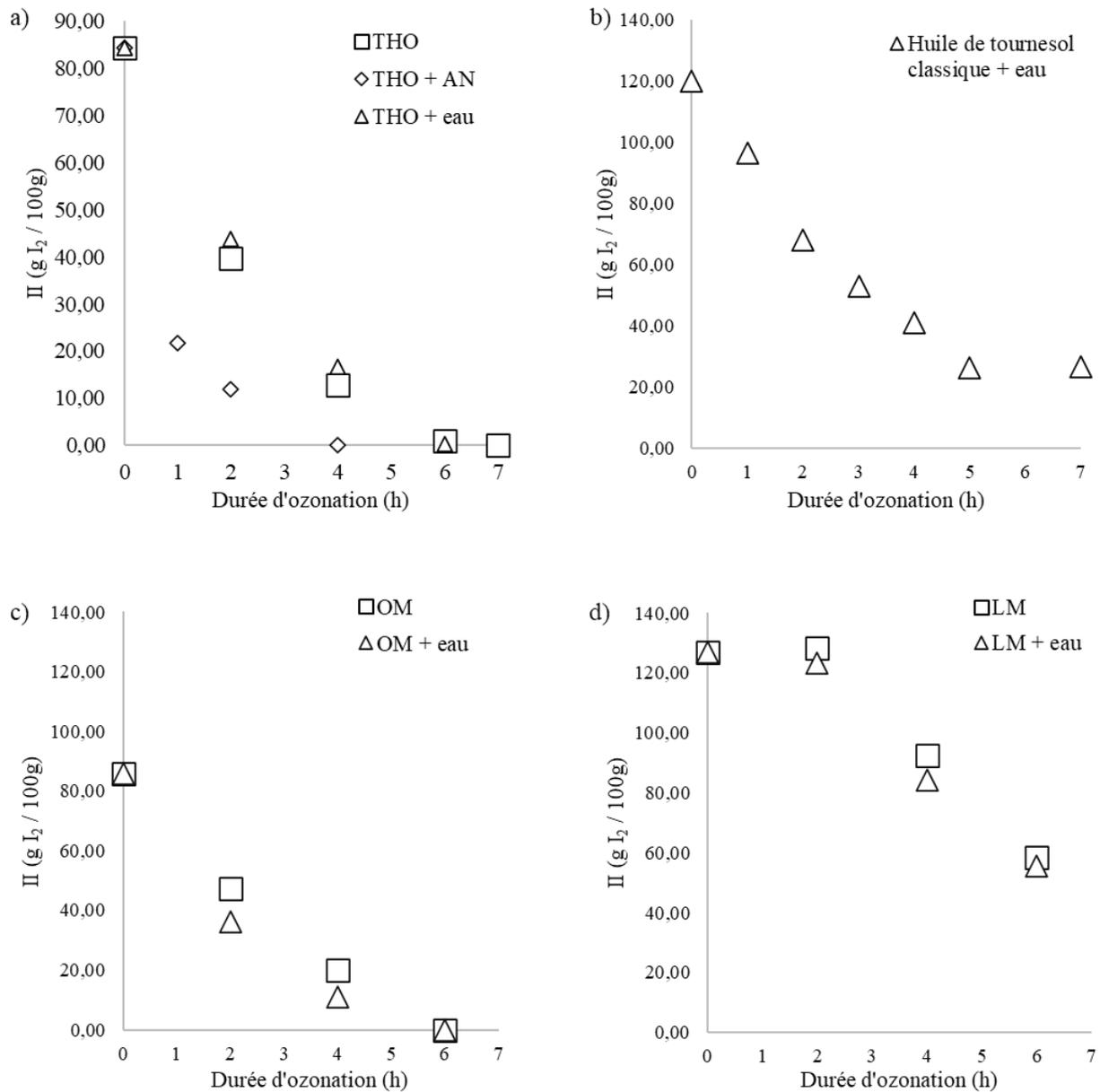


Figure 54. Evolution de l'II moyen en fonction de la durée de réaction et de la composition du mélange et des différentes matières premières, a) huile THO, b) huile de tournesol classique, c) oléate de méthyle, d) linoléate de méthyle

Ce phénomène est en accord avec les études déjà menées et s'explique par la consommation des insaturations par réaction avec l'ozone. On distingue que l'ajout d'eau n'a pas d'impact visuel sur la cinétique de consommation des insaturations. L'ajout d'acide nonanoïque favorise la réaction d'ozonation d'huile THO avec une diminution plus rapide de l'II, ce qui correspond aux remarques déjà effectuées dans le chapitre précédent. Les matières premières qui contiennent le plus d'insaturations (huile classique et LM) peuvent être ozonées

plus longtemps et possèdent des valeurs d'II plus élevées car elles contiennent initialement plus d'insaturations (Diaz et al. 2006).

IV.1.3.2 Détermination de l'indice de peroxyde

De même que pour l'indice d'iode, nous avons effectué cinq mesures pour un échantillon et un résultat moyen est obtenu. La gamme des IP déterminés s'étend de 0,9 à 3067,6 méq d'O actif/kg d'échantillon. Les valeurs les plus faibles correspondent aux matières premières dans leur état non ozonées et les valeurs maximales s'obtiennent en présence de solvant et notamment de l'eau. De même que pour l'II, nous pouvons observer une représentation effective de l'ensemble des valeurs comprises entre 0,9 et 3067,6 méq O actif / kg pour les deux types d'analyses spectrales envisagées (Figure 55). On observe directement que notre gamme est bien plus étendue que les gammes déjà étudiées dans la littérature qui vont de quelques dizaines à quelques centaines de milliéquivalents d'oxygène actif/kg (Ma et al. 1997, Guillen & Cabo 2002, Li et al. 2000, Seweh et al. 2019).

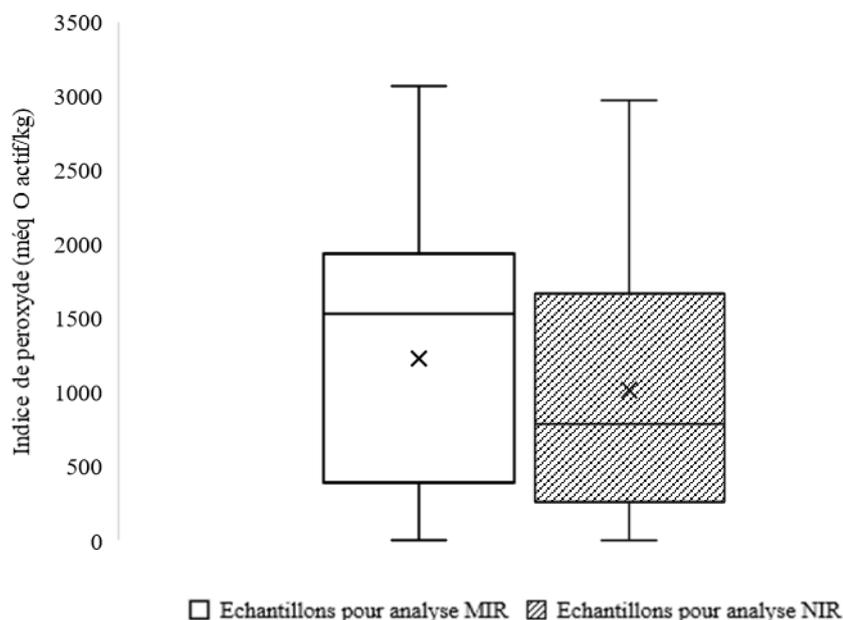


Figure 55. Gammes des indices de peroxyde mesurés pour les ensembles en fonction des analyses spectrales associées

Différents phénomènes peuvent être observés au regard de l'évolution de l'IP avec la durée de réaction (Figure 56). Pour l'ensemble des échantillons, on observe tout d'abord une augmentation de la valeur de l'IP avec la durée de l'ozonation, ce qui est en accord avec le mécanisme réactionnel. En effet, l'addition d'ozone sur les chaînes grasses va entraîner la

formation d'espèces oxygénées. On remarque aussi que l'addition d'un milieu protique (eau ou acide nonanoïque) favorise la formation d'espèces oxygénées quelle que soit la matière première.

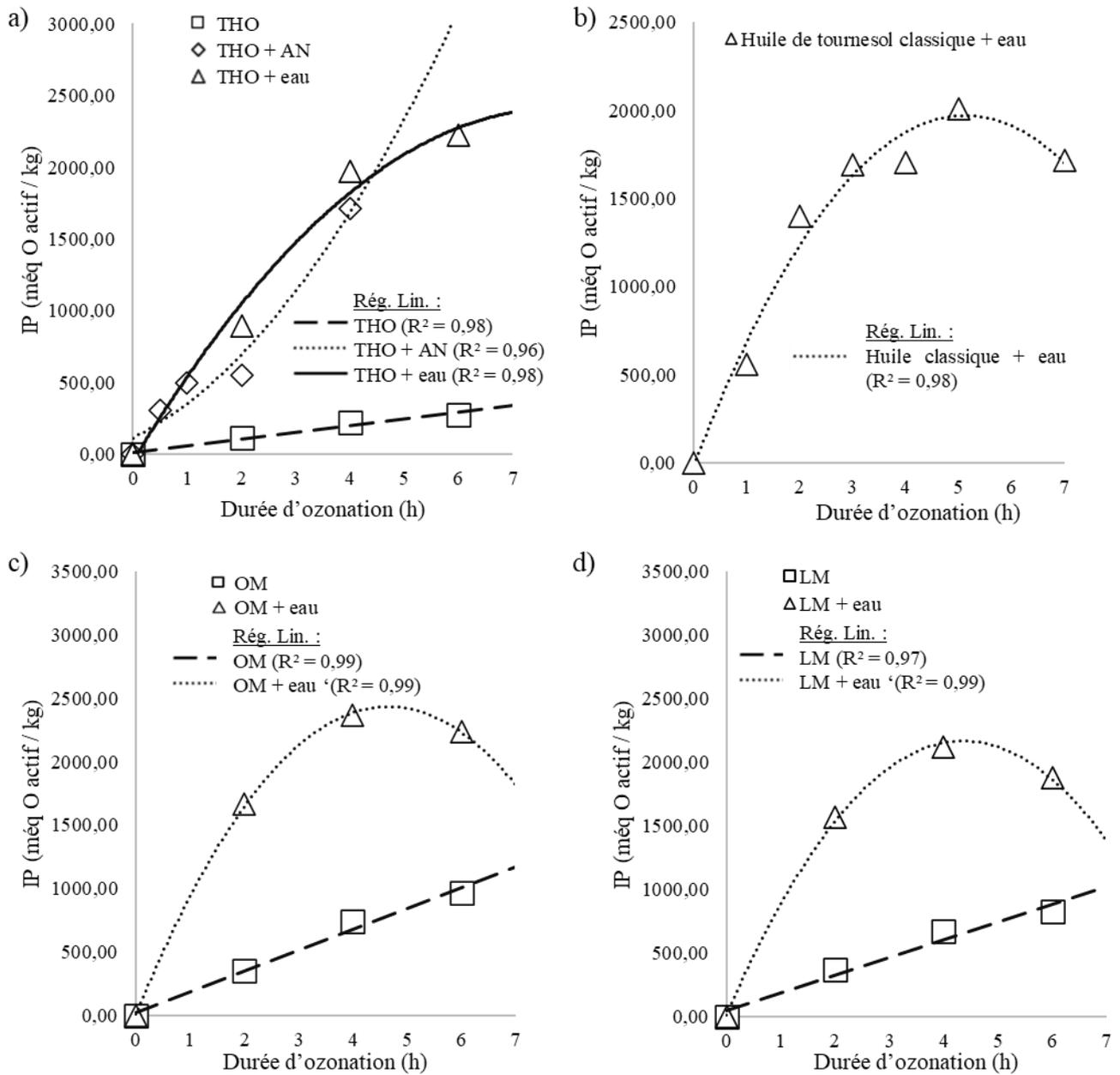


Figure 56. Evolution de l'IP moyen en fonction de la durée de réaction et de la composition du mélange et des différentes matières premières, a) huile THO, b) huile de tournesol classique, c) oléate de méthyle, d) linoléate de méthyle

Cette influence a déjà été démontrée et expliquée dans le chapitre précédent. Ces résultats viennent donc appuyer les observations déjà faites. En présence d'eau, l'IP semble atteindre une valeur maximale et il apparait un phénomène de plateau. Deux hypothèses

pourraient expliquer cette évolution. La première est qu'il reste moins d'insaturations dans le milieu au bout de cette durée comme nous pouvons l'observer sur la Figure 52, donc il est difficile de produire plus d'espèces oxygénées (Sega et al. 2010) et l'IP n'augmente plus. La seconde est que les peroxydes continuent d'être générés, mais en parallèle une partie de ces composés subit une dégradation physique ou est oxydée, en raison de la présence d'ozone en excès, pour former des composés secondaires (par exemple des aldéhydes ou des acides carboxyliques) (Moureu et al. 2015b). L'ensemble de ces résultats illustre bien la diversité de nos mélanges et les valeurs atteintes sont représentatives d'une large gamme.

IV.1.3.3 Fiabilité de la méthode

Il est intéressant de remarquer que la détermination d'une valeur par dosage volumétrique entraîne l'apparition d'une erreur sur cette valeur (cinq mesures pour un seul échantillon). Nous avons déterminé une erreur moyenne sur les valeurs obtenues pour l'II et l'IP en fonction de la nature de la matière première et de la présence de solvant (Tableau 33).

Tableau 33. Erreur moyenne sur les déterminations de l'II et l'IP en fonction de la composition du mélange

Matière ozonée	Indice d'iode (g I ₂ / 100g)		Indice de peroxyde (még O actif / kg)	
	Erreur moyenne	Proportion moyenne de l'erreur / valeur moyenne mesurée (%)	Erreur moyenne	Proportion moyenne de l'erreur / valeur moyenne mesurée (%)
THO	0,66	3,31	15,14	7,62
THO + eau	2,60	14,05	180,27	10,11
THO + AN	1,25	5,95	101,60	23,52
THO + eau + AN	0,69	9,02	237,18	11,94
Huile de tournesol + eau	3,94	7,96	141,86	9,02
OM	0,74	3,25	45,42	6,66
OM + eau	1,36	9,00	145,04	6,80
LM	1,00	0,98	40,86	7,94
LM + eau	2,40	2,88	205,41	10,72

En ce qui concerne l'indice d'iode, les erreurs ne sont pas élevées (< 4 gI₂ / 100g) et représentent moins de 10% de la valeur moyenne mesurée, sauf pour le cas l'huile THO et de l'eau. La mesure de l'II apparaît donc précise et fiable. Pour la détermination de l'indice de peroxyde, les erreurs sont plus élevées (jusqu'à plus de 200 még O actif / kg) et peuvent

représenter une proportion plus importante de la valeur moyenne obtenue (jusqu'à plus de 23%). On peut distinguer que l'ajout d'eau entraîne systématiquement une erreur plus élevée pour les deux indices, quelle que soit la matière première. On peut expliquer ce phénomène par la nature même du dosage et la viscosité du produit en milieu aqueux. Il apparaît tout d'abord une augmentation de la viscosité avec la durée de l'ozonation mais aussi avec l'ajout d'eau, comme observé dans le chapitre précédent. Ainsi, plus un produit présente une viscosité élevée, plus la réaction entre les réactifs du dosage volumétrique et le composé ozoné sera complexe et plus l'erreur sera importante. Par exemple, le composé peut être plus difficile à dissoudre (Diaz et al. 2006, Ugazio 2020). On peut finalement dire que la méthode de détermination des indices par dosages volumétriques peut présenter une marge d'erreur à prendre en considération.

Une fois l'ensemble de notre base de données d'échantillons caractérisée, elle a ensuite été soumise à des analyses spectrales adaptées à chacun des mélanges.

IV.2 Analyses spectrales des échantillons synthétisés

IV.2.1 Analyses par spectroscopie moyen infrarouge

La spectroscopie dans la gamme du moyen infrarouge (2600 à 25000 nm ou 4000 à 400 cm^{-1}) (Travagli et al. 2010) est très utile pour étudier les matières grasses et les matières ozonées car elle permet de livrer des informations sur des fonctions chimiques précises, et notamment de suivre l'apparition et la disparition de fonctions particulières à la réaction d'ozonation. Une simple goutte de produit déposé sur une carte d'acquisition ST-IR en polyéthylène permet d'obtenir un spectre d'acquisition. Les spectres sont réalisés trois fois pour un échantillon et un spectre moyen est déterminé (Figure 57).

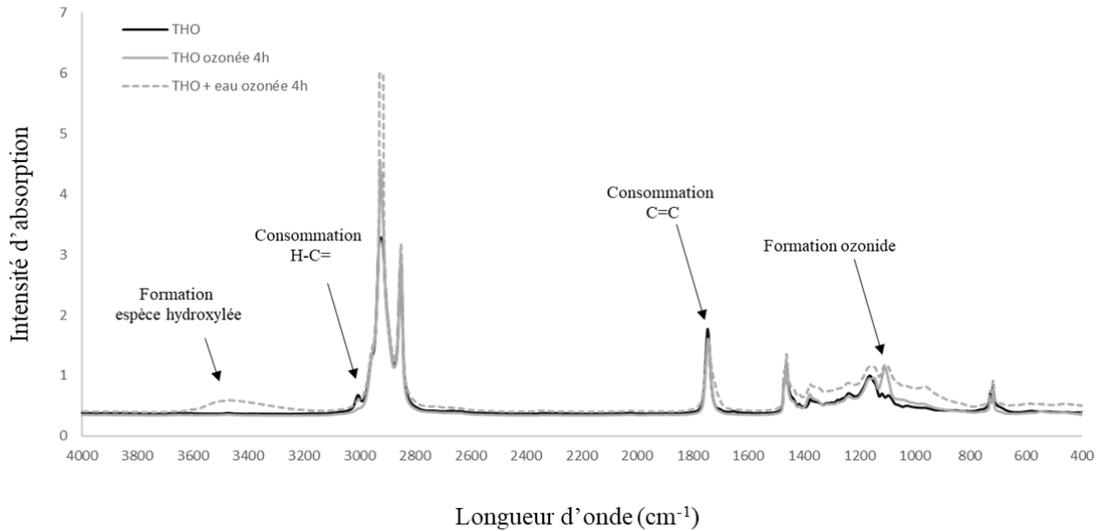


Figure 57. Exemples de spectres d'absorption MIR pour différentes compositions et différentes conditions de réaction

Dans un premier temps, il est possible d'évaluer la consommation des insaturations présentes sur les chaînes grasses de toutes les matières premières. En effet, cette double liaison entre deux atomes de carbone est caractérisée par une bande d'absorption vers 1700 cm^{-1} . De plus, la liaison C-H liée aux insaturations est caractérisée par une bande d'absorption vers 3000 cm^{-1} (Zanardi et al. 2008, Georgiev et al. 2015). La double liaison carbone – carbone (environ $1,37\text{ Angström}$) va tendre à devenir une liaison simple carbone – carbone (environ $1,54\text{ Angström}$) lors de l'addition cyclique de la molécule d'ozone sur l'insaturation et la formation du composé 1,2,3-trioxolane (I) (Figure 58). Cette nouvelle liaison est plus grande, on observe donc un étirement de la liaison chimique carbone – carbone et donc une diminution de l'intensité des bandes d'absorptions. Le raisonnement est similaire pour les hydrogènes liés à l'insaturation.

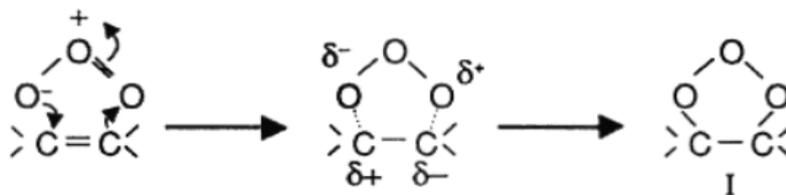


Figure 58. Addition cyclique de l'ozone sur une insaturation

Une autre famille de composés chimiques présente un intérêt dans la réaction d'ozonation des matières grasses, il s'agit des composés oxydés. Au regard du mécanisme

réactionnel, la consommation des insaturations entraîne la formation d'ozonides. On peut caractériser ce type de composés à l'aide de l'apparition et l'augmentation de la bande d'absorption vers 1100 cm^{-1} , qui s'explique par l'étirement de la liaison C-O des ozonides (Zanardi et al. 2008, Georgiev et al. 2015). On peut aussi identifier la formation d'espèces hydroxylées (acides carboxyliques et/ou hydroperoxydes) avec l'apparition d'un large pic entre 3200 et 3600 cm^{-1} . Ce phénomène est particulièrement visible en milieu protique. Il peut cependant aussi apparaître des traces d'eau dans ce domaine spectral. Enfin, la formation d'espèces carbonylées est associée à l'augmentation de l'intensité de la bande vers 1750 cm^{-1} (Guillén and Cabo 2002, Soriano et al. 2003, John, Bhattacharya, et Raynor 2004). Il peut donc être intéressant de relier ces différentes bandes caractéristiques à la variation de la composition chimique globale et donc à l'indice d'iode ou l'indice de peroxyde.

IV.2.2 Analyses par spectroscopie proche infrarouge

La spectroscopie dans la gamme du proche infrarouge s'étend de 800 à 2500 nm (12500 cm^{-1} à 4000 cm^{-1}). Elle est moins utilisée pour caractériser les matières grasses et les huiles ozonées car le spectre d'absorption révèle moins d'informations sur des fonctions chimiques précises (Dufour 2009). Un faible volume d'échantillon (environ 2 mL) est inséré dans une cuve de spectrophotométrie puis une mesure en transmission de l'absorbance est effectuée. Les spectres sont réalisés trois fois pour un échantillon et un spectre moyen est déterminé (Figure 59).

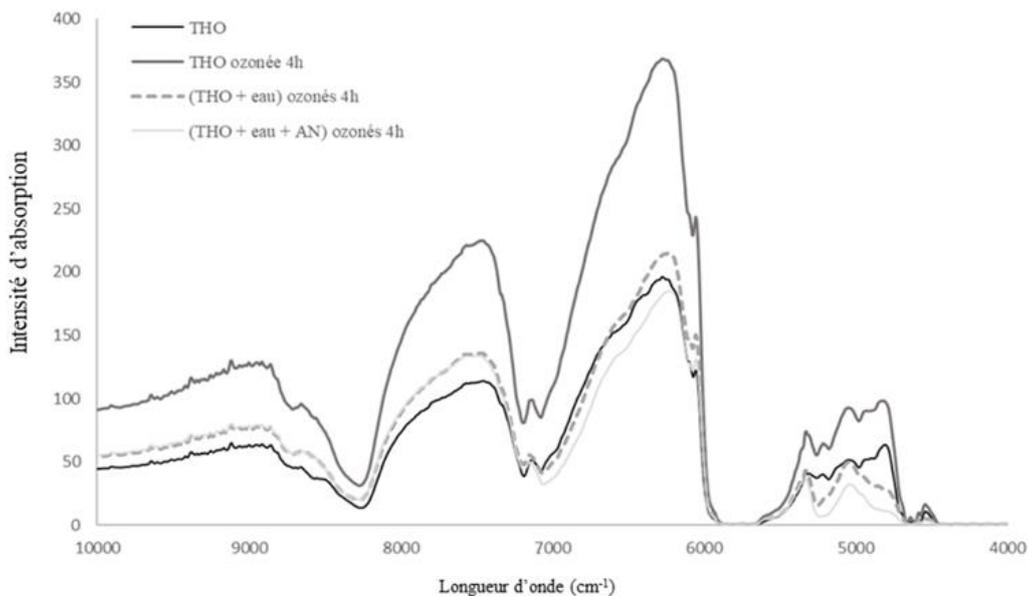


Figure 59. Exemple de spectres d'absorptions NIR pour différentes compositions et différentes conditions d'ozonation

Les études déjà réalisées dans le domaine des huiles et graisses alimentaires ont permis de déterminer certaines bandes d'absorption intéressantes. Les spectres obtenus proviennent d'absorptions superposées correspondant principalement à des harmoniques et à des combinaisons de modes vibratoires impliquant des liaisons chimiques C-H, O-H, C=C et C=O (Li-Chan et al. 2010, Stefanov et al. 2013). Il est ainsi possible de relier certaines parties du spectre à des fonctions chimiques comme les doubles liaisons carbone-carbone. Trois domaines d'intérêts peuvent être isolés : $9100-7140\text{ cm}^{-1}$ (1100-1400 nm), $6100-5900\text{ cm}^{-1}$ (1640-1695 nm), $4700-4500\text{ cm}^{-1}$ (2130-2220 nm). Ces régions permettent d'expliquer la variation de la longueur de la liaison C-H liée à l'insaturation ainsi que la variation de longueur de double liaison (Li et al. 1999, Adewale et al. 2014). Un raisonnement similaire est possible pour les liaisons C-O et O-H, caractéristiques des espèces de peroxydes et il a été isolé deux domaines qui peuvent représenter l'évolution des liaisons précédemment citées : $7400-6800\text{ cm}^{-1}$ (1350-1470 nm) et $4800-4400\text{ cm}^{-1}$ (2080-2270 nm) (Moh et al. 1999, Gertz et al. 2013, Skvaril et al. 2017).

IV.3 Prédiction des indices chimiques par spectroscopie infrarouge

IV.3.1 Mise au point des modèles de prédiction

L'ensemble de l'étude a mené à mettre au point quatre modèles de prédictions. Deux modèles ont été développés dans la gamme spectrale du moyen infrarouge pour prédire l'II et l'IP. Puis, deux modèles ont été construits dans la gamme spectrale du proche infrarouge pour estimer les deux indices chimiques.

Pour chacun des modèles, l'ensemble des échantillons correspondant a été divisé en deux pour obtenir un ensemble de calibration qui permet de mettre au point le modèle par rapport à des valeurs de référence et un ensemble de prédiction, ou set de validation externe, qui sert à tester le modèle sur des échantillons dont on connaît les valeurs de références. On peut alors comparer les valeurs prédites et les valeurs réelles pour évaluer les performances du modèle. On utilise une proportion de 70% des échantillons pour constituer le premier ensemble et les 30% restant permettent de constituer le second ensemble. Les échantillons ont été choisis au hasard et nous nous sommes assurés que les échantillons de l'ensemble de prédiction

n'étaient pas hors de la plage des valeurs de l'ensemble de calibration. Le nombre d'échantillons de ces ensembles dans le cadre de notre étude est présenté dans le Tableau 34.

Tableau 34. Constitution des ensembles de calibration et des ensembles de prédiction

Gamme spectrale	Prédiction de l'II			Prédiction de l'IP		
	Nombre total d'échantillons	Ensemble de calibration	Ensemble de prédiction	Nombre total d'échantillons	Ensemble de calibration	Ensemble de prédiction
Moyen infrarouge	64	42	22	112	74	38
Proche infrarouge	40	27	13	75	52	23

Une fois ces ensembles constitués, la mise au point du modèle se base tout d'abord sur l'ensemble de calibration. Il a ensuite été déterminé si l'ensemble de la gamme spectrale était conservé ou si le modèle se basait exclusivement sur des zones spectrales présentant un intérêt. Ces zones peuvent être liées à des bandes caractéristiques, elles-mêmes liées à des composés consommés pendant la réaction d'ozonation ou à des produits formés.

Une fois que nous avons fait ce choix, des prétraitements mathématiques peuvent être appliqués aux données spectrales pour réduire ou éliminer le bruit de fond. Les spectres prétraités sont ensuite confrontés aux valeurs numériques des indices chimiques déterminées précédemment. Un modèle mathématique est développé pour prédire les indices II et IP à partir des spectres infrarouges prétraités. Ce modèle comporte plusieurs facteurs (PLS) et est développé pour chaque prétraitement mathématique. Plus le nombre de facteurs du modèle est faible, et plus la prédiction du paramètre est robuste.

On utilise ensuite la méthode de la validation externe. Les différents modèles PLS sont alors utilisés pour prédire les indices chimiques des échantillons du set de validation externe, à partir de leurs spectres infrarouges. Pour chaque échantillon à prédire, une valeur numérique peut être déterminée et comparée à la valeur de référence obtenue par dosage chimique. On peut alors décrire la qualité du modèle à l'aide de trois facteurs : le coefficient de détermination (R^2), l'erreur quadratique moyenne (RMSE) et la déviation prédictive résiduelle (RPD). Le R^2 est déterminé en comparant les valeurs déterminées par le modèle de prédiction et les valeurs de référence pour tous les échantillons du set de validation externe. Plus R^2 est proche de 1 et plus les valeurs prédites sont proches des valeurs de références. La RMSE permet d'avoir une

information sur l'erreur applicable à une prédiction du modèle, il faut donc que le RMSE soit la plus faible possible. Enfin, le RPD prend en compte les écarts-types des valeurs de référence de l'ensemble de prédiction et les erreurs issues de la prédiction. Plus la valeur du RPD est élevée, plus le modèle a de chances de prédire avec précision la composition chimique d'un nouvel ensemble d'échantillons. La valeur du RPD peut justifier de la qualité du modèle selon les critères : 0,0-2,3 comme non recommandé, 2,4-3,0 comme qualité de criblage très grossière, 3,1-4,9 comme qualité de criblage, 5,0-6,4 comme contrôle de qualité, 6,5-8,0 comme contrôle de processus, et > 8,1 adaptées à toute application (Williams et al. 2001, Natsuga et al. 2006). La comparaison des performances des modèles permet de sélectionner le meilleur modèle (R^2 et RPD les plus élevés, RMSE la plus faible).

IV.3.2 Prédiction des indices chimiques à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge

Etant donné la faible quantité de méthodologie existante concernant la prédiction de paramètres chimiques sur des matrices ozonées, nous nous sommes intéressés à la littérature concernant la détermination de ce paramètre par spectroscopie MIR sur diverses matières grasses non oxydées.

IV.3.2.1 Prédiction de l'II à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge

Pour établir un modèle de prédiction, il faut tout d'abord déterminer si la globalité du spectre va pouvoir expliquer la variation d'un paramètre ou s'il faut considérer une ou plusieurs gammes de longueurs d'ondes. Après avoir observé les spectres obtenus, on constate rapidement que l'évolution de la bande spectrale vers 3000 cm^{-1} peut apporter des informations rapides pour estimer la valeur de l'II. La plupart des études considèrent en effet des gammes spectrales qui possèdent la longueur d'onde 3000 cm^{-1} pour établir des modèles de prédiction pour l'indice d'iode. Cette technique permet de limiter l'analyse à une région qui contient le plus d'informations relatives au paramètre désiré et de réduire les interférences dues à la contribution spectrale d'autres composants. Dans le cadre de l'indice d'iode, il est possible de limiter l'étude à des zones nous apportant des informations en rapport aux doubles liaisons carbone – carbone et aux liaisons hydrogènes associées. On retrouve ainsi des études restreintes aux gammes suivantes : $3025 - 2992\text{ cm}^{-1}$ (Che Man et al. 1999), $3070 - 3005\text{ cm}^{-1}$ (Talpur et al. 2014), $3017,5 - 3004,2\text{ cm}^{-1}$ (Tavassoli-Kafrani 2017). Une étude a même été menée uniquement sur la longueur d'onde 3009 cm^{-1} (An 2017). Il apparait donc nécessaire d'orienter

notre étude sur une telle gamme spectrale. L'ensemble des modèles déterminés et l'évaluation des paramètres associés sont présentés dans le Tableau 35.

Tableau 35. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du moyen infrarouge

Indice chimique étudié	Gamme de valeurs	Domaine spectral étudié (cm ⁻¹)	Pré-traitements	Nombre de facteurs PLS	R ² val	RMSE	RPD
II (gI ₂ /100 g)	0 - 132,6	spectre complet	aucun	7	0,919	10,68	3,6
		3040-2990	aucun	3	0,917	12,54	3,1
		3040-2990	SNV	3	0,946	9,149	4,2

Tout d'abord, on constate que les RPD obtenus permettent d'estimer nos modèles comme possédant une qualité pour le criblage (Cozzolino et al. 2004). Les valeurs obtenues pour la RMSE sont satisfaisantes car elles représentent moins de 10% de l'étendue de la gamme complète. Il est donc possible de discriminer un échantillon possédant un II élevé d'un échantillon possédant peu d'insaturations. L'application d'un prétraitement et la limitation de la gamme spectrale permet d'obtenir les meilleurs résultats. La valeur de R² peut être expliquée par le nombre d'échantillons et la difficulté à estimer avec une haute précision la valeur de l'II par dosage chimique pour l'ensemble des échantillons, notamment les échantillons en milieu aqueux.

IV.3.2.2 Prédiction de l'IP à l'aide de la spectroscopie moyen infrarouge

Concernant la détermination de l'indice de peroxyde, il apparait plus compliqué d'isoler une gamme précise pour expliquer l'évolution globale de ce paramètre. Des études ont suivi l'évolution de la formation d'espèces hydroxylées avec l'apparition d'un épaulement vers 3500 cm⁻¹ et fixent donc la gamme d'étude sur 3600 – 3250 cm⁻¹ (Guillen et Cabo 2002) ou 3750-3350 cm⁻¹ (Ma et al. 1997). Yu et al. (2007) ont démontré une linéarité entre l'évolution du spectre vers 542 cm⁻¹ et l'évolution de l'IP d'huiles comestibles. Comme l'IP est influencé par différents composés, il semble logique de devoir considérer une grande partie du spectre voire le spectre global pour tenter de réaliser des modèles de prédiction de cet indice chimique. L'ensemble des modèles déterminés et l'évaluation des paramètres associés sont présentés dans le Tableau 36.

Tableau 36. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du moyen infrarouge

Indice chimique étudié	Gamme de valeurs	Domaine spectral étudié (cm ⁻¹)	Pré-traitements	Nombre de facteurs PLS	R ² val	RMSE	RPD
IP (meq O actif/kg)	0,9 - 3067,6	spectre complet	aucun	7	0,92	239,53	3,43
		spectre complet	SNV	7	0,93	219,33	3,52

On obtient des valeurs de RPD similaires aux modèles développés pour l'estimation de l'II, ce qui justifie d'une qualité suffisante pour un criblage et une estimation de l'indice chimique désiré (Cozzolino et al. 2004). Les valeurs des RMSE représentent moins de 10% de l'étendue de la gamme complète, ce qui reste faible et donc intéressant pour la prédiction d'une valeur. On remarque que l'application d'un prétraitement n'améliore pas fortement la robustesse du modèle.

IV.3.2.3 Bilan de l'étude utilisant la spectroscopie moyen infrarouge

Après l'observation de l'ensemble de nos résultats, on remarque plusieurs intérêts à la méthodologie de prédiction d'indices chimiques à l'aide de la spectroscopie MIR. Que ce soit pour l'II ou pour l'IP, nous obtenons des modèles qui présentent assez de robustesse pour un criblage et une estimation des valeurs des indices chimiques. En effet, les meilleurs résultats nous ont permis d'obtenir des RPD de 4,2 pour l'II et de 3,5 pour l'IP. La représentation des valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées par méthode chimique pour les meilleurs résultats permet d'observer l'intérêt de nos modèles (Figure 60).

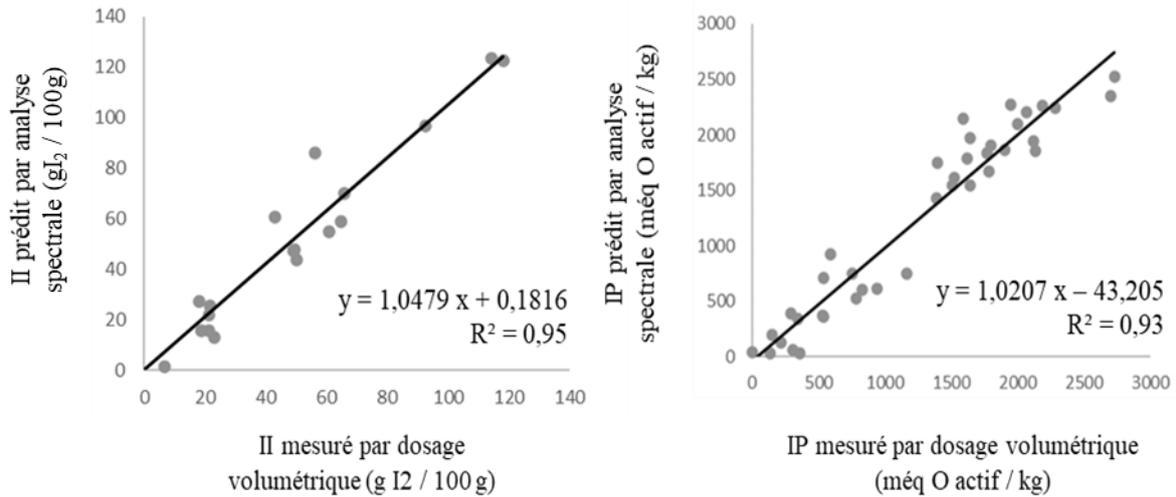


Figure 60. Représentation des valeurs prédites face aux valeurs mesurées pour les deux indices chimiques

Si on compare ces deux modèles et la méthodologie développée à la méthode des titrages volumétriques, on peut constater de nombreux avantages à l'utilisation de la spectroscopie en moyen infrarouge (Tableau 37).

Tableau 37. Comparaison entre la méthode de détermination chimique et la prédiction par analyse spectrale des indices chimiques

	Dosage volumétrique	Prédiction par analyse spectrale
Réalisation d'une mesure	Préparation d'un échantillon pour une seule mesure. Plusieurs mesures nécessaires pour une moyenne	Une acquisition spectrale suffit. Il est possible d'en réaliser une multitude pour un seul échantillon
Durée (min)	> 10	< 1
Consommables	Solvants toxiques, verreries	Carte acquisition ST-IR
Quantité d'échantillon nécessaire	Plusieurs grammes	Quelques gouttes
Erreur moyenne min (g I₂ / 100 g)	3,5	9,15
Erreur moyenne IP (még O actif / kg)	175,33	235,46

La rapidité d'acquisition, la faible quantité nécessaire d'échantillon et l'absence de produits dangereux en font une méthode alternative d'intérêt. On observe que pour l'IP, les erreurs obtenues sur les valeurs sont du même ordre de grandeur, ce qui justifie une fois de plus l'intérêt pour l'utilisation de la spectroscopie MIR pour la prédiction de l'IP. Bien que l'erreur pour la prédiction de l'II soit 3 fois supérieure à celle obtenue par dosage chimique, elle reste malgré tout faible à la vue de l'étendue de la gamme étudiée. On peut toutefois noter l'intérêt d'être plus précis au moment de la détermination des indices de référence pour éviter d'amplifier l'erreur obtenue lors de la mise au point du modèle.

Il est important de relever le fait que notre modèle couvre une large gamme de valeurs pour l'II et l'IP et permet d'étudier une diversité de corps gras et d'échantillons ozonés selon différentes conditions (différentes durées, présence ou non de différents solvants, différentes matières premières).

IV.3.3 Prédiction des indices chimiques à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge

Pour déterminer le nombre de longueurs d'ondes à prendre en compte, nous nous sommes appuyés sur la même méthodologie que pour la gamme spectrale du moyen infrarouge. En se basant sur la littérature, nous avons observé que les études sur les huiles vierges ne s'appuyaient pas forcément sur l'ensemble du spectre mais seulement sur des gammes restreintes.

IV.3.3.1 Prédiction de l'II à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge

Les études visant à estimer l'indice d'iode s'appuient sur des bandes spectrales comprenant les gammes suivantes : $9100-7140\text{ cm}^{-1}$; $6100-5900\text{ cm}^{-1}$; $4700-4500\text{ cm}^{-1}$ (Li et al. 1999, Adewale et al. 2014). En effet, ces bandes sont représentatives de l'évolution de la double liaison carbone – carbone, comme nous l'avons décrit précédemment. Certains pré-traitements mathématiques ont été testés mais les résultats ne représentaient pas assez d'intérêt pour être présentés ici. Les modèles présentant les meilleurs résultats et l'évaluation des paramètres associés sont reportés dans le Tableau 38.

Tableau 38. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du proche infrarouge

Indice chimique étudié	Gamme de valeurs	Domaine spectral étudié (cm ⁻¹)	Pré-traitements	Nombre de facteurs PLS	R ² val	RMSE	RPD
II (g I ₂ / 100 g)	0 - 132,6	spectre complet	aucun	5	0,89	14,35	2,68
		9100 - 7140 et 6100 - 5900	aucun	5	0,89	14,67	2,62

D'après les valeurs de RPD que nous obtenons, les modèles développés se présentent avec une qualité de criblage très grossière. Ces résultats apparaissent donc comme une preuve de concept et il est nécessaire d'apporter des améliorations à la méthodologie. Certaines études procèdent par exemple à des modifications chimiques de l'échantillon avant d'effectuer une analyse spectrale à l'aide par exemple d'une dissolution ou d'une diminution de la viscosité en chauffant (Li et al. 2000, Adewale et al. 2014). Il est possible aussi d'envisager une analyse en réflexion plutôt qu'en transmission.

IV.3.3.2 Prédiction de l'IP à l'aide de la spectroscopie proche infrarouge

Les études qui s'orientent à évaluer l'indice de peroxyde s'appuient quant à elle sur des bandes spectrales comprenant les longueurs d'ondes 7400-6800 cm⁻¹ et 4800-4400 cm⁻¹ (Moh et al. 1999, Gertz et al. 2013, Skvaril et al. 2017). Ces longueurs d'ondes tendent en effet à être représentatives des liaisons C-O et O-H. De même que pour l'II, des pré-traitements ont été testés mais seulement les résultats les plus intéressants ont été reportés dans le Tableau 32.

Tableau 39. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'IP à l'aide de la gamme spectrale du proche infrarouge

Indice chimique étudié	Gamme de valeurs	Domaine spectral étudié (cm ⁻¹)	Pré-traitements	Nombre de facteurs PLS	R ² val	RMSE	RPD
IP (méq O actif / kg)	0,9 - 3067,6	spectre complet	aucun	5	0,79	356,4	2,18
		7400 - 6800 et 4800 - 4400	SNV	7	0,77	375,1	2,08

L'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge pour la prédiction de l'IP n'apparaît pas comme recommandé dans ces conditions d'utilisation à la vue des valeurs de RPD obtenues. En plus de revoir la méthodologie de préparation de l'échantillon, il peut être intéressant d'envisager une approche différente pour la mise au point des modèles. Par exemple, il est possible d'envisager des modèles sur des gammes plus restreintes de valeurs, ce qui pourrait nous permettre de nous affranchir d'une viscosité qui augmente lorsque l'IP augmente fortement. De plus, il peut être nécessaire d'adapter les modèles à chaque matière première prise séparément. Finalement, pour améliorer la méthodologie, il faut sans doute laisser de côté la diversité d'application et favoriser une application particulière, en limitant l'étude à une matière première ou une gamme d'indices par exemple.

IV.3.3.3 Bilan de l'étude utilisant la spectroscopie proche infrarouge

L'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge pour estimer les indices chimiques apparaît ici plus comme une preuve de concept qu'une méthodologie finie et applicable. La prédiction de l'indice d'iode nécessite quelques modifications pour améliorer la robustesse du modèle tandis que la prédiction de l'IP implique de modifier la méthodologie en augmentant la spécificité des échantillons.

IV.4 Conclusion

Nous pouvons conclure qu'il est possible d'estimer l'indice d'iode et l'indice de peroxyde de différentes matières grasses ozonées en quelques minutes grâce à la spectroscopie en moyen infrarouge. Si nous comparons les performances des meilleurs modèles infrarouges avec les méthodes de référence par des dosages chimiques, nous pouvons remarquer de nombreux avantages à utiliser un modèle infrarouge pour déterminer les paramètres chimiques de nos échantillons.

Les modèles développés couvrent une large gamme de valeurs pour l'II et l'IP et permettent d'étudier une diversité de corps gras et d'échantillons ozonés selon différentes conditions. Ils présentent une polyvalence au dépend d'une précision élevée, cependant il peut être facilement envisageable d'améliorer les performances obtenues.

Dans un premier temps, en mettant au point des modèles moins polyvalents mais plus spécifiques, une étude limitée à un seul corps gras peut en effet laisser envisager un modèle plus robuste.

Ensuite, il pourrait aussi être intéressant de réaliser différents modèles en fonction des valeurs attendues et donc de travailler sur des gammes d'indices plus restreintes. Le fait de vouloir couvrir une gamme large de valeurs d'indices, que ce soit pour l'indice d'iode ou de peroxyde, impacte inévitablement la performance du modèle. Si l'opérateur possède une estimation sur l'état du milieu avant analyse, il est tout à fait possible d'envisager des modèles pour des indices élevés, des indices intermédiaires et des indices faibles. La plupart des modèles développés sur huiles vierges dans la littérature s'axent en effet sur des gammes assez restreintes.

Enfin des méthodes de chimiométrie plus élaborées pourraient être mise en place avec par exemple l'utilisation de réseaux de neurones artificiels (ANN). Un neurone est une unité de calcul capable de transformer des données à l'aide de fonctions mathématiques et de transférer le résultat à d'autres unités. Un ANN se structure en plusieurs couches de neurones successives, dont une couche d'entrée, une ou plusieurs couches intermédiaires dites cachées, et une couche de sortie (Nielsen 2015, Tréguier 2020). Cette méthode permet de discriminer encore plus efficacement l'influence de chaque longueur d'onde d'un spectre obtenu pour un échantillon sur les indices désirés mais il faudrait plusieurs centaines d'échantillons.

Il est aussi important de remarquer que l'ensemble de la méthodologie se base sur une mesure d'II ou d'IP par dosages chimiques. Cette mesure présente elle-même une variabilité qui n'est pas négligeable. Pour obtenir des prédictions plus performantes, il est possible d'utiliser une autre méthode de référence qui serait elle-même plus précise. On peut envisager d'utiliser par exemple des quantifications par RMN ou CPG pour la mesure de l'II.

L'estimation dans le proche infrarouge est plus compliquée mais des modifications du protocole et une meilleure compréhension de la complexité du mélange peuvent être envisagées pour obtenir de meilleurs résultats, qu'il peut être intéressant d'exploiter dans le domaine des huiles ozonées.

En effet, cette gamme spectrale présente un intérêt particulier dans sa technologie d'utilisation. Les analyses sont réalisables sur des échantillons liquides et peuvent donc parfaitement s'adapter pour une utilisation dans un procédé en flux continu en faisant suite à l'étude du chapitre III. Cette méthode est notamment utilisée pour le suivi de la transestérification éthanolique d'huile végétale en microréacteur (Richard 2011). D'un autre côté, nous avons mis au point au laboratoire un réacteur semi continu dans lequel il est possible de réaliser une mesure d'absorbance dans la gamme spectrale du proche infrarouge directement au sein du réacteur (Figure 61). Il est en effet possible d'adapter une sonde au spectromètre ARCOptix (Figure 62) et d'insérer la sonde dans un doigt en quartz pour réaliser une mesure en réflexion au sein du réacteur.

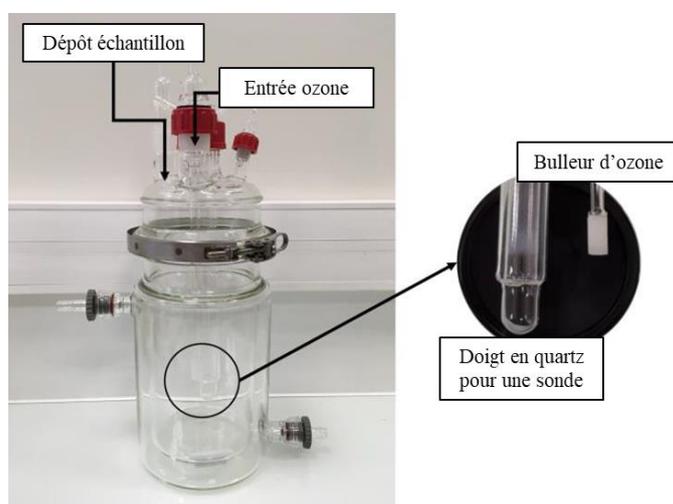


Figure 61. Réacteur semi-continu permettant une analyse spectroscopique à l'intérieur du réacteur

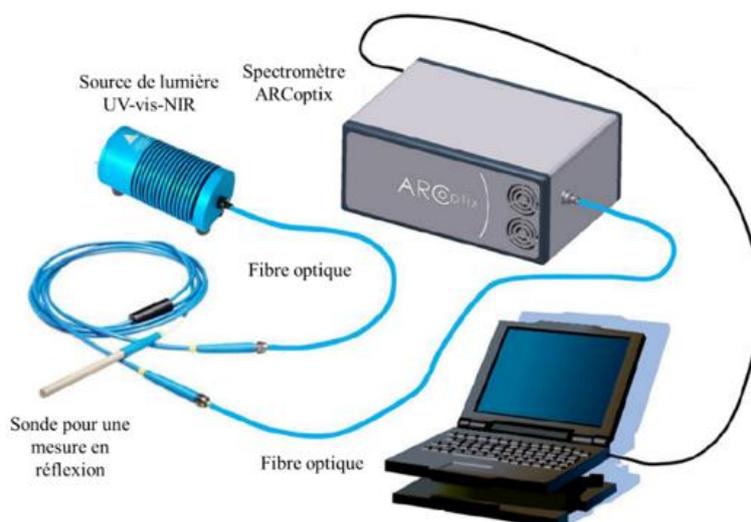


Figure 62. Dispositif de l'ARCOptix pour l'acquisition de spectres en réflexion

Ce dispositif nous a notamment permis de déterminer efficacement la concentration d'ozone dissous dans l'eau et l'analyse d'une réaction d'ozonation sur une matière grasse est donc tout à fait envisageable dans ce type de réacteur. Malgré tout, il faudrait adapter les modèles sur des données spectrales acquises en réflexion et non en transmission comme développés dans ce chapitre. Après l'optimisation des conditions de synthèses et des méthodologies d'analyses, il s'est avéré important de déterminer l'action de l'huile ozonée sur une pathologie d'intérêt dans le secteur agricole : les mammites.

**CHAPITRE V – EVALUATION DE L’ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE DES HUILES OZONEES POUR LUTTER
CONTRE LES MAMMITES**

La mammite est une inflammation clinique ou subclinique (inapparente) de la mamelle et est généralement causée par une infection bactérienne. Elle peut entraîner l'apparition de caillots et de flocons lors la production de lait, ainsi que des gonflements ou des rougeurs. Elle est signalée chez de nombreuses espèces animales, mais surtout chez les animaux laitiers domestiques. Chez les vaches laitières, les troupeaux sont touchés partout dans le monde avec des taux de prévalence allant de 15 à 40% (Zhao et al. 2015). Chez les petits ruminants (brebis et chèvres), la mammite a été décrite comme ayant une prévalence de 10 à 60% selon les régions, avec une prévalence plus élevée des formes subcliniques (vs cliniques) dans les deux espèces (Bergonier et al. 2003). La mammite est associée à une réduction de la production et de la qualité du lait ainsi qu'à une augmentation des coûts de contrôle (traitements, réforme...), ce qui entraîne des pertes économiques importantes pour les éleveurs laitiers (Seegers et al. 2003). Ainsi, la mammite continue d'être l'un des facteurs limitant le plus impactant sur la production laitière dans le monde entier.

D'un point de vue thérapeutique, la mammite clinique entraîne généralement un ou plusieurs traitements antibiotiques immédiats. La (les) voie(s), la durée et le choix des molécules dépendent de l'espèce atteinte, de la gravité clinique et de l'étiologie. Les mammites subcliniques sont souvent traitées plus tard dans la lactation et/ou au moment du tarissement. Les médicaments vétérinaires sont utilisés soit par voie intra-mammaire ou parentérale pour les antibiotiques soit par voie topique pour les désinfectants des trayons (Trevisi et al. 2014). Dans tous les cas, la prévention est essentielle. Historiquement, celle-ci comprenait de façon systématique un traitement intra-mammaire avec un antibiotique à longue durée d'action au tarissement. Cette mesure permettait de combiner une action préventive, couvrant tout ou une partie de la période sèche, et une action curative vis-à-vis des infections présentes en fin de lactation. Aujourd'hui, dans le cadre de l'évolution des pratiques vers une utilisation mieux raisonnée des antibiotiques, l'objectif est de traiter seulement les mamelles infectées.

Malgré ces efforts longs et coûteux pour prévenir et/ou guérir les mammites tels que l'amélioration de l'hygiène, des installations de traite, l'amélioration des conduites d'élevage (logement des vaches, nutrition, etc.) ou encore l'usage d'antibiotiques et de biocide, on enregistre généralement des difficultés à totalement limiter l'apparition des mammites. D'autre part, l'émergence de souches bactériennes multirésistantes, en partie due à la surutilisation des antibiotiques, est un problème majeur de santé publique dans le monde.

Même s'il n'existe aucune preuve de l'émergence d'une résistance généralisée parmi les agents pathogènes de la mammité, une utilisation rationnelle des médicaments antibactériens est essentielle pour des raisons thérapeutiques, économiques et épidémiologiques. Dans ce contexte, l'utilisation des antibiotiques devient de plus en plus controversée, et leur usage préventif en voie d'interdiction dans plusieurs pays (Oliver et al. 2011).

Dans ce contexte, les huiles végétales ozonées peuvent présenter une alternative. Plusieurs études ont démontré une activité antibactérienne *in vitro* contre diverses souches de collection et des isolats cliniques humains, notamment *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Sechi et al. 2001, Díaz et al. 2006a, Diaz et al. 2006b, Rodrigues et al. 2004, Skalska et al. 2009). L'effet *in vitro* des huiles de tournesol ozonées sur trois agents pathogènes responsables de la mammité a aussi été évaluée : *Staphylococcus aureus* (CIP 76.25), *Escherichia coli* (CIP 76.24) et *Streptococcus uberis* (CIP 105450) (Moureu et al. 2015b). Cette étude a permis de déterminer les conditions d'ozonation optimales pour obtenir la meilleure activité antibactérienne contre les souches étudiées. Ensuite, l'efficacité des huiles ozonées sur une gamme de souches isolées de la mammité plus étendue a été déterminée. En effet, Moureu et al. (2015a) ont déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile ozonée vis-à-vis de plusieurs dizaines de ces souches en utilisant la méthode de microdilution et les résultats ont démontré l'intérêt de l'huile de tournesol ozonée. En complément de cette étude, nous avons donc décidé d'élargir la gamme de souches et d'évaluer la résistance de l'ensemble des souches face à plus d'une dizaine d'antibiotiques. Ainsi nous avons comparé l'efficacité de l'huile de tournesol ozonée et des différents antibiotiques puis nous avons déterminé le potentiel biocide de notre produit biosourcé vis-à-vis des infections mammaires.

V.1 Création d'une base de données représentative de l'étiologie des mammites

V.1.1 Détermination des souches qui vont constituer la base de données

La liste des isolats a d'abord été définie en identifiant les agents étiologiques de la mammité de brebis les plus fréquents dans la littérature. À cette fin, nous avons utilisé deux études complémentaires couvrant la période de 1993 à 2015 (Contreras et al. 2007, Gelasakis et al. 2015). Cette recherche documentaire a été complétée par la prise en compte des incidences d'isolements obtenues en France grâce aux cliniques ambulatoires et aux données de diagnostic

bactériologique (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) recueillies de 1992 à 2015 dans les troupeaux de brebis laitières (Bergonier et al. 2003, Bergonier et al. 2005, Bergonier et al. 2014). Ainsi, les fréquences des genres et des espèces dans la présente collection ont été définies de façon à être au plus près de la représentativité des agents étiologiques isolés sur le terrain. Dans un second temps, des souches de la même origine (mammites) présentant un profil de résistance ou multirésistance à différents antibiotiques (*Pseudomonas*, *Serratia*) ont été ajoutées afin de tester l'effet de l'huile ozonée sur ces isolats (Aloush et al. 2005, Moradigaravand et al. 2016). Enfin, l'intérêt de notre panel réside dans le fait que la majorité des souches ne sont pas spécifiques des mammites, mais peuvent au contraire être isolées à partir de nombreuses autres affections ou maladies des ruminants (métrites, arthrites, dermatites, ...), permettant d'envisager des perspectives thérapeutiques pour d'autres types d'infections.

Le prélèvement et l'identification des souches ont été réalisés selon les procédures décrites dans le paragraphe II.7.1. L'ensemble des souches à notre disposition est présenté en Annexe 4 (souches à coloration de Gram-négatives) et Annexe 5 (souches à coloration Gram-positives). Ces souches peuvent être réparties selon leur réservoir naturel ou leur pouvoir pathogène.

V.1.2 Le critères de classification des souches

V.1.2.1 Les principaux réservoirs

Conformément à la littérature, les isolats ont été classés en fonction de leur(s) principal(aux) réservoir(s) : l'animal ou l'environnement. Cette classification est à la base de la différence entre la mammite contagieuse (ou mammite de traite) et la mammite d'environnement (Gelasakis et al. 2015). Les isolats d'origine "animal" correspondent à des réservoirs animaux de plusieurs types : la peau en grande partie, en particulier des trayons (*Micrococcaceae*, etc.), mais aussi les voies respiratoires supérieures (*Pasteurellaceae* pour les agneaux de lait, les brebis, etc.) ou la bouche (*Streptococcus oralis*, *sanguinis*, etc.). Ils présentent une persistance très faible à modérée dans l'environnement (Contreras et al. 2007, Omaleki et al. 2011, Gelasakis et al. 2015).

Les isolats d'origine "environnementale" correspondent aux espèces bactériennes fréquemment isolées du sol, de la litière, de l'eau, du foin, etc. (par exemple, les coliformes, les

autres entérobactéries, les entérocoques, les *Listeria spp.*, les *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.). Ils présentent une persistance longue (mois) à très longue (années) dans l'environnement extérieur (Smith et al. 1993, Bergonier et al. 2003, Gelasakis et al. 2015). Ces derniers microorganismes peuvent contaminer la peau des trayons mais persistent mal, en particulier lorsqu'ils sont soumis à une pulvérisation ou un trempage biocide des trayons.

V.1.2.2 Le pouvoir pathogène des souches

La classification du pouvoir pathogène bactérien a été basé sur la terminologie conventionnelle pour les mammites (Reyher et al. 2012) : pathogènes majeurs (agents naturellement les plus fréquents), pathogènes mineurs (agents naturellement moins fréquents) et opportunistes (agents de pouvoir pathogène spontané faible mais favorisés ou sélectionnés par certaines pratiques comme l'antibiothérapie intra-mammaire).

V.1.3 Le classification obtenue pour notre base de données

Selon les critères présentés précédemment, une première répartition des souches en fonction de leurs caractéristiques est réalisée (Tableau 40 et Figure 63).

Tableau 40. Répartition du nombre de souches en fonction des caractéristiques dans la base de données étudiée

Caractéristiques	Nombre de souches	
Pathogène	Environnemental	62
	Animal	63
	Majeur	55
	Mineur	45
	Opportuniste	25
Coloration de Gram	Négative	49
	Positive	76
Total	125	

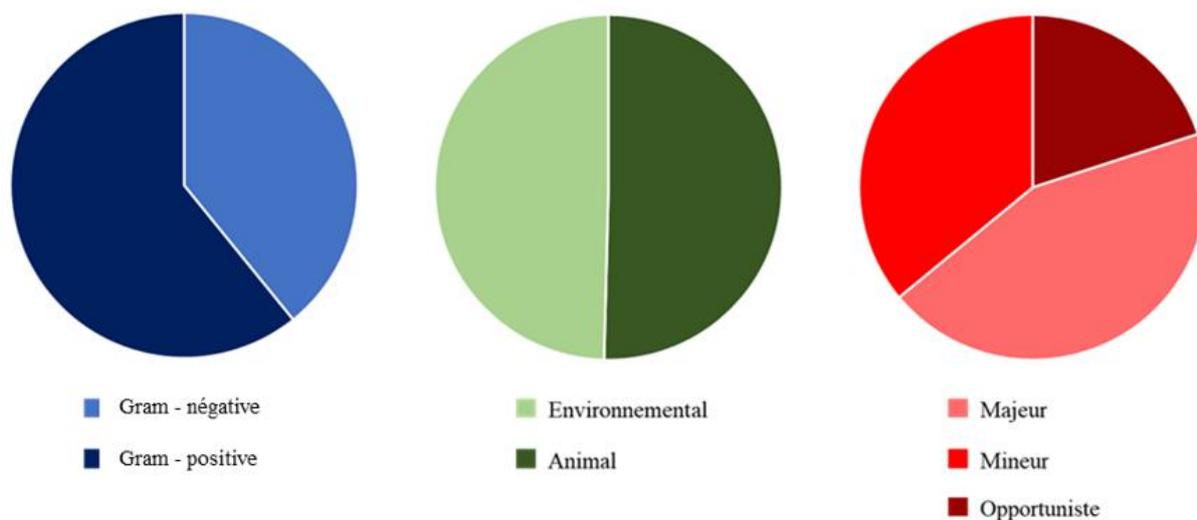


Figure 63. Proportion d'agents pathogènes en fonction de leurs caractéristiques

On observe une plus grande proportion de souches à coloration de Gram-positives. Les souches environnementales et animales sont en proportions similaires et les pathogènes opportunistes sont moins représentés que les pathogènes mineurs et majeurs. Ces proportions correspondent à la représentativité des souches pour la pathologie de la mammite.

V.2 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

V.2.1 Préparation de l'échantillon d'huile ozonée

Comme précisé dans le paragraphe II.2.1, une huile de tournesol à haute teneur en acide oléique (THO), ozonée pendant 4 heures avec de l'eau, a été utilisée pour cette étude en raison de son activité antibactérienne contre trois souches déjà étudiées (Moureu et al. 2015b). Plus précisément, une émulsion composée de 50 g d'huile de tournesol à haute teneur en acide oléique (89%) et de 5 g d'eau ultra-pure (MilliQ® Integral 15 Systems, Millipore, USA) a été placée dans un réacteur. L'ozone a été généré par un dispositif OZAT-CFS1 (Ozonix, Suisse) alimenté en oxygène pur. L'ozone (30 L/h, $[O_3] \approx 65$ mg/L) a réagi à travers cette émulsion pendant 4 h. Pendant tout le processus d'ozonation, de l'eau à 27 °C a recirculé à l'intérieur de la double paroi du réacteur pour limiter l'exothermicité de la réaction. La manipulation a été réalisée trois fois pour obtenir une quantité suffisante de produit, les trois produits ozonés ont été associés pour obtenir un mélange homogène et un indice moyen du mélange combiné a été déterminé (II et IP) (dosage volumétrique, Tableau 41).

Tableau 41. Indices chimiques déterminés pour l'huile de tournesol THO avant et après ozonation, DS : déviation standard

	II moyen + DS (g I ₂ / 100 g)	IP moyen + DS (meq d'oxygene actif / kg)
THO non ozonée	89,7 ± 0,32	4,1 ± 0,29
THO ozonée 4h	16,8 ± 0,39	2172,8 ± 54,2

Les valeurs obtenues pour les paramètres utilisés pour caractériser l'huile de tournesol ozonée sont cohérentes avec les données obtenues dans les études précédentes, ce qui démontre une fois de plus que la procédure d'ozonation est très reproductible. Après avoir constaté les caractéristiques chimiques de notre huile, nous avons appliqué la méthode de microdilution pour déterminer les CMI.

V.2.2 Répétabilité et répartition des CMIs

La détermination des CMIs a été réalisée en dupliquât, c'est-à-dire que 250 CMIs ont été déterminées (soit deux fois 125 souches). Afin de vérifier la répétabilité des mesures, pour une même souche, la méthode de microdilution met en parallèle deux colonnes de puits (cf. II.7.2). Les résultats pour cette étude microbiologique avec des concentrations discontinues sont satisfaisantes car une parfaite répétabilité est obtenue sur 227 manipulations (soit 91%) et 23 manipulations présentaient une différence d'un seul facteur de dilution. Cette différence d'une dilution peut s'expliquer par une variation dans les volumes prélevés, qui sont de l'ordre du µL, et déposés dans les puits.

Ensuite, la méthode de microdilution nous a permis de tester l'activité antibactérienne de nos produits sur une gamme de concentrations comprise entre 0,625 et 40 mg/mL. Sur cette gamme, nous avons observé une activité antibactérienne de l'huile de tournesol ozonée contre l'ensemble des souches. En revanche, aucun effet n'a pu être déterminé pour l'huile de tournesol non ozonée. Cette observation confirme bien que l'activité antibactérienne provient des produits formés lors de l'ozonation des huiles végétales. La répartition des souches en fonction des CMIs obtenues est présentée sur la Figure 64.

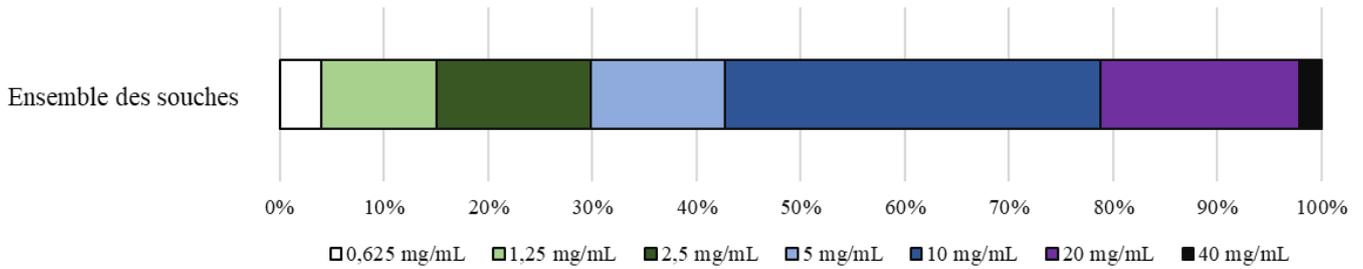


Figure 64. Répartition et proportion (%) des CMI en fonction des souches pour l'ensemble des bactéries

On observe ainsi qu'environ 80% des souches sont inhibées par une concentration inférieure ou égale à 10 mg/mL et plus de 40% avec une concentration de 5 mg/mL ou moins. Une étude plus approfondie pour observer l'influence des caractéristiques biologiques et environnementales a ensuite été menée.

V.2.3 Influence des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques

V.2.3.1 Influence des caractéristiques intrinsèques des bactéries : coloration de Gram

En étudiant séparément la répartition des valeurs sur les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, on observe que plus de la moitié des bactéries Gram-positives sont inhibées avec des concentrations d'huiles ozonées inférieures ou égales à 5 mg/mL tandis que ce résultat diminue à 20% à peine pour les bactéries Gram-négatives (Figure 65). Les bactéries Gram-positives sont significativement plus sensibles que les bactéries Gram-négatives (valeur $p < 0,0001$).

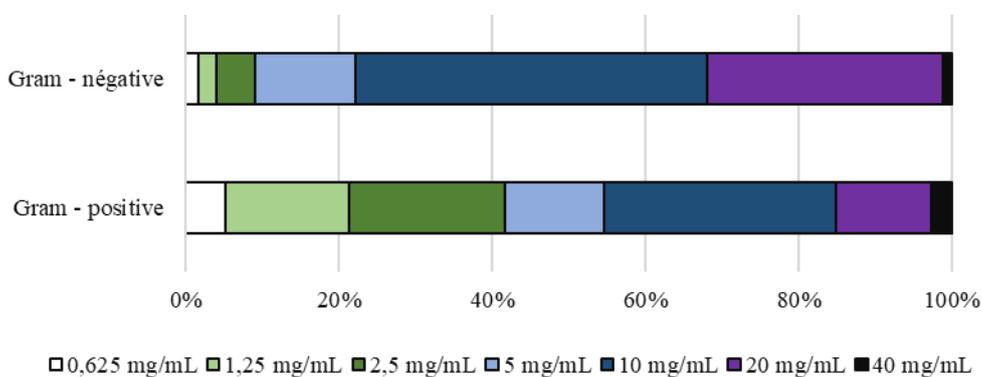


Figure 65. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour l'ensemble des bactéries Gram-positives et Gram-négatives

La différence significative de sensibilité observée entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives peut être expliquée par la structure des parois bactériennes de ces deux groupes et le potentiel mécanisme d'action des huiles ozonées. D'une part, la paroi des bactéries à coloration de Gram-positives est composée d'une unique membrane plasmique qui est accompagnée d'une couche relativement épaisse de peptidoglycane. La membrane plasmique se compose principalement de lipides, particulièrement des phospholipides. À l'inverse, pour les bactéries à Gram-négative, le peptidoglycane est plus fin et enchâssé entre deux membranes plasmiques (Figure 66). L'action de l'ozone sur les protéines a déjà été étudié (Cataldo et Gentilini 2005, Cataldo 2007). Il a été démontré récemment l'efficacité de la réaction de l'ozone sur les phospholipides, envisagée pour cibler certains virus comme le Coronavirus (Cataldo et Ori 2020). La membrane plasmique présente donc une certaine sensibilité à l'oxydation par l'ozone. En supposant que l'ozone et les huiles ozonées ont un comportement similaire en causant un stress oxydatif, la présence de deux membranes plasmiques dans la paroi des bactéries à Gram-négatives pourrait expliquer une meilleure résistance et donc la nécessité d'appliquer une concentration plus élevée en huile ozonée.

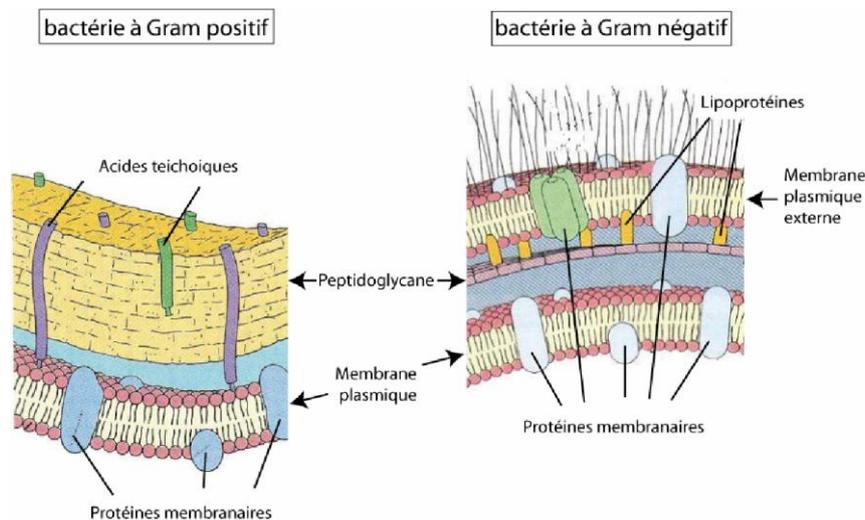


Figure 66. Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif (Masson 2008).

On s'est ensuite intéressé à la répartition des résultats en fonction du genre des pathogènes au sein de la catégorie des souches à coloration Gram-positives. On constate que les espèces les plus sensibles sont les staphylocoques autres que *S. aureus*. Les autres *Micrococcaceae* (*Kocuria*, *Micrococcus*, *Rothia*) et les *Enterococcus* apparaissent comme les bactéries les plus difficiles à inhiber (Figure 67).

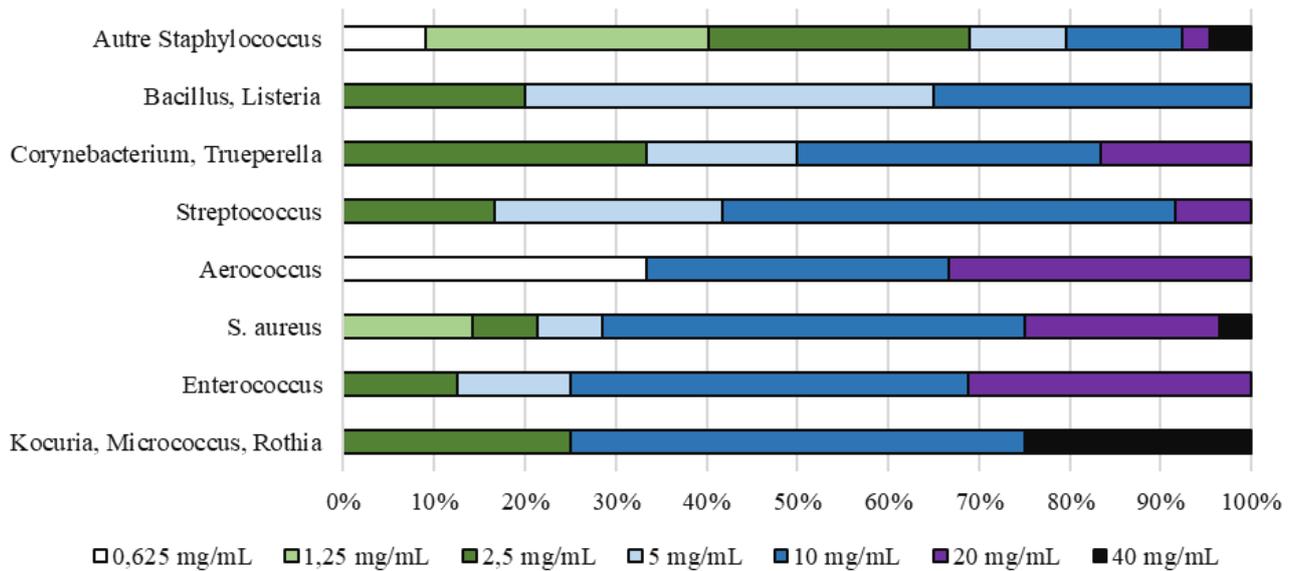


Figure 67. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour les bactéries Gram-positives

En faisant de même pour les bactéries à coloration de Gram-négatives, on constate une différence de sensibilité entre les autres coliformes (*Enterobacter* et *Klebsiella*) et le restant du pool à coloration de Gram-négatives (Figure 68).

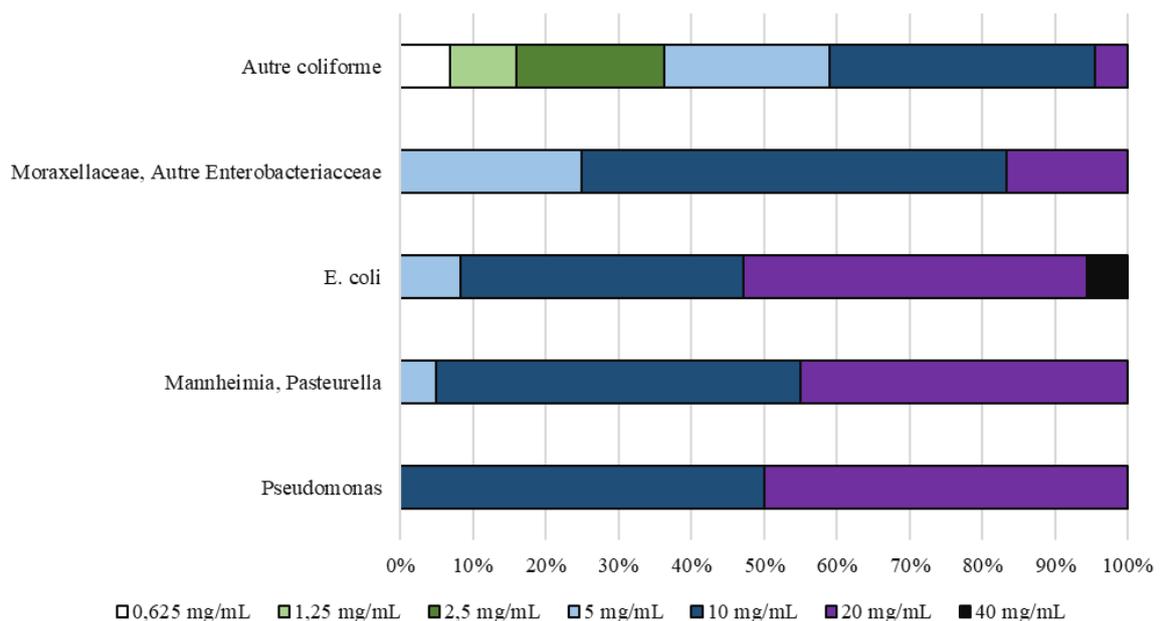


Figure 68. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour les bactéries Gram-négatives

V.2.3.2 Influence du réservoir d’origine des bactéries

Comme décrit précédemment, les souches peuvent être ensuite classées selon différents paramètres tels que leur réservoir principal. Tout d’abord, on peut distinguer les bactéries d’origine animale (63 souches) de celles d’origine environnementale (62 souches). La Figure 69 montre les proportions des CMI’s déterminées en fonction du réservoir d’origine. On remarque que plus de 70% des germes d’origine environnementale nécessitent une concentration d’au moins 10 mg/mL pour être inhibés tandis que plus de la moitié des souches d’origine animale le sont avec une concentration maximale de 5 mg/mL. Les souches animales sont donc plus statistiquement sensibles que les souches environnementales (valeur $p = 0,037 < 0,05$).

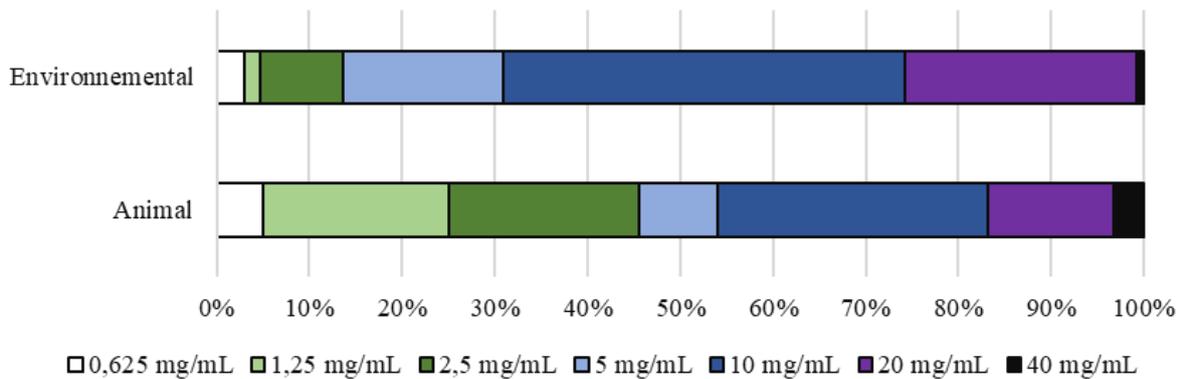


Figure 69. Répartition et proportion (%) des CMI's obtenues pour l'ensemble des souches animales et environnementales

V.2.3.3 Influence du type de pathogénicité

Dans un second temps, il est possible de comparer les bactéries en fonction de leur pouvoir pathogène : mineur (45 souches), majeur (55 souches) ou opportuniste (25 souches). On peut observer sur la Figure 70 les proportions des CMI's déterminées en fonction du type de pathogène. Un test de Kruskal-Wallis appliquant la correction de Bonferroni a été utilisé pour comparer les catégories de souches. Une valeur de p inférieure à $0,05/n$ (avec $n = 3$, valeur $p = 0,0167$) a été considérée comme statistiquement significative pour ce test.

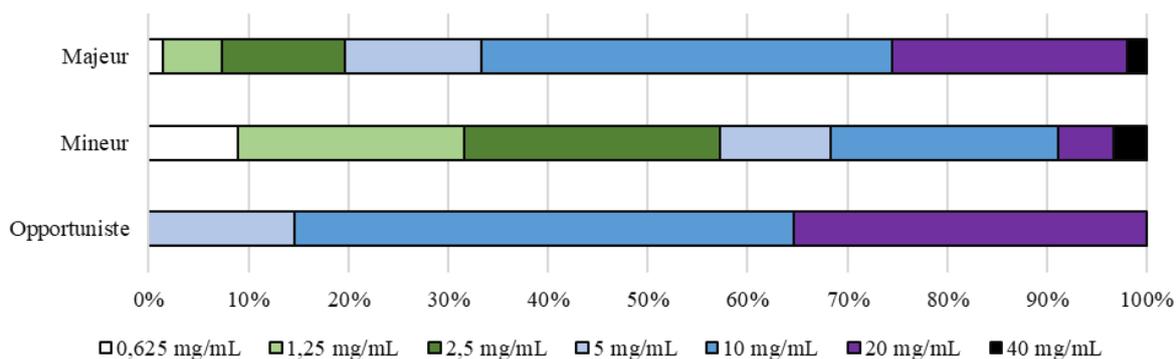


Figure 70. Répartition et proportion des CMI obtenues pour l'ensemble des souches majeures, mineures et opportunistes

Les CMI obtenues pour les agents pathogènes mineurs se sont révélées plus faibles que celles obtenues pour les agents majeurs et la différence a été déterminée comme significative (valeur $p < 0,0001$). Le résultat est similaire lors de la comparaison entre les pathogènes mineurs et opportunistes (valeur $p < 0,0001$). Même si les valeurs de CMI semblent plus faibles pour les pathogènes majeurs en comparaison des pathogènes opportunistes, aucune différence significative n'est apparue (valeur $p = 0,131 > 0,0167$).

V.2.3.4 Bilan sur l'efficacité de l'huile ozonée

Le Tableau 42 permet de faire un récapitulatif de l'efficacité de l'huile de tournesol ozonée sur les souches en fonction des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques. On observe ainsi une efficacité de l'huile ozonée sur l'ensemble des souches étudiées mais il existe bien une différence entre les catégories de souches. Une autre donnée d'intérêt pour notre étude pour analyser l'efficacité de l'huile ozonée est la détermination de la CMI₅₀ et CMI₉₀. Pour cela, il faut constituer des regroupements bactériens assez important.

Tableau 42. Efficacité de l'huile ozonée en fonction des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques des souches

Caractéristiques		Efficacité de l'huile ozonée
Pathogène	Environnemental	+
	Animal	++
	Majeur	+
	Mineur	++
	Opportuniste	+
Coloration de Gram	Négative	+
	Positive	++

V.2.4 Détermination de la CMI₅₀ et la CMI₉₀

Nous avons réalisé des regroupements de souches en fonction de leur famille ou leur genre pour pouvoir déterminer et comparer les concentration inhibitrices CMI₅₀ et CMI₉₀, deux indicateurs classiques dans l'étude de l'inhibition bactérienne.

Tout d'abord, il est possible de déterminer ces deux données sur les regroupements de bactéries en fonction de leurs caractéristiques (Figure 71).

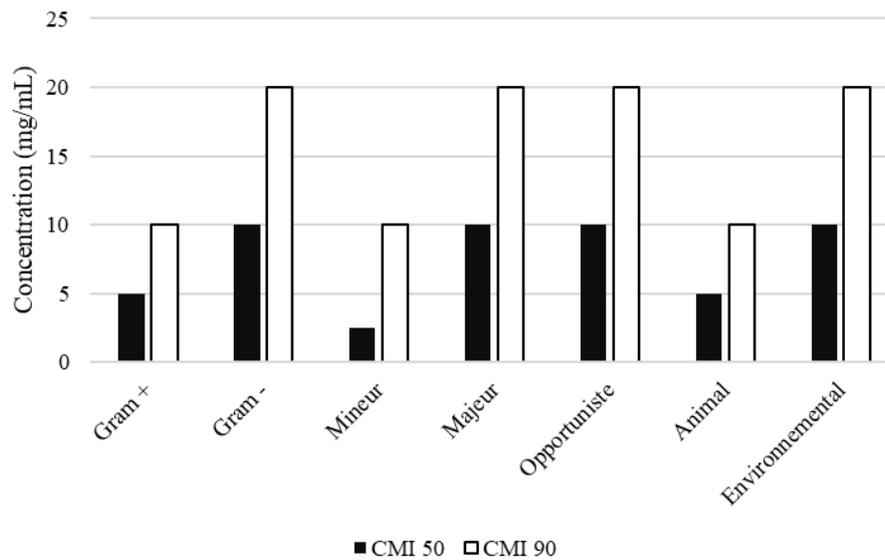


Figure 71. CMI₅₀ et CMI₉₀ obtenues en fonction des propriétés des pathogènes

Une concentration de 5 mg/mL est requise pour permettre l'inhibition de 50% des bactéries Gram-positives testées. Cette concentration devra s'élever à 10 mg/mL pour permettre d'inhiber 90% de ces souches. En comparaison, l'inhibition de 50% des souches Gram-négatives nécessite une concentration de 10 mg/mL et une concentration de 20 mg/mL sera nécessaire pour atteindre une inhibition de 90% de ces mêmes souches. On remarque ici encore que les souches Gram-positives sont les plus sensibles, de même que les pathogènes mineurs et d'origine animale.

A partir de la coloration de Gram, des groupes sont constitués sur la base de sensibilités similaires. Les 76 souches de type Gram-positif peuvent être réparties en 5 groupes ainsi que 5 groupes pour les bactéries Gram-négatives (Tableau 43). Les valeurs minimales et maximales

des CMI obtenues ainsi que les CMI₅₀ et CMI₉₀ pour les bactéries Gram-positives et Gram-négatives sont présentées respectivement sur les Figures 72 et 73.

Tableau 43. Rassemblement de souches possédant des sensibilités similaires à l'huile de tournesol ozonée

Gram	Ordre / famille / groupe	Genre	Nombre de souche
Gram-positif	<i>Lactobacillales</i>	<i>Aerococcus, Enterococcus</i>	11
		<i>Streptococcus</i>	6
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
	Autre <i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	37
		<i>Micrococcus</i>	
		<i>Rothia</i>	
Actinomycetales, Autre bactérie Gram-positif	<i>Corynebacterium, Trueperella, Bacillus, Listeria</i>		8
	Coliformes	<i>Escherichia</i>	11
Gram-négatif	Autre Coliforme	<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	11
	<i>Moraxellaceae, Autre Enterobacteriaceae</i>	<i>Acinetobacter, Pantoea, Providencia, Raoultella, Serratia</i>	10
	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Mannheimia, Pasteurella</i>	7
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	10

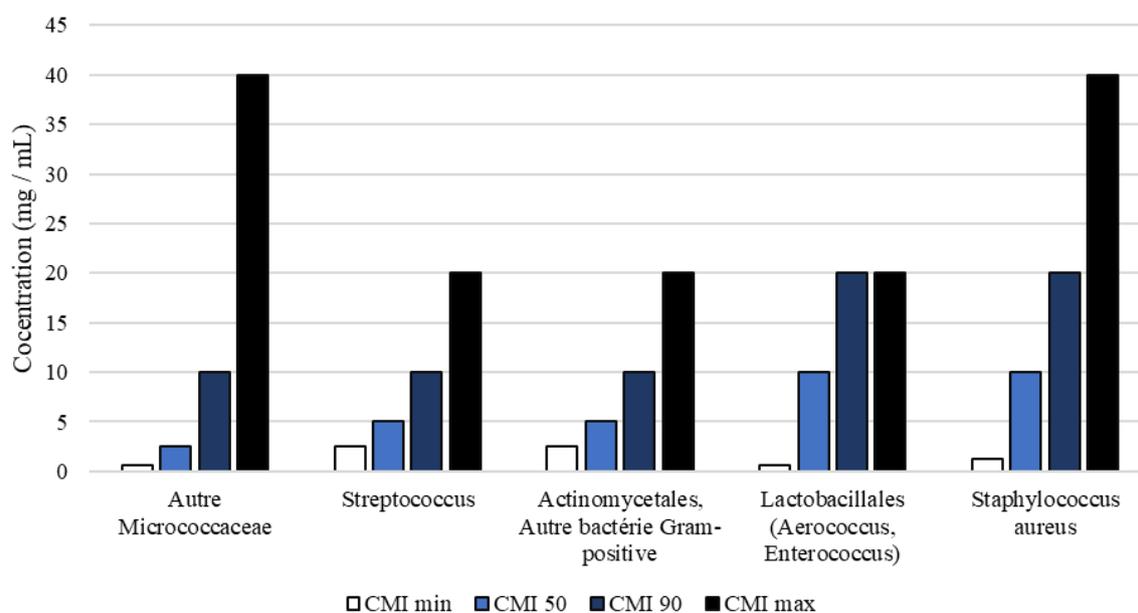


Figure 72. Représentation des différentes concentrations nécessaires en fonction du groupe de bactéries Gram-positives

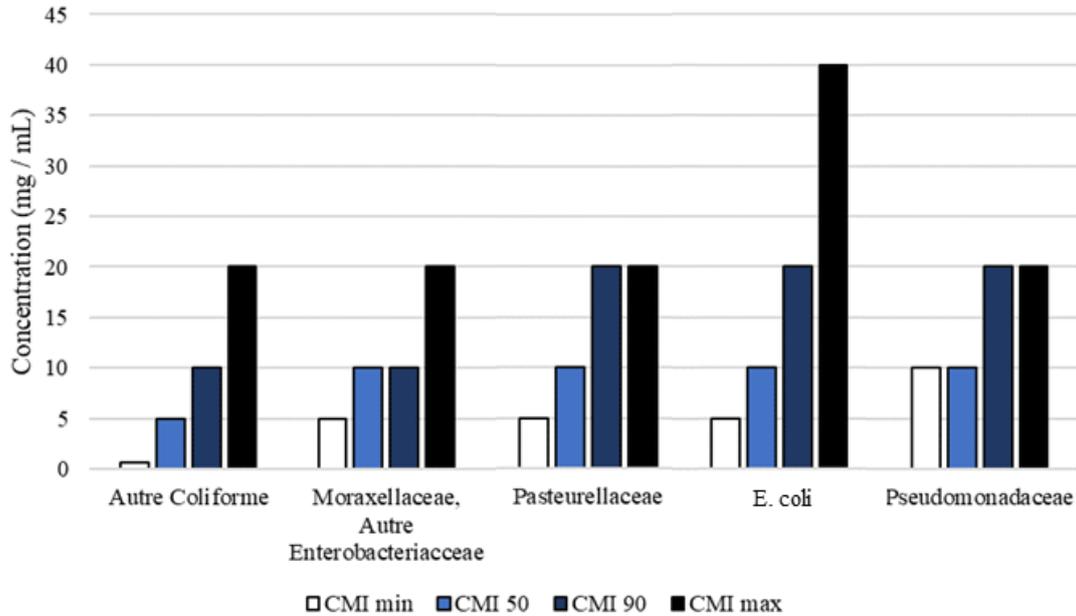


Figure 73. Représentation des différentes concentrations nécessaires en fonction du groupe de bactéries Gram-négatives

Ces résultats viennent appuyer les déterminations faites précédemment avec les répartitions des souches. Il est par exemple possible d'affirmer que pour les souches de la famille des *Streptococcus*, la CMI minimale obtenue a été de 2,5 mg/mL, la CMI maximale a été de 20 mg/mL, et que pour inhiber 50% de ces souches (respectivement 90%), une concentration en huile ozonée de 5 mg/mL (respectivement 10 mg/mL) a été nécessaire. Dans les espèces Gram-positives, les staphylocoques autres que *S. aureus* sont les souches bactériennes les plus sensibles, tandis que cette dernière espèce apparaît comme la souche la moins sensible à l'huile ozonée car ce groupement possède la CMI₅₀ et la CMI₉₀ les plus élevées. Du côté des souches Gram-négatives, les entérobactéries et les autres coliformes apparaissent comme les souches les plus sensibles à l'huile ozoné alors que les *Pseudomonas* avec la CMI min la plus élevée et certaines souches *E.coli* avec la CMI max la plus élevée apparaissent comme les plus difficiles à inhiber.

Ces résultats sont particulièrement encourageant compte tenu de l'efficacité des huiles ozonées sur les bactéries de certaines familles de bactéries largement impliquées dans la pathologie étudiée. Tout d'abord, la famille des *Micrococcaceae* représente la famille des pathogènes les plus fréquemment isolés chez la chèvre et le mouton (Contreras et al. 2007). Chez la brebis, la bactérie *S. aureus* est impliquée dans près de la moitié des mammites

subcliniques tandis que les autres souches de la famille des *Micrococcaceae* sont impliquées dans 41 à 91% de ces cas de mammites (Bergonnier et Berthelot 2003). Ensuite, dans le cas des mammites cliniques chez les ovins, la famille des *Streptococcus* et les coliformes sont les souches les plus fréquentes (Thomas et al. 2015). En considérant ces trois familles (*Micrococcaceae*, *Streptococcus* et Coliformes), l'huile ozonée a prouvé son efficacité avec une CMI₉₀ de 10 mg/mL. Seules les souches *S. aureus* dans la famille de *Micrococcaceae* et *E. coli* dans la famille des coliformes présentent une sensibilité plus faible à l'huile ozonée mais aucune résistance n'est observée.

Les huiles ozonées ont donc une action antibactérienne avérée face à l'ensemble des souches testées dans cette étude, avec un panel représentatif de l'étiologie des mammites. Ce produit se présente donc comme une véritable alternative potentielle aux biocides ou aux anti-infectieux. Dans une seconde phase, les profils d'antibiorésistances des souches en notre possession seront réalisés afin de pouvoir comparer l'action des huiles ozonées par rapport aux antibiotiques étudiés.

V.3 Détermination de l'antibiorésistance et analogie avec l'activité antibactérienne de l'huile ozonée

V.3.1 Détermination des profils d'antibiorésistances des souches

L'effet de 15 antibiotiques choisis pour être couramment utilisés chez les petits ruminants a été testé sur nos 125 souches. Les antibiogrammes ont été réalisés par un laboratoire extérieur (LABOCEA, Ille-et-Vilaine, France). Des disques d'antibiotiques ont été déposés sur une gélose ensemencée avec une souche bactérienne. La concentration en antibiotique est donc localisée sur une petite surface et en s'éloignant de cette surface (disque), la concentration en antibiotique diminue. On place ensuite la gélose en conditions de culture. Il apparaît alors autour du disque une inhibition de la croissance bactérienne plus au moins prononcée. La distance entre le disque et la première observation de croissance bactérienne est appelée le diamètre d'inhibition. Plus ce diamètre est grand et plus la concentration nécessaire en antibiotique pour inhiber la souche est faible et donc plus la souche est sensible à l'antibiotique. Inversement, plus le diamètre est petit, plus la concentration en antibiotique nécessaire pour limiter la croissance est élevée et donc plus la souche présente une résistance à l'antibiotique. Le " Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie" publie chaque année un tableau actualisé des valeurs critiques des diamètres d'inhibition pour chaque espèce à partir desquelles

une souche est déclarée résistante (R), intermédiaire (I) ou sensible (S). Il est important de souligner que la résistance à un antibiotique peut être une propriété naturelle caractérisant certaines souches ou bien la résistance peut être acquise par pression de sélection après utilisation des antibiotiques. Nous avons décidé de regrouper ces deux possibilités pour faciliter le traitement des données. L'ensemble des produits testés ainsi que les sensibilités spécifiques connues sont présentées dans le Tableau 44.

Tableau 44. Liste des antibiotiques testés et caractéristiques spécifiques connues, S : sensible à l'antibiotique, R : résistante à l'antibiotique

Antibiotique	Famille d'antibiotique	Spectre d'action	Profils de sensibilités spécifiques connus													
			<i>Corynebacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	Autres <i>Staphylococcus</i>	<i>Listeria</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Providencia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Mannheimia</i>	<i>Pasteurella</i>
Amoxicilline	Pénicilline	Large	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R
Céfazoline	Céphalosporines	Large		R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	R		R
Céfoxitine	Céphalosporines	Large		R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R		R
Cloxacilline	Pénicillines	Gram - positives			S	S	S									
Enrofloxacin	Fluoroquinolones	Large				S	S			S	S				S	S
Florfenicol	Phénicolés	Large													S	S
Marbofloxacin	Fluoroquinolones	Large			S	S	S		S	S	S			S	S	S
Néomycine	Aminoglycosides	Large	S			R	S	S	S	S	S	S	S	S		
Pénicilline G	Pénicillines	Gram - positives	S		S	S										S
Rifaximine	Ansamycines	Gram - positives			S	S										
Tétracycline	Tétracycline	Large			S											
Tiamuline	Pleuromutiline	Gram - positives														
Tilmicosine	Macrolides	Gram - positives	S			S	S								S	S
Tulathromycine	Azalides	Gram - positives														
Tylosine	Macrolides	Gram - positives	S			S	S								S	S

Ce sont des antibiotiques issus des familles des pénicillines, céphalosporines, aminoglycosides, ansamycines, tétracyclines, ou encore fluoroquinolones. D'une part, des antibiotiques à large spectre ont été étudiés, c'est-à-dire susceptibles de limiter la croissance de bactéries Gram positives ou négatives. C'est le cas de l'enrofloxacin, la marbofloxacin, le florfenicol, l'amoxicilline, la néomycine, les céphalosporines (3^{ème} et 4^{ème} générations) ou la tétracycline. D'autre part, il a été testé des antibiotiques ayant une action plus spécifique en ciblant par exemple des bactéries Gram-positives ou même un seul genre de bactéries. La cloxacilline par exemple agit principalement sur des staphylocoques et des streptocoques. Les antibiotiques testés sont indiqués dans le traitement des infections cutanées, respiratoires, mammaires... Les plus utilisés pour le traitement des mammites sont les macrolides, certaines céphalosporines, les pénicillines, la rifaximine, la tétracycline et les aminoglycosides (Rattez 2017, données issues du « Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2020 »).

V.3.2 Analyse des profils d'antibiorésistances des souches

Nous avons observé des souches ne présentant aucune résistance, (9 souches soit 7,2%) une résistance (face à un antibiotique) (33 souches soit 26,4%) ou encore des souches multi-résistantes, allant jusqu'à présenter une résistance face à 12 antibiotiques testés (83 souches soit 66,4%). Aucun cas de résistance face à l'ensemble des antibiotiques n'a été observé (Figure 74).

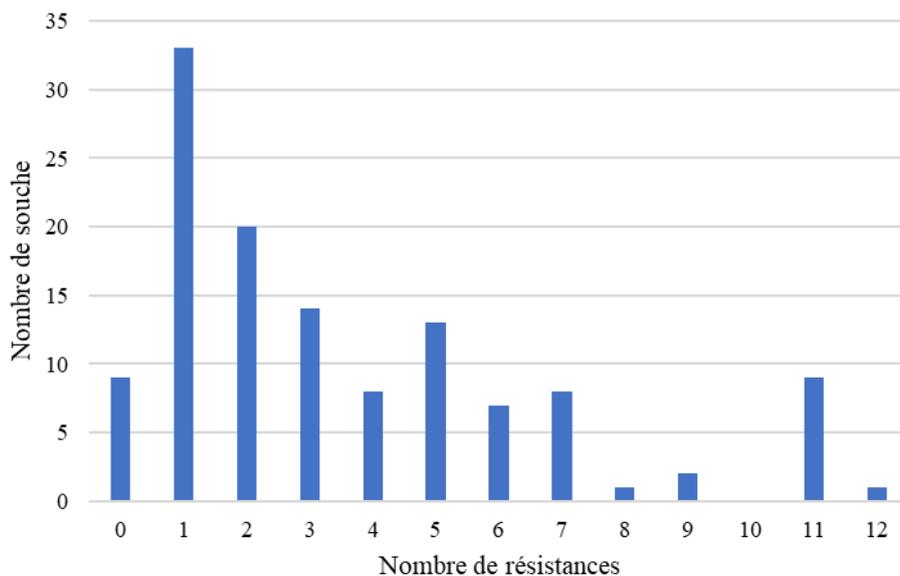


Figure 74. Nombre de souche en fonction du nombre de résistances

Pour donner suite à ces résultats, les souches ont été classées en 4 catégories en fonctions du nombre de cas de résistances aux antibiotiques avérés (Tableau 45). Ce classement nous a permis de séparer les souches totalement sensibles aux antibiotiques, les souches très sensibles (un seul ou deux cas de résistances), les souches montrant des difficultés à être inhibées (de 3 à 9 cas de résistances) et enfin les souches les plus résistantes (10 à 12 cas de résistances observés).

Tableau 45. Classement des souches en fonction du nombre de cas de résistances.

Nombre de résistances aux antibiotiques	Nombre de souches	Nombre de souches / ensemble des souches (%)
0	9	7,2
[1,2]	53	42,4
[3,9]	53	42,4
[10,12]	10	8,0

A l'aide de ces catégories, l'influence des propriétés biologiques et environnementales des bactéries a été observée sur le nombre de cas de résistances (Figure 75).

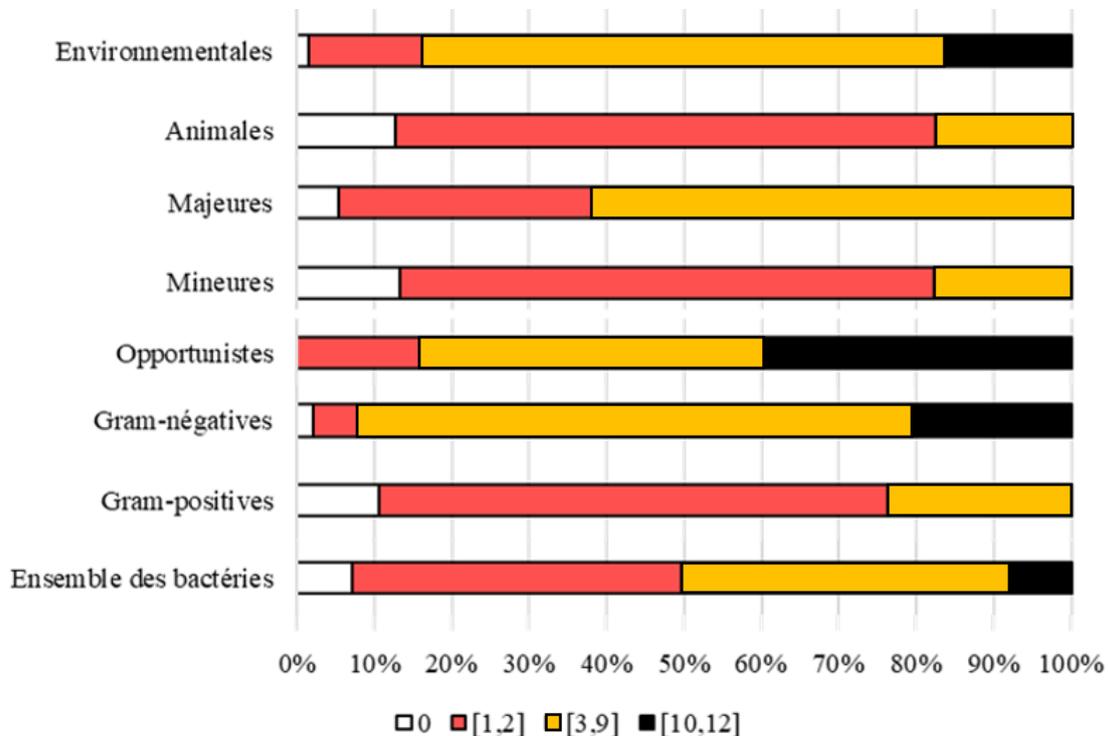


Figure 75. Influence des propriétés bactériennes sur les proportions de résistances aux antibiotiques

On peut alors affirmer par exemple que dans le cas des bactéries à coloration de Gram-positives, environ 10% des souches ne présentent pas de résistances, environ 65% comptent entre 1 et 2 cas de résistances et environ 25% totalisent entre 3 et 9 cas de résistances. On distingue que les bactérie Gram-négatives, environnementales et opportunistes présentent une plus grande proportion de souches susceptibles de résister à un certain nombre d'antibiotique. Ces observations sont en accord avec les conclusions tirées à l'aide des CMI. En effet, il apparaissait plus compliqué d'inhiber la croissance des souches précédemment citées, notamment il était nécessaire d'utiliser des concentrations d'huile ozonée plus élevées en comparaison avec les autres types de souches. Enfin, on peut affiner le tri des souches et observer la dispersion des cas des résistances au sein des bactéries Gram-positives et Gram-négative en fonction du genre et des espèces des bactéries (Figure 76 et 77).

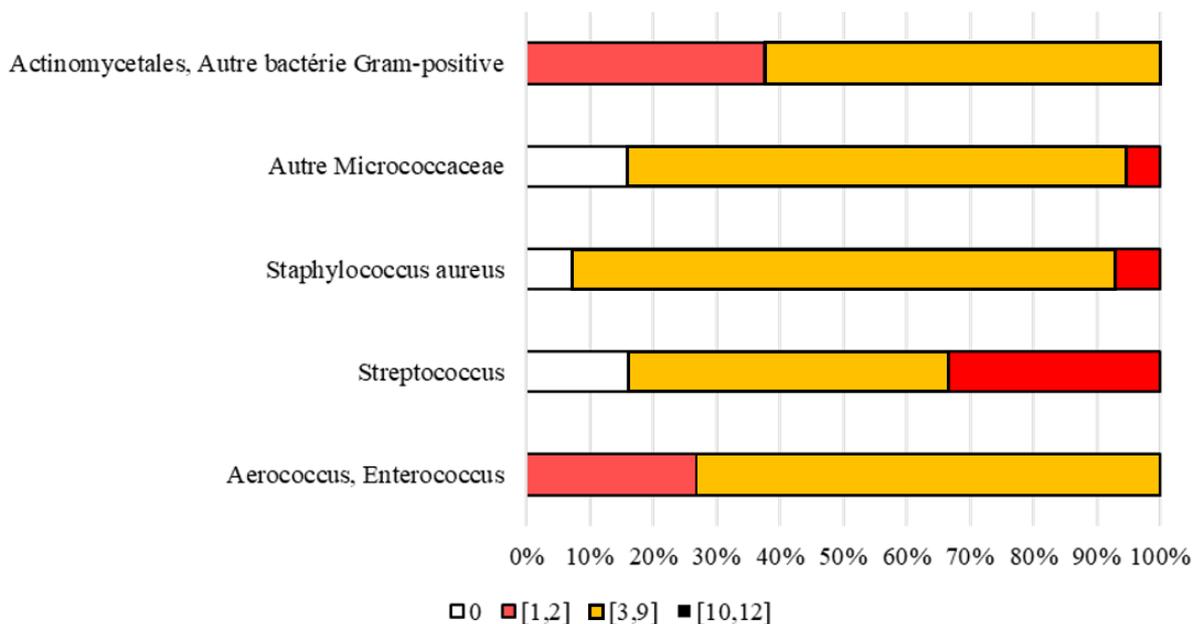


Figure 76. Dispersion des cas de résistances en fonction du genre des bactéries de type Gram-positives

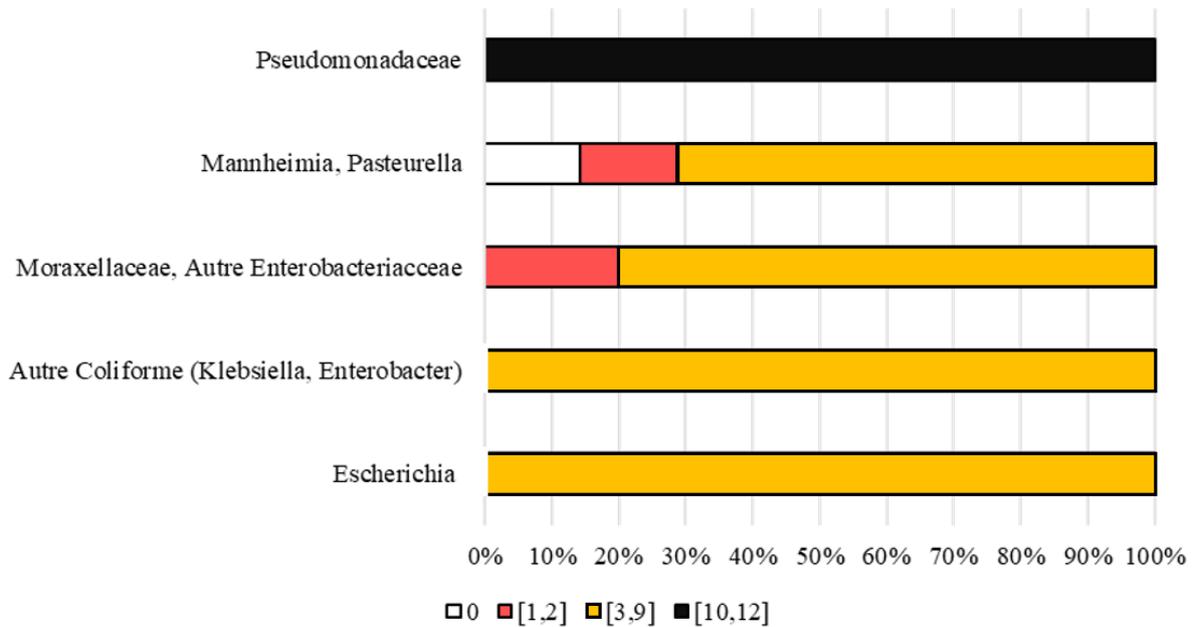


Figure 77. Dispersion des cas de résistances en fonction du genre des bactéries de type Gram-négatives

On peut observer parmi les bactéries Gram-positives que les *S. aureus* apparaissent peu résistantes aux antibiotiques. D'un autre côté, les souches du genre *Aerococcus* et *Enterococcus* ne présentent pas de souche non résistante. En ce qui concerne les souches Gram-négatives, on peut remarquer sur les souches les plus résistantes de notre panel sont les *Pseudomonas*. On observe que la plupart des souches Gram-négatives sont multi-résistantes.

Grâce à ces données, nous avons pu comparer l'effet de l'huile ozonée et l'effet des antibiotiques sur les souches présentant une sensibilité aux différents produits étudiés. Pour les souches qui présentent une résistance à certains antibiotiques, nous avons ainsi pu observer si l'huile de tournesol ozonée pouvait s'avérer efficace et se présenter alors comme une véritable alternative. L'ensemble des résultats, c'est-à-dire la nature et le nombre de germes en fonction de la sensibilité aux différents antibiotiques est présenté en Annexe 6. Les principaux résultats sont présentés dans les sections suivantes.

V.3.3 Comparaison des effets des antibiotiques et de l'huile ozonée

Dans cette partie de l'étude, nous avons tout d'abord observé la relation entre les concentrations microbiologiques obtenues (CMI) et la sensibilité des différentes souches aux différents antibiotiques. Nous avons décidé ensuite de mettre de côté le cas des souches en

situation « intermédiaires », en effet il est plus intéressant de pouvoir comparer l’effet de l’huile ozonée sur des cas d’antibiorésistance bien définis. Nous nous sommes donc tout d’abord focalisés exclusivement sur le cas des souches sensibles aux antibiotiques. Nous avons ainsi pu observer si l’huile ozonée peut se présenter comme un substitut aux produits testés sur l’ensemble de ces souches. Pour finir, nous nous sommes axés sur le cas des souches résistantes aux antibiotiques. Si dans ce cas de figure, l’huile ozonée présente une efficacité, alors l’intérêt thérapeutique de notre produit biosourcé n’en serait que plus important.

V.3.3.1 Relation entre les CMI et la sensibilité aux antibiotiques

Dans un premier temps, nous avons observé l’évolution des CMI en fonction du nombre de résistances des souches (Figure 78).

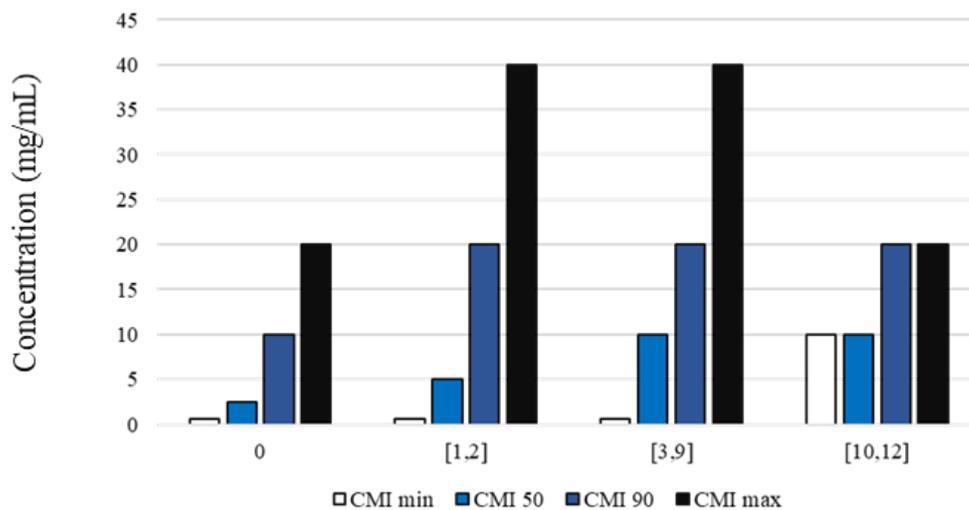


Figure 78. Evolution des CMI min, CMI 50, CMI 90 et CMI max en fonction du nombre de résistances aux antibiotiques

On peut alors affirmer que, dans le cas des souches multi-résistantes présentant entre 3 et 9 cas de résistances aux différents antibiotiques, la CMI minimale obtenue (respectivement maximale) était de 1,25 mg/mL en huile ozonée (respectivement 40 mg/mL) et que pour ce groupe de bactéries, la CMI₅₀ (respectivement CMI₉₀) était de 10 mg/mL (respectivement 20 mg/mL). Les souches les plus sensibles aux antibiotiques sont également les plus sensibles à l’application d’huile ozonée. En effet, les CMI nécessaires pour inhiber 50% et 90% des souches ne présentant aucun cas de résistances (et donc les souches les plus sensibles) sont plus faibles que pour le reste des souches. Les bactéries mono et multi-résistantes possédant entre 2 et 9 cas de résistances aux antibiotiques demandent la même CMI min que le groupe précédent

mais des CMI₅₀ et des CMI₉₀ plus importantes, de même que la CMI max observée est plus élevée. Enfin, dans le cas des souches très résistantes aux antibiotiques (10 à 12 cas de résistances), la CMI min observée est la plus élevée, la CMI₅₀ et la CMI₉₀ sont aussi importante que le groupe précédent. En revanche, la CMI max observée est plus faible que le groupe précédent, les valeurs de concentrations sont donc moins dispersées. Ainsi une certaine analogie est retrouvée entre la sensibilité aux antibiotiques et la sensibilité à l’huile ozonée.

Pour donner suite à cette approche globale, il a été comparé les CMI d’huile ozonée nécessaires selon l’antibiotiques étudié. Pour ce faire, il a tout d’abord été déterminé le nombre de souches résistantes, de souches sensibles et intermédiaires par antibiotique. Pour chacun de ces cas, nous avons associé les proportions de souches inhibées par concentration d’huile ozonée appliquée et l’ensemble des résultats est présenté en Annexe 7.

Pour une présentation simplifiée des résultats, nous avons étudié principalement les proportions de souches résistantes et sensibles à chacun des antibiotiques (Tableau 46). Pour chacun des produits testés, nous avons observé au moins 57 souches sensibles, les antibiotiques présentent donc tous la possibilité d’inhiber une partie des souches de notre panel.

Tableau 46. Proportion de souches sensibles et résistantes aux différents antibiotiques

Antibiotique	Nombre de souches sensibles	Nombre de souches résistantes
Enrofloxacin	122	1
Marbofloxacin	122	2
Florfenicol	115	10
Néomycine	115	6
Céfoxitine	101	23
Céfazoline	94	24
Tulathromycine	88	21
Rifaximine	84	6
Tétracycline	79	44
Tilmicosine	73	44
Tiamuline	72	52
Tylosine	72	51
Amoxicilline	68	43
Cloxacilline	64	61
Pénicilline G	57	64

On peut déterminer la présence d'antibiotiques qui vont avoir une action contre l'ensemble de nos souches. En effet, nous obtenons par exemple 122 souches sont sensibles aux effets de l'enrofloxacin et la marbofloxacin (soit 97,6% des souches). Ce seront des points de comparaisons intéressant dans la suite de notre étude pour déterminer si l'huile ozonée peut présenter une réelle alternative et nous avons donc commencé par étudier le cas des souches sensibles aux antibiotiques.

V.3.3.2 Cas des souches sensibles aux antibiotiques

Pour chaque antibiotique, nous avons déterminé la proportion totale de souches avec une croissance inexistante, par rapport à l'ensemble des souches sensibles à l'antibiotique testé, en fonction de la concentration en huile ozonée appliquée (Tableau 47).

Tableau 47. Proportion de souches bactériennes totalement inhibées en fonction de la concentration appliquée en huile ozonée pour le cas des souches sensibles aux antibiotiques

Antibiotique	Nombre de souches sensibles	Proportion de souches inhibées (%) en fonction de la CMI (mg/mL)						
		0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
Enrofloxacin	122	3,20	14,52	28,84	41,66	78,20	97,86	100,00
Marbofloxacin	122	3,20	14,52	28,84	41,66	78,20	97,86	100,00
Florfenicol	115	4,32	16,37	32,51	46,60	81,37	97,73	100,00
Néomycine	115	3,40	15,45	31,59	45,23	81,59	98,18	100,00
Céfoxitine	101	4,92	18,65	33,93	47,92	82,38	97,41	100,00
Céfazoline	94	4,14	18,78	36,18	49,44	82,87	97,79	100,00
Tulathromycine	88	4,80	18,57	36,53	47,01	79,35	97,01	100,00
Rifaximine	84	4,97	20,19	38,20	49,69	83,54	96,89	100,00
Tétracycline	79	3,57	14,28	33,44	49,35	87,34	99,35	100,00
Tilmicosine	73	4,19	21,32	43,00	55,24	84,26	97,20	100,00
Tiamuline	72	4,31	21,22	39,93	51,08	83,81	97,12	100,00
Tylosine	72	5,59	22,72	43,00	54,89	83,21	97,20	100,00
Amoxicilline	68	6,06	17,80	35,98	50,00	83,71	97,73	100,00
Cloxacilline	64	4,69	23,83	44,92	58,20	85,93	96,87	100,00
Pénicilline G	57	3,54	20,35	37,61	50,00	83,19	98,23	100,00

Par exemple, pour la céfazoline, nous avons déterminé que 94 souches étaient sensibles à ce produit et qu'une concentration de 5 mg/mL permettait de limiter la croissance de 49,44% de ces souches. Il faudra atteindre une CMI de 40 mg/mL d'huile ozonée pour limiter totalement

la croissance de ces 94 souches et donc obtenir un niveau d'action similaire à l'antibiotique utilisé.

Pour l'ensemble des produits testés, l'huile ozonée permet une inhibition de quasiment la moitié des souches sensibles à l'antibiotique en imposant une concentration en huile ozonée de 5 mg/mL. Ce résultat monte à plus de 78% avec une concentration de 10 mg/mL. L'inhibition est complète avec une concentration de 40 mg/mL. Dans le cas où un antibiotique peut à ce jour limiter la croissance d'une bactérie, l'huile ozonée présente une activité bactéricide avérée et peut se présenter comme une alternative.

Dans un second temps, des composés ont présenté plus de difficultés à limiter la croissance de certaines souches. Par exemple, plus de 50 souches (soit 40% de souches) ont révélé une résistance aux effets des antibiotiques suivants (Tableau 46, p. 164) : pénicilline G, cloxacilline, tiamuline et tylosine. Ce sont en comparaison de ces antibiotiques qu'un nouvel enjeu va apparaître. En effet, si l'huile ozonée est capable de limiter la croissance de souches qui résistent à l'effet de certains antibiotiques, alors notre produit biosourcé présentera un potentiel encore plus intéressant dans le domaine de la thérapeutique

V.3.3.3 Cas des souches résistantes aux antibiotiques

Nous avons procédé de manière similaire pour l'étude des souches présentant des cas de résistances aux antibiotiques testés et déterminé la proportion totale de souches dont la croissance est inhibée en fonction de la concentration en huile ozonée appliquée (Tableau 48).

Tableau 48. Proportion de souches totalement inhibées en fonction de la concentration appliquée pour le cas des souches résistantes aux antibiotiques

Antibiotiques	Nombre de souches résistantes	Proportion de souches inhibées (%) en fonction de la CMI (mg/mL)						
		0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
Enrofloxacin	1	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Marbofloxacin	2	50,00	50,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Néomycine	10	16,67	16,67	16,67	25,00	75,00	100,00	100,00
Rifaximine	6	-	-	-	45,46	72,73	100,00	100,00
Florfenicol	23	-	-	-	-	50,00	100,00	100,00
Tulathromycine	24	-	3,66	10,98	25,61	73,17	100,00	100,00
Céfoxitine	21	-	-	13,04	21,74	65,22	100,00	100,00
Céfazoline	6	-	-	8,69	19,56	67,39	100,00	100,00
Amoxicilline	44	1,79	14,89	28,58	39,29	73,22	97,62	100,00
Tétracycline	44	4,82	16,87	24,10	31,93	65,66	95,18	100,00
Tilmicosine	52	1,83	4,27	9,76	23,17	68,90	98,78	100,00
Tylosine	51	1,60	3,73	10,64	25,53	74,47	98,94	100,00
Tiamuline	43	3,53	6,56	16,16	29,80	71,21	98,99	100,00
Cloxacilline	61	3,12	4,91	12,50	25,00	70,54	99,11	100,00
Pénicilline G	64	2,93	9,23	22,68	36,97	75,63	97,48	100,00

On constate par exemple que dans le cas de la tylosine, 51 souches présentent une résistance à ce produit et qu'une concentration de 10 mg/mL permet de limiter la croissance de 74,47% de ces souches. On constate tout d'abord que pour chaque produit, plus de 50% des souches initialement résistantes aux antibiotiques sont inhibées avec une concentration de 10 mg/mL en huile ozonée. Ce résultat monte à plus de 70% pour les quatre antibiotiques qui présentent le plus de souches résistantes parmi notre panel (Pénicilline G, cloxacilline, Tiamuline, Tylosine). Enfin, l'effet de l'huile ozonée est total dès 20 mg/mL pour les souches qui présentent une résistance aux antibiotiques suivants : enrofloxacin, marbofloxacin, néomycine, rifaximine, florfenicol, tulathromycine, céfoxitine et céfazoline. Cette concentration sera de 40 mg/mL pour inhiber totalement les souches qui présentaient des résistances aux 7 autres antibiotiques testés dans cette étude. Ainsi, aucune résistance n'est observée à l'huile ozonée.

Ainsi, même quand certains produits biocides semblent n'avoir aucun effet, il apparait possible de limiter la croissance de ces mêmes pathogènes à l'aide d'une application d'huile ozonée plus ou moins concentrée.

V.4 Conclusion

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé la croissance de 125 souches bactériennes dans un milieu en présence d'huile de tournesol ozonée. Ces bactéries sont issues de prélèvements réalisés sur des ruminants entre 2010 et 2015 et ont été sélectionnées pour représenter la diversité des microorganismes pouvant être impliqués dans l'apparition des mammites.

Dans un premier temps, la méthode de microdilution utilisée pour déterminer les CMI s'est montrée très répétable avec plus de 90% de manipulation parfaitement répétables et une différence de seulement une dilution pour le reste des essais. Grâce à cette méthodologie, l'huile ozonée a montré une efficacité contre l'ensemble des souches étudiées et les valeurs des CMI obtenues sont comprises entre 0,625 mg/mL et 40 mg/mL. On observe notamment que 80% des souches sont inhibées par une concentration inférieure ou égale à 10 mg/mL et plus de 40% avec une concentration de 5 mg/mL ou moins.

Dans un autre temps, nous avons observé une différence significative de sensibilité entre les bactéries à coloration de Gram-positives et Gram-négatives. Ces deux groupes de bactéries possèdent notamment une différence au niveau de la structure de leur paroi et le mode d'action des huiles ozonées pourrait expliquer la sensibilité plus importante des bactéries à coloration de Gram-positives. En supposant que l'action de l'ozone et de l'huile ozonée est similaire, la membrane plasmique composée de protéines et de phospholipides présente donc une forte sensibilité à l'oxydation (Cataldo 2007, Cataldo et Ori 2020). La présence d'une unique membrane plasmique dans la paroi des bactéries à Gram-positives au lieu de deux dans le cas des bactéries à Gram-négatives pourrait donc expliquer la différence de sensibilité. Il apparait aussi un effet du réservoir et du type de pathogène. En effet, les pathogènes du réservoir « animal » et les pathogènes mineurs apparaissent comme les souches les plus sensibles aux effets de l'huile ozonée.

Enfin, nous avons étudié le comportement de notre panel de bactéries face à plusieurs antibiotiques utilisés dans le traitement d'infections cutanées, respiratoires et mammaires. Un grand nombre de bactéries a présenté une sensibilité aux produits testés, ce qui permet de limiter totalement la croissance de ces bactéries. En comparaison, l'huile ozonée a aussi montré une

action contre ces germes avec un concentration efficace de 5 à 10 mg/mL. On peut estimer que notre produit peut se présenter comme une alternative intéressante.

Dans une autre mesure, nous avons observé que certaines bactéries présentaient une certaine résistance et l'utilisation de certains antibiotiques ne permet pas de limiter la croissance de ces germes. Cette résistance peut être naturelle et propre à la souche étudiée ou acquise au fil des années. Dans ces deux situations, l'huile ozonée a montré une action et a permis d'inhiber le développement de bactéries multi-résistantes. Bien que là aussi la gamme de concentration soit assez élevée par rapport aux concentrations des antibiotiques, l'huile ozonée présente un potentiel dans le cas où les souches résistent aux produits biocides.

Dans la poursuite de cette étude, il serait intéressant d'étudier l'influence de la nature de l'huile utilisée pour l'ozonation. De plus, en ciblant la nature des composés actifs, il serait possible de réaliser des mélanges concentrés en cette famille de produits et appliquer des mélanges avec des CMI's plus faibles que celles étudiées dans notre étude. Il serait aussi intéressant d'isoler les souches ayant acquis une résistance des souches naturellement résistantes à certains antibiotiques pour observer si l'huile ozonée peut être considérée dans ce cas comme une alternative.

Les résultats obtenus confirment donc l'intérêt des huiles de tournesol ozonées dans le cadre de la prévention et du traitement des mammites. Notre panel permet aussi d'envisager une diversité de pathologies ciblées pour un traitement avec notre produit, par exemple le traitement des dermites. Cependant, il est aussi nécessaire d'obtenir plus d'informations sur les composés actifs pour pouvoir envisager des études *in vivo* pour comparer l'effet d'une application topique par rapport à une injection intra-mammaire par exemple.

**CHAPITRE VI – CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Les huiles ozonées présentent un grand intérêt notamment pour leurs propriétés antibactériennes reconnues. Les domaines d'applications sont variés et ce produit biosourcé se présente comme une véritable alternative aux composés déjà existants. Les procédés de synthèses en réacteur semi-continus sont maîtrisés mais ne permettent pas de produire plus de quelques centaines de grammes. De plus, pour caractériser une huile ozonée, un grand nombre d'études utilisent l'indice d'iode et l'indice de peroxyde. Ces deux indices sont déterminés par des dosages volumétriques selon les méthodes de référence, longues, consommatrices en produits chimiques nocifs pour l'environnement, difficiles à mettre en œuvre. C'est pourquoi, il est nécessaire d'étudier la faisabilité de nouvelles méthodes de synthèses et d'analyses afin d'obtenir des huiles ozonées en plus grande quantité et de déterminer la composition en routine au cours ou à la fin d'une synthèse. Le produit issu de l'ozonation d'une huile végétale se présente comme une alternative d'intérêt à l'utilisation d'antibiotique pour le traitement de certaines pathologies. C'est notamment le cas d'une pathologie qui impacte fortement le domaine agricole : les mammites.

L'objectif de ces travaux de thèse était d'envisager des optimisations sur la synthèse et sur l'analyse des huiles ozonées afin de corroborer l'intérêt de ce produit ozoné dans la lutte contre les mammites et de manière plus générale contre l'antibiorésistance.

L'état de l'art montre que la production, la caractérisation et l'activité antibactérienne des huiles ozonées ont été largement étudiées. Il apparaît que la composition du milieu réactionnel va avoir un impact sur la nature et la quantité des espèces formées engendrant des modifications plus ou moins marquées sur les propriétés physiques, chimiques et /ou microbiologiques du mélange final. L'étude de l'ajout d'un solvant protique tel que l'eau a notamment permis de déterminer que ce milieu favorisait la formation de peroxydes. Il a été démontré que l'activité antibactérienne du produit final est liée à la présence de cette famille de composés et que plus l'IP est élevé et meilleure est l'activité antibactérienne (Moureu 2015a). De plus, l'ozonation d'huile en présence d'eau induit une augmentation de la viscosité limitant une production en flux continu.

L'étude de l'influence de solvants protiques dans le milieu réactionnel a permis de mieux comprendre les conséquences des ajouts individuels ou combinés des solvants et de sélectionner des conditions optimales pour obtenir une huile ozonée avec une meilleure fluidité et une activité antibactérienne avérée. Pour mener cette étude, certaines conditions de réaction

ont été fixées : la matière première utilisée (huile THO), la durée de réaction (4 heures) et les paramètres propres à l’ozone (débit : 30 L/h, concentration : 65 g/m³). Deux solvants protiques ont été retenus. Tout d’abord, l’eau qui est un solvant « vert » par excellence. Ensuite, l’acide nonanoïque (ou acide pélargonique), qui est un solvant organique acide, d’origine végétale. Cet acide gras à chaîne courte favorise la solubilisation de l’ozone quand il est ajouté en faible quantité et permet d’améliorer la consommation des insaturations présentes sur l’huile végétale. La présence de l’acide entraîne aussi la modification des propriétés physiques du mélange tout au long du procédé de réaction. Bien que l’acide nonanoïque soit aussi un solvant protique, les résultats montrent que l’ajout d’eau s’est révélé beaucoup plus impactant sur la formation d’espèces oxygénées et sur l’activité antibactérienne. La formation des hydroxyhydroperoxydes est donc plus favorisée que celle des alpha-hydroperoxydes ce qui induit que les zwitterions vont réagir en priorité avec les molécules d’eau. Les propriétés microbiologiques observées pour les produits finis apparaissent donc liées à la présence spécifique de ces composés.

Ces résultats ouvrent la porte à de nouveaux essais pour mieux comprendre l’influence des solvants en diversifiant les conditions opératoires afin de favoriser l’obtention d’IP plus élevés.

D’une part, un facteur clé est la durée de la réaction. Un proverbe anglophone le rappelle « Time is money » (Franklin B. 1749). A partir de notre fenêtre d’étude retenue, différentes durées de réactions pourraient être étudiées en réacteur semi continu afin d’optimiser la durée minimale de réaction tout en obtenant un état d’oxydation de l’huile THO correspondant à nos attentes en termes de caractéristiques physico-chimiques.

D’autre part, la littérature montre que la réaction d’ozonation de matières grasses peut être envisagée sur un grand nombre de matières premières. La majorité de nos travaux a été réalisée sur une huile de tournesol avec une teneur élevée en chaîne oléique (89%), mais il est tout à fait possible d’envisager des travaux sur des matrices moins complexes. En effet, la complexité du mélange réactionnel obtenu lors de la réaction de l’ozone sur une huile végétale rend difficile la compréhension des structures des composés obtenus. L’oléate de méthyle se présente dans ce cas comme un modèle d’étude intéressant. Des premières études sur l’ozonation de l’oléate de méthyle en réacteur semi-continu ont permis de déterminer la composition des composés formés et d’étudier séparément leur pouvoir antibactérien (Moureu

2015b). L'ajout d'eau a déjà prouvé son efficacité pour produire une plus grande quantité de peroxydes, il pourrait donc être intéressant d'étudier la combinaison d'eau et d'acide nonanoïque, avec notamment l'obtention de produits avec des structures moins variées et donc une caractérisation fine facilitée.

Ensuite, la possibilité de modifier les propriétés physiques du mélange à l'aide de l'ajout d'acide nonanoïque présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la diminution de la viscosité nous a permis d'envisager une transposition de la réaction d'ozonation d'une huile végétale vers une technologie innovante. L'utilisation d'un réacteur en flux continu (modèle Low-Flow de Corning) a révélé que ce procédé permet de réaliser efficacement la réaction entre l'ozone et les insaturations des huiles végétales. Une diminution efficace de l'indice d'iode est obtenue qui peut être associée à une quantité d'ozone appliquée plus faible qu'en réacteur semi-continu. Il est cependant plus complexe d'obtenir des IP élevés (> 1500 méq O actif / kg) avec cette quantité d'ozone utilisée. Les premiers essais restent prometteurs et les travaux doivent être poursuivis dans l'objectif de favoriser la formation d'espèces oxygénées. Ainsi, les conditions opératoires doivent être optimisées pour élever les valeurs d'IP. Deux propositions peuvent être suggérées et pourraient être combinées. Tout d'abord, ajouter une seconde injection d'ozone dans le procédé pour augmenter la quantité d'ozone appliquée et moduler la température de réaction pour diminuer la viscosité de la phase liquide et favoriser les échanges entre les deux phases. L'utilisation de cette technologie innovante peut aussi présenter un intérêt pour l'ozonation d'autres matières premières. C'est le cas de la réaction d'ozonation de l'oléate de méthyle car elle permet de produire de l'acide azélaïque et de l'acide nonanoïque. Actuellement, cette production se réalise sur des synthèses en batch mais la transposition sur une technologie innovante telle que la synthèse en flux continu est totalement concevable et pourrait présenter un sujet d'étude d'intérêt

L'huile de tournesol ozonée présente une viscosité qui s'étend de produits relativement fluides à l'obtention de produits à l'aspect pâteux. Cette caractéristique du produit final peut être associée à différents types d'applications pour un traitement thérapeutique. A titre d'exemple, une texture plutôt « pâteuse » est plus adaptée pour une application topique tandis qu'une viscosité faible peut être associée, après formulation, à une utilisation en pulvérisation. Les huiles ozonées ont en effet démontré un intérêt pour le traitement de certaines pathologies, notamment dans le domaine agricole. Dans cet optique, nous avons déterminé l'action de l'huile de tournesol ozonée sur 125 souches à l'aide de la méthode de microdilution qui s'est avérée

très répétable. Cet ensemble de germes est représentatif de l'étiologie des mammites et permet d'envisager notre produit comme une alternative pour le traitement de cette pathologie qui entraîne des pertes économiques et animales. Les souches ont montré une sensibilité vis-à-vis de certains antibiotiques utilisés dans le traitement d'infections cutanées, respiratoires et mammaires. Dans le cas où les produits antibactériens testés permettaient de limiter la croissance des souches, l'huile ozonée s'est aussi avérée efficace pour lutter contre cette croissance et une substitution des antibiotiques par notre produit biosourcé peut être envisagée. Dans une autre mesure, lorsque les souches se sont montrées résistantes à l'application de produits biocides, l'huile ozonée a aussi montrée un potentiel d'action, ce qui appuie un peu plus l'intérêt thérapeutique des huiles végétales ozonées. Il serait maintenant intéressant de déterminer l'effet *in vivo* des huiles de tournesol ozonées. Cependant, pour répondre aux réglementations actuelles, il est nécessaire de déterminer avec précision la nature des composés formés. Il est donc primordial de développer de nouvelles méthodes d'analyses pour répondre à ce problème. Enfin, le soucier mis en place n'est pas restrictif aux mammites mais permet d'envisager des traitements sur d'autres pathologies, notamment dans le domaine de la santé animale et de la santé des plantes.

Le développement de nouvelles méthodes analytiques est nécessaire pour mieux appréhender la composition des composés formés lors de l'ozonation d'huile végétale et pour tenter d'expliquer l'activité antibactérienne observée. En effet, à défaut d'avoir isolé certains composés, l'activité spécifique des hydroperoxydes n'a pas été évaluée. Les techniques utilisées se doivent d'être non destructives pour permettre la séparation d'une quantité suffisante de produits afin de mener des études de caractérisation (spectrométrie de masse, RMN...) et pour pouvoir tester l'activité antibactérienne. L'HPLC répond à ces critères d'autant plus que cette technique peut être directement couplée à un spectromètre de masse. Lors des études précédentes, les produits formés lors de l'ozonation de l'oléate de méthyle ont pu être séparés par CCM. L'utilisation d'HPTLC-MS pourrait donc également être envisagée. Cette technique de chromatographie haute performance sur couche mince a notamment permis l'identification des composés antibactériens du propolis par évaluation de l'activité antibactérienne après purification (Kasote et al. 2015). L'utilisation d'un système automatisé de purification sur colonne (Puriflash 5.020, Interchim) nous a aussi permis d'isoler certains composés issus de l'ozonation d'huile de tournesol plus rapidement.

Grâce au développement de nouvelles techniques et à la détermination des structures obtenues lors de l'ozonation d'huile végétale, il sera possible d'isoler les composés d'intérêts, tester et identifier les composés responsables de l'activité antibactérienne. Il sera alors possible de s'adapter plus facilement aux réglementations thérapeutiques et d'envisager des tests *in vivo*.

Enfin, dans un objectif de chimie plus responsable et pour obtenir des caractérisations plus rapides des huiles ozonées obtenues, nous avons développé une méthodologie de prédiction des indices chimiques à l'aide de la spectroscopie infrarouge. L'utilisation de la gamme spectrale du moyen infrarouge nous a permis de réaliser une preuve de concept pour estimer l'indice d'iode et l'indice de peroxyde sur des mélanges issus de plusieurs matières premières et qui ont été soumis à une diversité de conditions opératoires. Cette technique présente de nombreux avantages en comparaison des analyses réalisées selon les méthodes de référence. Elle permet d'obtenir un criblage des indices en quelques minutes tout en ne consommant que quelques millilitres du mélange réactionnel. Une étude de faisabilité d'une application en routine de la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) s'est avérée plus difficile à mettre en place que prévue du fait notamment de la diversité des matières premières analysées et de la complexité du mélange réactionnel. Pour renforcer les modèles développés, il semble nécessaire de limiter la diversité des échantillons ou de réaliser plusieurs modèles en fonction des gammes d'indices désirées pour obtenir des modèles plus robustes. Cependant, les applications technologiques pour l'utilisation de la spectroscopie proche infrarouge sont très intéressantes. On peut par exemple envisager associer une synthèse en flux continu et une analyse spectroscopique en ligne. Le réacteur semi-continu a aussi été adapté avec un orifice pour insérer une sonde spectroscopique dans la gamme du proche infrarouge. Ces technologies innovantes permettraient donc d'obtenir des informations en temps réel sur le mélange réactionnel et de réaliser un meilleur contrôle sur la réaction (limiter le temps de réaction si la valeur d'IP est élevée). Il est donc nécessaire de poursuivre les travaux dans cette gamme spectroscopique. Il peut s'avérer intéressant d'élargir l'idée d'associer une synthèse et une caractérisation en ligne à d'autres méthodes d'analyses. L'utilisation d'une RMN de paillasse par exemple peut facilement donner accès à la consommation des insaturations pendant la réaction avec les signaux ^1H à 2 et 5,35 ppm, ou à la formation d'hydroperoxydes avec les signaux à 2,4 et 5,5 ppm.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique d'un triglycéride	16
Figure 2. Structure des quatre principaux acides gras rencontrés dans des huiles végétales ...	17
Figure 3. Les formes mésomères de l'ozone	19
Figure 4. Schéma de principe pour les différents générateurs d'ozone,	19
Figure 5. Mécanisme réactionnel de l'ozone sur une espèce insaturée (Criegee, 1975)	22
Figure 6. Evolution de l'indice de d'iode en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)	25
Figure 7. Evolution de l'indice de peroxyde en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)	27
Figure 8. Evolution de l'acidité en fonction du temps d'ozonation et de la composition du mélange (Moureu et al. 2015b)	28
Figure 9. Structure de la molécule de formaldéhyde.....	29
Figure 10. Structure d'un peroxyde polymérique	30
Figure 11. Les différentes zones du spectre lumineux	32
Figure 12. Schéma du poste pour l'ozonation des matières grasses	42
Figure 13. Réacteur semi-continu pour l'ozonation des huiles végétales et des matières grasses	43
Figure 14. Dispositif expérimental utilisé pour l'ozonation en flux continu des corps gras	44
Figure 15. Vue d'une plaque de réacteurs du système Low-Flow de Corning.....	45
Figure 16. Plan de Doehlert pour l'étude de deux facteurs	46
Figure 17. Dispositif de dosage (Ti-Touch 916)	50
Figure 18. Réactions de dosages pour la détermination de l'II.....	51
Figure 19. Réactions de dosages pour la détermination de l'IP.....	52
Figure 20. Chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'une solution de standards (composés identifiés dans le tableau 9).....	54
Figure 21. Carte ST-IR.....	55
Figure 22. Exemples de spectre d'absorbance dans la gamme spectrale MIR pour une huile THO ozonée 4h avec différentes compositions.....	55
Figure 23. Dispositif de l'ARCOptix pour l'acquisition de spectres en réflexion.....	56
Figure 24. Dispositif pour insérer une cuvette dans le trajet optique pour le spectromètre ARCOptix	57
Figure 25. Exemples de spectre d'absorbance dans la gamme spectrale NIR pour une huile THO ozonée 4 heures avec différentes compositions	57
Figure 26. Schéma de remplissage des microplaques servant à la détermination des CMI ...	61
Figure 27. Exemple de détermination visuelle d'une CMI sur microplaque	62
Figure 28. Schéma de principe d'un antibiogramme	63
Figure 29. Formation de l'acide nonanoïque en milieu protique ($R=C_8$)	69
Figure 30. Formation des α -acyloxyalkyl hydroperoxydes en présence d'acide nonanoïque .	69
Figure 31. Formation d'hydroxy-hydroperoxydes en présence d'eau	70
Figure 32. Indices chimiques déterminés pour l'huile THO non ozonée et différents mélanges soumis aux mêmes conditions d'ozonation, 110 min, $Q(\text{ozone}) = 30 \text{ L/h}$, $[\text{ozone}] = 65 \text{ g/m}^3$, (1) : 21 g THO, (2) 21 g THO et 2,1 g d'AN, (3) : 21 g THO et 2,1 g d'eau, (4) : 21 g	71
Figure 33. Evolution de l'II et l'IP en fonction de la quantité d'eau	73
Figure 34. Représentation des expériences issues du plan de Doehlert par rapport à l'ensemble du domaine expérimental	76

Figure 35. II prédit en fonction de l'II mesuré.....	79
Figure 36. IP prédit en fonction de l'IP mesuré.....	80
Figure 37. Représentation des modalités expérimentales des essais du plan de Doelhart (1 à 7) et des essais complémentaires (A à J, en bleu)	84
Figure 38. II prédit en fonction de l'II mesuré.....	87
Figure 39. IP prédit en fonction de l'IP mesuré.....	89
Figure 40. II simplifié en fonction de la quantité d'acide nonanoïque	91
Figure 41. Représentation de l'évolution de la réactivité entre l'ozone et les insaturations en fonction de la quantité d'acide nonanoïque	91
Figure 42. IP simplifié en fonction de la quantité d'eau.....	93
Figure 43. Evolution de la concentration en ozone en sortie de réacteur en fonction de la durée de réaction et de la quantité d'acide nonanoïque, pour une quantité d'eau fixée : a) 5 g, b) 10 g	94
Figure 44. Produit obtenu caractérisé comme "pâteux"	95
Figure 45. Viscosité du mélange en fonction de la composition, avant réaction ► après réaction, F : fluide, V : visqueux, P : pâteux	96
Figure 46. CMI ₅₀ - CMI ₉₀ en fonction de la composition du mélange sur E.coli (gauche) et S.uberis (droite), AE : aucun effet.....	98
Figure 47. Indice d'iode en fonction de la composition du mélange, en pointillé : surface de compositions optimales	100
Figure 48. Indice de peroxyde en fonction de la composition du mélange, en pointillé : surface de compositions optimales	101
Figure 49. Surfaces de compositions optimales pour l'ensemble des critères désirés.....	101
Figure 50. Représentation d'une plaque de réacteurs et zoom sur deux réacteurs pour visualiser la succession des flux turbulents (A) et laminaires (B)	103
Figure 51. Structure chimique de l'oléate de méthyle (gauche) et linoléate de méthyle (droite)	115
Figure 52. Structure chimique de la trioléine	116
Figure 53. Gammes des indices d'iode mesurés pour les ensembles en fonction des analyses spectrales associées	120
Figure 54. Evolution de l'II moyen en fonction de la durée de réaction et de la composition du mélange et des différentes matières premières, a) huile THO, b) huile de tournesol classique, c) oléate de méthyle, d) linoléate de méthyle.....	121
Figure 55. Gammes des indices de peroxyde mesurés pour les ensembles en fonction des analyses spectrales associées.....	122
Figure 56. Evolution de l'IP moyen en fonction de la durée de réaction et de la composition du mélange et des différentes matières premières, a) huile THO, b) huile de tournesol classique, c) oléate de méthyle, d) linoléate de méthyle	123
Figure 57. Exemples de spectres d'absorption MIR pour différentes compositions et différentes conditions de réaction.....	126
Figure 58. Addition cyclique de l'ozone sur une insaturation	126
Figure 59. Exemple de spectres d'absorptions NIR pour différentes compositions et différentes conditions d'ozonation.....	127
Figure 60. Représentation des valeurs prédites face aux valeurs mesurées pour les deux indices chimiques	133
Figure 61. Réacteur semi-continu permettant une analyse spectroscopique à l'intérieur du réacteur	138

Figure 62. Dispositif de l'ARCOptix pour l'acquisition de spectres en réflexion.....	138
Figure 63. Proportion d'agents pathogènes en fonction de leurs caractéristiques	147
Figure 64. Répartition et proportion (%) des CMI en fonction des souches pour l'ensemble des bactéries	149
Figure 65. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour l'ensemble des bactéries Gram-positives et Gram-négatives.....	149
Figure 66. Structure de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif (Masson 2008).	150
Figure 67. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour les bactéries Gram-positives	151
Figure 68. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour les bactéries Gram-négatives.....	151
Figure 69. Répartition et proportion (%) des CMI obtenues pour l'ensemble des souches animales et environnementales.....	152
Figure 70. Répartition et proportion des CMI obtenues pour l'ensemble des souches majeures, mineures et opportunistes	153
Figure 71. CMI ₅₀ et CMI ₉₀ obtenues en fonction des propriétés des pathogènes	154
Figure 72. Représentation des différentes concentrations nécessaires en fonction du groupe de bactéries Gram-positives	155
Figure 73. Représentation des différentes concentrations nécessaires en fonction du groupe de bactéries Gram-négatives	156
Figure 74. Nombre de souche en fonction du nombre de résistances	159
Figure 75. Influence des propriétés bactériennes sur les proportions de résistances aux antibiotiques	160
Figure 76. Dispersion des cas de résistances en fonction du genre des bactéries de type Gram-positives.....	161
Figure 77. Dispersion des cas de résistances en fonction du genre des bactéries de type Gram-négatives.....	162
Figure 78. Evolution des CMI min, CMI ₅₀ , CMI ₉₀ et CMI max en fonction du nombre de résistances aux antibiotiques	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples de produits commerciaux issus d'huile ozonée (Ugazio, 2020).....	8
Tableau 2. Exemples de pathologies ciblées par les huiles ozonées	8
Tableau 3. Valeurs des CMI des différentes souches étudiées par Sechi et.al (2001).....	10
Tableau 4. Exemples de conditions opératoires d'ozonation d'huile végétale dans la littérature (TA : température ambiante)	24
Tableau 5. Différents signaux RMN liés aux différents groupes fonctionnels présents dans les huiles ozonées	31
Tableau 6. Exemples de caractérisations et d'analyses sur des corps gras ozonés.....	34
Tableau 7. Liste des réactifs utilisés lors des expériences	41
Tableau 8. Plan de Doehlert pour deux facteurs	47
Tableau 9. Temps de rétention de différents composés	54
Tableau 10. Domaines expérimentaux des facteurs étudiés.....	75
Tableau 11. Expériences selon le plan de Doehlert à 2 facteurs	75

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 12. Détermination des indices chimiques moyens des essais du plan d'expériences, DS : déviation standard	77
Tableau 13. Coefficients des équations du second degré pour les deux indices chimiques.....	78
Tableau 14. Différences observées entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites pour l'indice d'iode.....	79
Tableau 15. Différences observées entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites pour l'indice de peroxyde.....	80
Tableau 16. Analyse de la variance des modèles quadratiques de surface de réponse obtenus avec le plan d'expériences de Doelhart.....	82
Tableau 17. Modalités expérimentales pour le plan de surface de réponse personnalisé	83
Tableau 18. Détermination des indices chimiques moyens des essais du plan d'expériences personnalisé, DS : déviation standard	85
Tableau 19. Coefficients des équations du second degré pour les deux indices chimiques.....	86
Tableau 20. Différences obtenues entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées pour l'indice d'iode.....	87
Tableau 21. Différences entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées pour l'indice de peroxyde	88
Tableau 22. Analyse de la variance des modèles quadratiques de surface de réponse obtenus avec le plan d'expériences personnalisé.....	89
Tableau 23. Propriétés physiques des mélanges avant et après ozonation.....	96
Tableau 24. Activité antibactérienne des s mélanges et composés sur E. coli et S. uberis.....	98
Tableau 25. Conditions opératoires appliquées aux essais en microréacteur.....	104
Tableau 26. Indices d'iode des différents essais, quantité et pourcentage d'insaturations consommées	105
Tableau 27. Indices de peroxyde des différents essais	106
Tableau 28. Comparaison entre un essai standard en semi-continu et l'essai 2 en flux continu	107
Tableau 29. Revue de gamme de teneurs en II et IP utilisées dans les modèles de prédiction par spectroscopie infrarouge sur des composés gras.....	114
Tableau 30. Composition en acide gras des huiles de tournesol, DS : déviation standard ...	116
Tableau 31. Indices chimiques moyens des matières premières	117
Tableau 32. Nombre d'échantillons soumis aux différentes analyses spectrales	119
Tableau 33. Erreur moyenne sur les déterminations de l'II et l'IP en fonction de la composition du mélange.....	124
Tableau 34. Constitution des ensembles de calibration et des ensembles de prédiction.....	129
Tableau 35. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du moyen infrarouge	131
Tableau 36. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du moyen infrarouge	132
Tableau 37. Comparaison entre la méthode de détermination chimique et la prédiction par analyse spectrale des indices chimiques.....	133
Tableau 38. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'II à l'aide de la gamme spectrale du proche infrarouge	135
Tableau 39. Evaluation des modèles établis pour la prédiction de l'IP à l'aide de la gamme spectrale du proche infrarouge	135
Tableau 40. Répartition du nombre de souches en fonction des caractéristiques dans la base de données étudiée	146

Tableau 41. Indices chimiques déterminés pour l'huile de tournesol THO avant et après ozonation, DS : déviation standard	148
Tableau 42. Efficacité de l'huile ozonée en fonction des caractéristiques épidémiologiques et pathogéniques des souches.....	153
Tableau 43. Rassemblement de souches possédant des sensibilités similaires à l'huile de tournesol ozonée.....	155
Tableau 44. Liste des antibiotiques testés et caractéristiques spécifiques connues, S : sensible à l'antibiotique, R : résistante à l'antibiotique	158
Tableau 45. Classement des souches en fonction du nombre de cas de résistances.	160
Tableau 46. Proportion de souches sensibles et résistantes aux différents antibiotiques.....	164
Tableau 47. Proportion de souches bactériennes totalement inhibées en fonction de la concentration appliquée en huile ozonée pour le cas des souches sensibles aux antibiotiques	165
Tableau 48. Proportion de souches totalement inhibées en fonction de la concentration appliquée pour le cas des souches résistantes aux antibiotiques	167

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Echantillons de différentes compositions ozonés dans différentes conditions, pour une caractérisation de l'IP et l'II et des analyses en spectroscopie MIR	207
Annexe 2. Echantillons de différentes compositions, ozonés dans différentes conditions, pour une caractérisation de l'IP et l'II et des analyses en spectroscopie NIR	208
Annexe 3. Echantillons de différentes compositions, ozonés dans différentes conditions pour une caractérisation de l'IP et des analyses en spectroscopie MIR et NIR	209
Annexe 4. Distribution des souches à coloration de Gram-négatif selon leurs caractéristiques, E : environnementale, A : animale, MAP : pathogène majeur, O : pathogène opportuniste .	210
Annexe 5. Distribution des souches à coloration de Gram-positif selon leurs caractéristiques, E : environnementale, A : animale, MAP : pathogène majeur, O : pathogène opportuniste .	211
Annexe 6. Nombre de souches en fonction de la sensibilité aux antibiotiques et du genre des germes	212
Annexe 7. Quantité de souches résistantes (R), sensibles (S) et de cas intermédiaires (I) pour chaque antibiotique ainsi que les proportions de souches inhibées pour une concentration appliquée	213

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adewale, P., Mba, O., Dumont, M.-J., Ngadi, M., & Cocciardi, R. 2014. "Determination of the iodine value and the free fatty acid content of waste animal fat blends using FT-NIR." *Vibrational Spectroscopy*, 72, 72–78.
- AFNOR, 2007a. NF EN ISO 6885 Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice d'anisidine.
- AFNOR. 2007b. NF EN ISO 20776-1 : Systèmes d'Essais en Laboratoire et de Diagnostic In Vitro : Sensibilité In Vitro des Agents Infectieux et Évaluation des Performances des Dispositifs pour Antibiogrammes - Partie 1 : Méthode de Référence pour la Détermination de la Sensibilité In Vitro aux Agents Antimicrobiens des Bactéries Aérobies à Croissance Rapide Impliquées dans les Maladies Infectieuses.
- AFNOR. 2009. NF EN ISO 660 : Corps Gras d'Origines Animale et Végétale - Détermination de l'Indice d'Acide et de l'Acidité.
- AFNOR. 2010a. NF EN ISO 3960 : Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice de peroxyde - Détermination avec point d'arrêt iodométrique, 3960, 10–14.
- AFNOR. 2010b. NF EN ISO 12966-3 : Corps Gras d'Origines Animale et Végétale - Chromatographie en Phases Gazeuse des Esters Méthyliques d'Acides Gras - Partie 3: Préparation des Esters Méthyliques à l'aide d'Hydroxyde de Triméthylsulfonium (TMSH).
- AFNOR. 2011. NF EN ISO 3961 : Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de l'indice d'iode, 10–14.
- Aiemsraad, J., Suneerat A. 2011. "The Effect of Lemongrass Oil and Its Major Components on Clinical Isolate Mastitis Pathogens and Their Mechanisms of Action on Staphylococcus Aureus DMST 4745." *Research in Veterinary Science*, 91(3), 31–37.
- Aloush V., Navon-Venezia S., Seigman-Igra Y. 2005. "Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Risk Factors and Clinical Impact." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (1) 43-48.
- Al-Waili, N.S., Saloom, K.S., Al-Waili, T.N. 2006. « The safety and efficacy of a mixture of honey, olive oil, and beeswax for the management of hemorrhoids and anal fissure: A pilot study." *Scientific World Journal*, 6, 1998–2005.
- Amri, Z., Ben Hamida, S., Dbeibia, A., Ghorbel, A., Mahdhi, A., Znati, M. Hammami, M. 2020. "Physico-chemical Characterization and Antibacterial Activity of Ozonated Pomegranate Seeds Oil." *Ozone: Science & Engineering*. 42:6, 531-538.
- An, Z., Jiang, X., Xiang, G., Fan, L., He, L., & Zhao, W. 2017. "A simple and practical method for determining iodine values of oils and fats by the FTIR spectrometer with an infrared quartz cuvette." *Analytical Methods*, 9(24), 3669–3674.

Ananda Baskaran, S., G. W. Kazmer, L. Hinckley, S. M. Andrew, and K. Venkitanarayanan. 2009. "Antibacterial Effect of Plant-Derived Antimicrobials on Major Bacterial Mastitis Pathogens in Vitro." *Journal of dairy science* 92(4):1423–1429.

B

Baeyens, V., Felt-Baeyens, O., Rougier, S., Pheulpin, S., Boisramé, B., Gurny, R. 2002. "Clinical evaluation of bioadhesive ophthalmic drug inserts (BODI®) for the treatment of external ocular infections in dogs." *J. Control. Release*, 85, (1–3), 163-168.

Bailey, Philip S. 1978. "Ozonation in Organic Chemistry. Vol.1: Olefinic Compounds." Academic P. New York.

Bailey, Philip S. 1982. "Ozonation in Organic Chemistry: Nonolefinic Compounds." Academic Press, Inc., New York.

Barlow, J. 2011. "Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: A Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 16(4):383–407.

Battinelli, L., Daniele, C., Cristiani, M., Bisignano, G., Saija, A., Mazzanti, G. 2006. "In vitro antifungal and antielastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit." *Phytomedicine*, 13, 558–563.

Baumann, L. S. 2007. "Less-known botanical cosmeceuticals." *Dermatologic Therapy*, 20(5), 330–342

Benson, Sidney W. 1959. "Kinetic Considerations of Efficiency of Ozone Production in Gas Discharges." *Ozone Chemistry And Technology*, vol. 21, 405–409.

Bergonier, Dominique, Renée De Crémoux, Rachel Rupp, Gilles Lagriffoul, and Xavier Berthelot. 2003. "Mastitis of Dairy Small Ruminants." *Veterinary research* 34:689–716.

Bergonier D, Berthelot X. 2003. "New advances in epizootiology and control of ewe mastitis." *Livest. Prod. Sci.*, 79:1–16.

Bergonier D, Lagriffoul G, Barillet F, Rupp R, Valognes A, Brugidou R, et al. 2005. "Aetiological, clinical and epidemiological characterization of clinical mastitis in dairy sheep." *Proc. 4th IDF Int. Mastit. Conf. Maastricht, Netherlands, 12-15 June 2005.* Wageningen Academic Publishers; p. 497–50.

Bergonier D, Sobral D, Feßler AT, Jacquet E, Gilbert FB, Schwarz S, et al. 2014. "Staphylococcus aureus from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA)." *Vet. Res.*;45:97.

Bertrand, D., & Dufour, É. 2006. "La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques." Lavoisier Ed. 2.

- Bialoszewski, D., Pietruczuk-Padzik, A., Kalicinska, A., Bocian, E., Czajkowska, M., Bukowska, B., Tyski, S. 2011. "Activity of ozonated water and ozone against staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa biofilms." *Med Sci. Monit.*, 17, 339–344.
- Bocci, V., Zanardi, I., Valacchi, G., Borrelli, E., Travagli, V. 2015. "Validity of oxygen-ozone therapy as integrated medication form in chronic inflammatory diseases." *Cardiovasc. Hematol. Disord. - Drug Targets*, 15, 127–138.
- Boland-Nazar, N.S., Eslamirad, Z., Sarmadian, H., Ghasemikhah, R. 2016. "An in vitro evaluation of ozonized organic extra-virgin olive oil on Giardia Lamblia cysts." *Jundishapur J. Microbiol.*, 9, (11).
- Borges, G.Á., Elias, S.T. 2017. "In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy." *J. Cranio-Maxillofac. Surg.*, 45, 364–370.
- Bourgin, Marc. 2011. "Etude de la decomposition de produits phytosanitaires par l’ozone : application au traitement des semences déclassées." Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Bramley, P. M. M. et al. 2000. "Vitamin E." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(7):913–938.
- C**
-
- Cain, W. S., R. Schmidt, and P. Wolkoff. 2007. "Olfactory Detection of Ozone and D-Limonene: Reactants in Indoor Spaces." *Indoor air* 17(5):337–347.
- Carata, E.T., B.A., Dini, L. 2019. "Powerful Properties of Ozonated Extra Virgin Olive Oil." *Herbal Medicine*, Editor P. Builder; Intech Open Limited, London, ch. 12.
- Cataldo, F., and L. Gentilini. 2005. "Chemical Kinetics Measurements on the Reaction between Blood and Ozone." *International Journal of Biological Macromolecules* 36:61–65
- Cataldo, F. 2007. "On the Action of Ozone on Gelatin." *International Journal of Biological Macromolecules* 41:210–16
- Cataldo, F. 2015. "Ethyl Oleate and Ethyl Elaidate Ozonides: Thermal Decomposition and Photolysis." *Ozone: Science & Engineering* (June):1–10.
- Cataldo, F., Ori O. 2020. "On the Action of Ozone on Phospholipids, a Model Compound of the External Envelope of Pericapsidic Viruses like Coronavirus. Part 1." *Ozone: Science & Engineering*, 42:6, 478-491
- Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, G., de Ascentiis, A., Tortini, P. 2012. "Stability Studies of Ozonized Sunflower Oil and Enriched Cosmetics with a Dedicated Peroxide Value Determination." *Ozone: Sci. Eng.*, 34, 293–299.

- CLSI. 2012. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition." CLSI document M7-A9, vol. 32. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Contreras A, Sierra D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, et al. 2007. "Mastitis in small ruminants." *Small Rumin. Res.*, 68:145–53.
- Cox, R., Lebrasseur, J., Michiels, E., Buijs, H., Li, H., van de Voort, F. R., Sedman, J. 2000. "Determination of iodine value with a fourier transform-near infrared based global calibration using disposable vials: An international collaborative study." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(12)
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M., Parker, M., Cynkar, W., Damberg, R., Gishen, M., & Herderich, M. 2004. "Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy." *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 73–80.
- Criegee, Rudolf. 1975. "Mechanism of Ozonolysis." *Angewandte Chemie International Edition in English* 14(11):745–751.
- Curtiellas, V. 2008. "El OLEOZON® Sobre La Viabilidad, La Permeabilidad Celular Y La Ultraestructura de Staphylococcus Aureus." *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39(2):128–131.

D

- Dal Pozzo, M. 2011. "Activity of Essential Oils from Spices against Staphylococcus Spp. Isolated from Bovine Mastitis." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 63(5):1229–1232.
- De Almeida, N.R., Beatriz, A., De Arruda, E.J., De Lima, D.P., De Oliveira, L.C.S. Micheletti, A.C. 2016. "Ozonized vegetable oils: Production, chemical characterization and therapeutic potential." *Vegetable Oil: Properties, Uses and Benefits*, Editor B. Holt; Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, pp. 129–160.
- Di Paolo, N., Gaggiotti, E., Galli, F. 2005. "Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: Clinical and biological implications of ozone therapy." *Redox Rep.*, 10, 121–130.
- Díaz, M. F. 2012. "Physicochemical Characteristics of Ozonated Sunflower Oils Obtained by Different Procedures." *Grasas y Aceites* 63(4):466–474
- Díaz, Maritza F., José A. Gavín, Magali Gómez, Vicente Curtielles, and Frank Hernández. 2006. "Study of Ozonated Sunflower Oil Using ¹H NMR and Microbiological Analysis." *Ozone: Science & Engineering* 28(1):59–63.
- Díaz, Maritza F., José A. Gavín Sazatornil, et al. 2005. "Spectroscopic Characterization of Ozonated Sunflower Oil." *Ozone: Science & Engineering* 27(3):247–253.
- Díaz, Maritza F., Rebeca Hernández, et al. 2006. "Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(2):403–407.

- Díaz, Maritza F., Nayibi Núñez, Daraisy Quincose, Wilfredo Díaz, and Frank Hernández. 2005. "Study of Three Systems of Ozonized Coconut Oil." *Ozone: Science & Engineering* 27(2):153–157.
- Díaz Gómez, Maritza F., Goitybell Martínez Téllez, Maikel Arteaga Cruz, and Rafael Garcés Mancheno. 2006. "Chemical Analysis of Ozonized Theobroma Fat." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83(11):943–946.
- Díaz-Gómez, Maritza F. et al. 2009. "Estudio Comparativo de La Ozonizacion de Aceites de Girasol Modificados Genéticamente Y Sin Modificar." *Quimica Nova* 32(9):2467–2472.
- Dohan, J. M., and W. J. Masschelein. 1987. "The Photochemical Generation of Ozone: Present State-of-the-Art." *Ozone: Science & Engineering* 9(4):315–334.
- Dubois, V. 2007. "Fatty Acid Profiles of 80 Vegetable Oils with Regard to Their Nutritional Potential." *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(7):710–732.
- Dudouet C. 2004. "La production des bovins allaitants." 2ème éd. Editions France Agricole.
- Dufour É. 2009. "Principles of Infrared Spectroscopy." Sun, Da-Wen (ed) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. San Diego: Academic Press, pp.1-27.

F

- Fenaroli, P. 1906. "Gravimetric estimation of ozone; ozone numbers of oils." *Gazz. Chim.*, 36, 292–298.
- Ferreira, S.L.C., Dos Santos W.N.L., Quintella C.M. 2004. "Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry – Review." *Talanta*, 63, 1061–1067.
- Fitzpatrick, E., Holland, O.J., Vanderlelie, J.J. 2018. "Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review." *Int. Wound J.*, 15, 633–644.
- Francisco P.J. 2017. "Utilización de aceites ozonizados para el tratamiento de heridas en bovinos de engorda." *Abanico veterinario*; Vol 7, No 2. 60-67.
- Fratini, F. 2014. "Antibacterial Activity of Essential Oils, Their Blends and Mixtures of Their Main Constituents against Some Strains Supporting Livestock Mastitis." *Fitoterapia* 96:1–7.

G

- Gelasakis A. I, Mavrogianni VS, Petridis IG, Vasileiou NGC, Fthenakis GC. 2015. "Mastitis in sheep - The last 10 years and the future of research." *Vet. Microbiol.*
- Georgiev, V. 2015. "Study of Ozonated Olive Oil: Monitoring of the Ozone Absorption and Analysis of the Obtained Functional Groups." *Ozone : Science & Engineering*, 37, 55–61.

- Gershwin, L.J. 2015. "Comparative immunology of allergic responses." *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 3, 327–346.
- Gertz, C., Fiebig, H.-J., & Hancock, J. N. S. 2013. "FT-near infrared (NIR) spectroscopy - Screening analysis of used frying fats and oils for rapid determination of polar compounds, polymerized triacylglycerols, acid value and anisidine value [DGF C-VI 21a (13)]." *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1193–1197.
- Godard, Anaïs. 2012. "Nouveaux Procédés Verts D'oxydation de L'acide Oléique." Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- Goetz P., Ghedira K. 2012. "Phytothérapie anti-infectieuse." Collection Phytothérapie – Pratique.
- Goupy, J., 2006. "Les Plans D'Expériences." *Revue MODULAD* 34, 74–116.
- Guerra-Blanco, P., Poznyak, T. 2015. "Correlation of structural characterization and viscosity measurements with total unsaturation: An effective method for controlling ozonation in the preparation of ozonated grape seed and sunflower oils." *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, 988–998.
- Guerra-Blanco, P. 2017. "Ozonation Degree of Vegetable Oils as the Factor of Their Anti-Inflammatory and Wound-Healing Effectiveness" *Ozone: Science & Engineering*, 39:5, 374-384.
- Guillén, María D., and Nerea Cabo. 2002. "Fourier Transform Infrared Spectra Data versus Peroxide and Anisidine Values to Determine Oxidative Stability of Edible Oils." *Food Chemistry* 77(4):503–510.
- Guinesi, A.S. 2011. "Ozonized Oils: A qualitative and quantitative analysis." *Braz. Dent. J.*, 22, 37–40.
- Gutsche H., Stefan Franzen K., Kloeker M. 2007. "Process for the ozonolysis of unsaturated compounds" U.S. Patent Application Publication, Ser. No. 11/801,385. Pub. No.: US 2007/0276165 A1.

H

- Harada, T. 1934. "Olive oil ozonide and its fungicidal quality." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 9, 192–197.
- He, X., Leng, C., Pang, S., & Zhang, Y. 2017. "Kinetics study of heterogeneous reactions of ozone with unsaturated fatty acid single droplets using micro-FTIR spectroscopy." *RSC Advances*, 7(6), 3204–3213.
- Henbest H. B., Stratford M. J. W. 1964. "Amine oxidation. Part VIII. The reaction of tri-n-butylamine with ozone." *J. Chem. Soc.*, 711-714.

Hernández Tápanes, R., Goitybell Martínez Téllez, and Maritza F. Díaz Gómez. 2004. "Aspectos Químico-Físicos Del Aceite de Girasol Ozonizado." *Revista CENIC Ciencias Químicas* 35(3):159–162.

Hernández, F., Hernández, D., Zamora, Z., Díaz, M.; Ancheta, O., Rodriguez, S., Torres, D. 2009. "Giardia duodenalis: Effects of an ozonized sunflower oil product (Oleozone®) on in vitro trophozoites." *Exp. Parasitol.*, 121, 208–212.

I

Ishmuratov, G. Yu., Yu. V. Legostaeva, L. P. Botsman, and G. A. Tolstikov. 2010. "Transformations of Peroxide Products of Olefins Ozonolysis." *Russian Journal of Organic Chemistry* 46(11):1593–1621.

Issautier MN. 2013. "Homéopathie pour tous les ruminants. " 2ème éd. Editions France Agricole.

J

Jang, Yun-Woo, Jin-Young Jung, In-Kyoung Lee, Si-Yong Kang, and Bong-Sik Yun. 2012. "Nonanoic Acid, an Antifungal Compound from Hibiscus Syriacus Ggoma." *Mycobiology* 40(2):145–146

Jenerowicz, D., Silny, W., Dańczak-Pazdrowska, A., Polańska, A., Osmola-Mańkowska, A., Olek-Hrab, K. 2012. "Environmental factors and allergic diseases." *Ann. Agric. Env. Med.*, 19, 475–481.

Jo, S-N. 2005. "A Therapeutic Effect of Ozonated Oil on Bovine Mastitis." *Journal of Veterinary Clinics* 22(4):318–321.

John, Jacob, Mrinal Bhattacharya, and Peter C. Raynor. 2004. "Emulsions Containing Vegetable Oils for Cutting Fluid Application." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 237(1-3):141–150.

K

Kamal-Eldin, Afaf, and Roger Andersson. 1997. "A Multivariate Study of the Correlation between Tocopherol Content and Fatty Acid Composition in Vegetable Oils." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74(4):375–380.

Karam S. 2004. "Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt." Thèse de Doctorat, Université de Limoges.

Kasote, Deepak, Aijaz Ahmad, Weiyang Chen, Sandra Combrinck, and Alvaro Viljoen. 2015. "HPTLC-MS as an Efficient Hyphenated Technique for the Rapid Identification of Antimicrobial Compounds from Propolis." *Phytochemistry Letters* 11:326–331.

Kuczkowski, Robert L. 1983. "Formation and Structure of Ozonides." *Accounts of Chemical Research* 16(2):42–47.

L

- Langlais, Bruno, David A. Reckhow, and Deborah R. Brink. 1991. "Ozone in Water Treatment: Application and Engineering." *Am Water Works Res F*.
- Learidi, R., 2009. "Experimental design in chemistry: A tutorial." *Anal. Chim. Acta* 652, 161–172.
- Ledeá, O., Correa, T., Escobar, M., Rosado, A., Molerio, J., Hernández, C., Jardines, D. 2001. "Volatile components of ozonized sunflower oil "OLEOZON®".*" Ozone: Sci. Eng.,* 23, 121–126.
- Ledeá Lozano, Oscar Ernesto. 2005. "Aplicación de Metodos Cromatograficos En El Estudio de La Composición Química Del Aceite de Girasol Ozonizado ' OLEOZON ®.'" *Revista CENIC Ciencias Quimicas* 36.
- Ledeá Lozano, Oscar E. 2010. "Evidencias Del Mecanismo Oxidante En La Actividad Antibacteriana Del Aceite de Girasol Ozonizado." *Revista CENIC Ciencias Quimicas* 41.
- Lesot H. 2006. "Essai thérapeutique d'un mélange de trois huiles essentielles en intramammaire sur les mammites cliniques en élevage agro-biologique. " *Th.D.Vétérinaire, Nantes.*
- Li, H., van de Voort, F. R., Sedman, J., & Ismail, A. A. 1999. "Rapid determination of cis and trans content, iodine value, and saponification number of edible oils by fourier transform near-infrared spectroscopy." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(4), 491–497.
- Li, H., van de Voort, F. R., Ismail, A. A., & Cox, R. 2000. "Determination of peroxide value by fourier transform near-infrared spectroscopy." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(2), 137–142.
- Li-Chan, E. C. Y. 2010. "Introduction to Vibrational Spectroscopy in Food Science." *Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
- List, G. 2015. "Sunflower Seed and Oil." *Lipid Technology* 27(1):24–24.

M

- Ma, K., van de Voort, F. R., Sedman, J., & Ismail, A. A. 1997. "Stoichiometric determination of hydroperoxides in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(8), 897–906.
- Ma, Y, Ke, Y, Zhu, H. 2017. "Oleozone: A novel control strategy against powdery mildew in cucumber." *J. Phytopathol.*, 165: 841– 847.
- Martínez, S.G., Al-Dalain, S.M., Menéndez, S., Re, L.; Giuliani, A., Candelario, -J.E., Álvarez, H., Fernández-Montequín, J.I., León, O.S. 2005. "Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot." *Eur. J. Pharm.*, 523, 151–161.

- Martínez Téllez, Goitybell, and Maritza F. Díaz Gómez. 2006. “Desarrollo Y Validación Del Método de Oxidación Ferrosa En Xilenol Naranja Para La Determinación de Hidroperóxidos En Aceite de Girasol Ozonizado.” *Revista CENIC Ciencias Químicas* 37(1):11–15.
- Masson, S. 2008. “Etude structurale d'un complexe de trois protéines de la division du pneumocoque, DivIB, DivIC et FtsL.” Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble 1.
- McMullen, J.P, Jensen K.F. 2010. “Integrated Microreactors for Reaction Automation: New Approaches to Reaction Development.” *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 3:19–42.
- Mendez F., Maier D. E., Mason L. J. 2003. “Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance.” *Journal of Stored Products Research*, 39, 33-44.
- Menéndez, S., Falcón, L., Maqueira, Y. 2011. “Therapeutic efficacy of topical OLEOZON ® in patients suffering from onychomycosis.” *Mycoses*, 54, e272–e277.
- Meng, X., Ye, Q., Nie, X., & Jiang, L. 2017. “Iodine value determination of edible oils using ATR-FTIR and chemometric methods.” *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9), 1600323.
- Mevik, B.-H., & Cederkvist, H. R. 2004. “Mean squared error of prediction (MSEP) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR).” *Journal of Chemometrics*, 18(9), 422–429.
- Miura, Toshiaki, Shigeru Suzuki, Shotaro Sakurai, Akio Matsumoto, and Nariko Shinriki. 2001. “Structure Elucidation of Ozonated Olive Oil.” *Proceedings of the 15th Ozone World Congress: Medical Therapy Conference*, p. 3 - 7.
- Moh, M. H., Che Man, Y. B., van de Voort, F. R., & Abdullah, W. J. W. 1999. “Determination of peroxide value in thermally oxidized crude palm oil by near infrared spectroscopy.” *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(1), 19–23.
- Monteiro, Camila Gonçalves Jezini, M.S. Gama, B. F. Moura, G. G. Cabral- Oliveira, A. L. Mattos-Guaraldi, Carlos José Lima & R. X. Lins. 2020. “In Vitro Antimicrobial Activity of Ozonated Sunflower Oil against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Endodontic Infection.” *Ozone: Science & Engineering*.
- Moradigaravand, D. et al. 2016. “Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland.” *Genome research*, vol. 26,8: 1101-9.
- Moureu, S. 2015a. « Identification d'un moyen de lutte alternatif contre les mammites : synthèse, caractérisation et évaluation de l'activité antibactérienne in vitro d'huile de tournesol ozonée. » Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

Moureu, S., Violleau, F., Ali Haimoud-Lekhal, D., Calmon, A. 2015b. "Ozonation of Sunflower Oils: Impact of Experimental Conditions on the Composition and the Antibacterial Activity of Ozonized Oils." *Chemistry and Physics of Lipids* 186, 79–85.

Moureu, S., Violleau, F., Ali Haimoud-Lekhal, D., Calmon, A. 2016. "Influence of Storage Temperature on the Composition and the Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil." *Ozone: Sci. Eng.*, 38, 143–149.

N

Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Kitamura, C., Yano, J., Terashita, M., Nishihara, T. 2004. "Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms." *Oral Microbiol. Immunol.*, 19, 240–246.

Natsuga M. & Kawamura S. 2006. "Visible and near-infrared reflectance spectroscopy for determining physicochemical properties of rice." *Transactions of the ASABE*, 49(4), 1069–1076.

Nielsen, M. A. 2015. "Neural networks and deep learning." San Francisco, CA, USA: Determination press. Vol 25.

Nieves-Remacha, M.J., Kulkarni A.A., Jenser K.F. 2013. "Gas–Liquid Flow and Mass Transfer in an Advanced-Flow Reactor." *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 8996–9010.

Nieves-Remacha, M.J., Jenser K.F. 2015. "Mass Transfer Characteristics of Ozonolysis in Microreactors and Advanced-Flow Reactors." *J. Flow Chem.*, 5(3), 160–165.

Nishikawa, N. 1995. "Structures of Ozonolysis Products of Methyl Oleate Obtained in a Carboxylic Acid Medium." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(6):735–740.

O

Oliver, Stephen P., and Shelton E. Murinda. 2012. "Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 28(2):165–185.

Oliver, Stephen P., Shelton E. Murinda, and Bhushan M. Jayarao. 2011. "Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review." *Foodborne pathogens and disease*, 8(3):337–355.

Omaleki L, Browning GF, Allen JL, Barber SR. 2011. "The role of *Mannheimia* species in ovine mastitis." *Vet. Microbiol.*;153:67–72.

Omonov, Tolibjon S., Ereddad Kharraz, and Jonathan M. Curtis. 2010. "Ozonolysis of Canola Oil: A Study of Product Yields and Ozonolysis Kinetics in Different Solvent Systems." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(5):689–705.

Ouf, S.A., Moussa, T.A., Abd-Elmegeed, A.M., Eltahlawy, S.R. 2016. "Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes." *Braz. J. Microbiol.*, 47, 697–702.

Oviedo, A. 2017. "Evaluation of the antibacterial effect of ozonized olive oil against *Listeria monocytogenes*." *Abanico vet.*, vol.7, n.1, pp.36-43.

Ozturk, B., Kurtoglu, T., Durmaz, S., Kozaci, L.D., Abacigil, F., Ertugrul, B.; Erel, O. 2017. "The effects of ozone on bacterial growth and thiol-disulphide homeostasis in vascular graft infection caused by MRSA in rats." *Acta Cir. Bras.*, 32, 219–228.

P

Pages, M. 2015. « Effets et mécanismes d'action de l'ozone utilisé comme moyen de lutte contre des champignons pathogènes du pommier : études in vitro et in vivo. » Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

Percival, Steven L., Marylynn V. Yates, David W. Williams, Rachel M. Chalmers, and Nicholas F. Gray. 2014. "Ozone Disinfection." *Microbiology of Waterborne Diseases*, pp. 599–615.

Poznyak T. 2008. "Ozone application for the people health state monitoring by the total unsaturation index determination." *Ozonoterapia*, Vol. 1, Num 1, pp 15-23.

Prieto, N., Dugan M.E.R., Jurez M. 2018. "Using portable near-infrared spectroscopy to predict pig subcutaneous fat composition and iodine value." *Can. J. Anim. Sci.* 98: 221–229.

R

Rajabi, O., Sazgarnia, A.; Abbasi, F., Layegh, P. 2015. "The activity of ozonated olive oil against *Leishmania major* promastigotes." *Iran. J. Basic Med Sci.*, 18, 915–91.

Ramos, M.J., Carmen María Fernández, Abraham Casas, Lourdes Rodríguez, and Angel Pérez. 2009. "Influence of Fatty Acid Composition of Raw Materials on Biodiesel Properties." *Bioresource technology*, 100(1):261–268.

Rattez C. 2017. "Les mammites subcliniques en élevage bovin laitier : antibiothérapie et alternatives Sciences pharmaceutiques. " Thèse de Doctorat, Université de Rouen.

Remy D. 2010. "Les mammites. " Guides France Agricole.

Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. 2012. "Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens--a systematic review and meta-analysis." *J. Dairy Sci.*:95:6483–502.

Richard R. 2011. "Transestérification éthanolique d'huile végétale dans des microréacteurs transposition du batch au continu. " Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

Roberson, Jerry R. 2012. "Treatment of Clinical Mastitis." *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28(2):271–288.

- Rodrigues De Almeida Kogawa, N., José De Arruda, E., Micheletti, A.C. 2015. "Synthesis, characterization, thermal behavior, and biological activity of ozonides from vegetable oils." *RSC Adv.*, 5, 65427–65436.
- Roustan M. 2003. "Transferts gaz-liquide dans les procédés de traitement des eaux et des effluents gazeux." Tec & Doc, Paris.
- Royster, Erin, and Sarah Wagner. 2015. "Treatment of Mastitis in Cattle." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 31(1):17–46.
- Ruegg, P. L. 2009. "Management of Mastitis on Organic and Conventional Dairy Farms." *Journal of animal science* 87(13 Suppl):43–55.

S

- Sadowska, J. 2008. "Characterization of Ozonated Vegetable Oils by Spectroscopic and Chromatographic Methods." *Chemistry and physics of lipids* 151(2):85–91.
- Salat O. 2014. "Test CMT : toujours d'actualité pour le trayeur et le manageur du troupeau. " *PLM*, n°460, 58-59.
- Schober, B.D. 1995. "Ozonolysis and reduction in fine chemicals industry." *Chemica Oggi*,13(6), 21-24.
- Sechi, L.A., Lezcano, I., Nunez, N. 2001. "Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon)." *J. Appl. Microbiol.*, 90, 279–284.
- Seegers, Henri, Christine Fourichon, and François Beaudreau. 2003. "Production Effects Related to Mastitis and Mastitis Economics in Dairy Cattle Herds." *Veterinary research* 34:475–491.
- Sega, A. 2010. "Properties of Sesame Oil by Detailed ¹H and ¹³C NMR Assignments before and after Ozonation and Their Correlation with Iodine Value, Peroxide Value, and Viscosity Measurements." *Chemistry and physics of lipids* 163(2):148–156.
- Serio, F., Pizzolante, G., Cozzolino, G. 2017. "A New Formulation Based on Ozonated Sunflower Seed Oil: In Vitro Antibacterial and Safety Evaluation." *Ozone: Sci. Eng.*, 39, 139–147.
- Seweh E.A., Xiaobo Z., Tao F. 2019. "Multivariate analysis of three chemometric algorithms on rapid prediction of some important quality parameters of crude shea butter using Fourier transform-near infrared spectroscopy." *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, volume: 27 issue: 3, page(s): 220-231.
- Sieber, M. A., and J. K. E. Hegel. 2014. "Azelaic Acid: Properties and Mode of Action." *Skin pharmacology and physiology*, 27 Suppl 1:9–17.
- Skalska, Kinga, Stanisław Ledakowicz, Jan Perkowski, and Barbara Sencio. 2009. "Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil." *Ozone: Science & Engineering*, 31(3):232–237.

- Skvaril, J., Kyprianidis, K. G., & Dahlquist, E. 2017. "Applications of near-infrared spectroscopy (NIRS) in biomass energy conversion processes: A review." *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(8), 675–728.
- Smith KL, Hogan JS. 1993. "Environmental mastitis." *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*;9:489–98.
- Smith, N.L., Wilson, A.L., Gandhi, J., Vatsia, S., Khan, S.A. 2017. "Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility." *Med. Gas. Res.*, 7, 212–219.
- Song, M. Zeng, Q., Xiang, Y., Gao, L., Huang, J., Huang, J., Wu, K., Lu, J. 2018. "The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection." *Mol. Med. Rep.*, 17, 2449–2455.
- Soriano, Nestor U., Veronica P. Migo, and Masatoshi Matsumura. 2003. "Ozonation of Sunflower Oil: Spectroscopic Monitoring of the Degree of Unsaturation." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(10):997–1001.
- Spadea, L., Tonti, E., Spaterna, A., Marchegiani, A. 2018. "Use of Ozone-Based Eye Drops: A Series of Cases in Veterinary and Human Spontaneous Ocular Pathologies." *Case Rep. Ophthalmol.*, 9, 287–298.
- Stefanov, I., Baeten, V., Abbas, O., Vlaeminck, B., De Baets, B., & Fievez, V. 2013. "Evaluation of FT-NIR and ATR-FTIR Spectroscopy Techniques for Determination of Minor Odd- and Branched-Chain Saturated and trans Unsaturated Milk Fatty Acids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3403–3413.

T

- Talpur, M.Y., Kara H., Sherazi S.T.H. 2014. "Application of multivariate chemometric techniques for simultaneous determination of five parameters of cottonseed oil by single bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy." *Talanta*, 129:473-80.
- Tara, F., Zand-Kargar, Z., Rajabi, O., Berenji, F. 2016. "The Effects of Ozonated Olive Oil and Clotrimazole Cream for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis." *Altern. Ther. Health Med.*, 22, 44–49.
- Tavassoli-Kafrani, M. H., van de Voort, F. R., & Curtis, J. M. 2017. "The use of ATR-FTIR spectroscopy to measure changes in the oxirane content and iodine value of vegetable oils during epoxidation." *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(7), 1600354.
- Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. 2015. "Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results." *Int. J. Antimicrob. Agents.*;46:13–20.
- Tiwari, S., Avinash, A., Katiyar, S. 2017. "Dental applications of ozone therapy: A review of literature." *Saudi J. Dent. Res.*, 8, (1–2), 105-111.

Travagli, V., Zanardi, I., Bocci, V. 2009. "Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: An insight into the patent claims." *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.*, 4, 130–142.

Travagli, V., I. Zanardi, G. Valacchi, and V. Bocci. 2010. "Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review." *Mediators of inflammation*.

Tréguier, S. 2020. "La spectroscopie comme outil de caractérisation des microorganismes : application à la microbiologie du sol et des produits laitiers." Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Trevisi, Erminio et al. 2014. "Strategies for Reduced Antibiotic Usage in Dairy Cattle Farms." *Research in Veterinary Science* 96(2):229–233.

U

Ugazio E., Tullio V. Binello A. 2020. "Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques." *Molecules*, 25, 334.

V

Valacchi, G. 2011. "Ozonated Sesame Oil Enhances Cutaneous Wound Healing in SKH1 Mice." *Wound repair and regeneration*, 19:107–115.

Valacchi, G., Zanardi, I., Lim, Y., Belmonte, G. 2013. "Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice". *Int. J. Pharm.*, 458, 65–73.

Varol, K., Koc, A.N., Atalay, M.A., Keles, I. 2017. "Antifungal Activity of Olive Oil and Ozonated Olive Oil Against *Candida* Spp. and *Saprochaete* Spp." *Ozone: Sci. Eng.*, 39, 462–470.

Vesna, O., M. Sax, M. Kalberer, a. Gaschen, and M. Ammann. 2009. "Product Study of Oleic Acid Ozonolysis as Function of Humidity." *Atmospheric Environment*, 43(24):3662–3669.

Vingering, Nathalie, Marine Oseredczuk, Laure du Chaffaut, Jayne Ireland, and Martial Ledoux. 2010. "Fatty Acid Composition of Commercial Vegetable Oils from the French Market Analysed Using a Long Highly Polar Column." *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 17(3):185–192.

W

Wada, Y., Schmidt M.A., Jensen K.F. 2006. "Flow Distribution and Ozonolysis in Gas-Liquid Multichannel Microreactors." *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45, 8036-8042

Warner, Kathleen, Brady Vick, Larry Kleingartner, Ruth Isaak, and Kathi Doroff. 2007. "Compositions of Sunflower, Nusun (Mid-Oleic Sunflower) and High-Oleic Sunflower Oils."

Williams P.C., Norris K. 2001. "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries." 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.

Williamson, J. H., and S. J. Lacy-Hulbert. 2013. "Effect of Disinfecting Teats Post-Milking or Pre- and Post-Milking on Intramammary Infection and Somatic Cell Count." *New Zealand veterinary journal*, 61(5):262–268.

Wu, Mingdan, Daniel F. Church, Thomas J. Mahier, Steven A. Barker, and William A. Pryor. 1992. "Separation and Spectral Data of the Six Isomeric Ozonides from Methyl Oleate." *Lipids* 27(2):129–135.

Y

Yu, X., Van der Voort F.R., Sedman J. 2007. "Determination of peroxide value of edible oils by FTIR spectroscopy with the use of the spectral reconstitution technique." *Talanta*, 74(2):241-6.

Z

Zanardi, Iacopo, Valter Travagli, Alessandro Gabbrielli, Luisa Chiasserini, and Velio Bocci. 2008. "Physico-Chemical Characterization of Sesame Oil Derivatives." *Lipids*, 43(9):877–886.

Zanardi, I., Burgassi, S., Paccagnini, E., Gentile, M., Bocci, V., Travagli, V. 2013. "What is the best strategy for enhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections?" *Biomed Res. Int.*, Volume 2013, Article ID 702949.

Zeng, J., Lu, J. 2018. "Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases." *Int. Immunopharmacol*, 56, 235–241.

Zhao, Y. 2015. "Prevalence and Pathogens of Subclinical Mastitis in Dairy Goats in China." *Tropical Animal Health and Production*, 47:429–435.

Zhou, S., Joudan S., Forbes M.W. 2019. "Reaction of Condensed-Phase Criegee Intermediates with Carboxylic Acids and Perfluoroalkyl Carboxylic Acids." *Environmental Science & Technology Letters*, 6, 4, 243–250.

ANNEXES

Annexe 1. Echantillons de différentes compositions ozonés dans différentes conditions, pour une caractérisation de l'IP et l'II et des analyses en spectroscopie MIR

Matière première	Quantité (g)	Solvant	Quantité (g)	Durée de réaction (h)	Nombre d'échantillons					
THO	50	aucun	-	0	1					
				2	2					
				4	2					
				6	2					
		eau	2.5	-	4	2				
					2	2				
			5	-	4	3				
					6	2				
					10	-	4	2		
LM	50	aucun	-	0	1					
				2	3					
				4	2					
				6	2					
		eau	5	-	2	2				
					4	3				
			6	-	6	3				
					OM	50	aucun	-	0	1
									2	3
4	2									
6	3									
eau	5	-	2	2						
			4	2						
	6	-	6	2						
			Huile classique	50			eau	5	1	2
									2	2
3	3									
4	3									
5	3									
7	2									

Annexe 2. Echantillons de différentes compositions, ozonés dans différentes conditions, pour une caractérisation de l'IP et l'II et des analyses en spectroscopie NIR

Matière première	Quantité (g)	Solvant	Quantité (g)	Durée d'ozonation (h)	Nombre d'échantillons	
THO	50	aucun	-	0	2	
				2	1	
				4	1	
		eau	2.5	4	1	
				5	2	
				10	2	
		eau & AN	5	15	2	
				10	2	
				15	2	
		10	10	5	1	
				10	1	
				15	3	
		12.5	AN	25	1	3
		21		2.1	2	3
		LM	50	aucun	-	0
2	3					
4	2					
6	2					
eau	5			4	1	
				6	3	
OM	50	aucun	-	0	1	
		eau	5	4	1	

Annexe 3. Echantillons de différentes compositions, ozonés dans différentes conditions pour une caractérisation de l'IP et des analyses en spectroscopie MIR et NIR

Matière première	Quantité (g)	Solvant	Quantité (g)	Durée d'ozonation (h)	Nombre d'échantillons	Analyse spectrale envisagée		
THO	50	eau	10	4	48	MIR		
	2.1			4	1			
	4.2			0	1			
				0.5	2			
	7			4	1			
				0	1			
	10.5			0.5	2			
				4	3			
	14			AN	Compléter à un total de 21g		4	1
							1	2
		4	1					
		0	1					
		1	2					
		4	1					
		0	1					
		16.8	2			2		
		5	10			4	2	
		6.25					1.56	1
	3.13			1				
	6.25			0.5	1			
	12.7			1				
25	1							
12.5			3.13	1	1			
			25	1	1			
7	eau & AN	0.7	14	4	4	NIR		

Annexe 4. Distribution des souches à coloration de Gram-négatif selon leurs caractéristiques,
E : environnementale, *A* : animale, *MAP* : pathogène majeur, *O* : pathogène opportuniste

Ordre / famille / groupe	Genre, espèce	Nombre de souches
Coliformes	<i>Escherichia coli</i> ^(E, MAP)	11
	<i>Enterobacter sp</i> ^(E, MAP)	1
	<i>Klebsiella oxytoca</i> ^(E, MAP)	1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^(E, MAP)	9
Autre Enterobacteriaceae	<i>Pantoea agglomerans</i> ^(E, O)	3
	<i>Providencia rettgeri</i> ^(E, O)	1
	<i>Providencia stuartii</i> ^(E, O)	1
	<i>Raoultella terrigena</i> ^(E, O)	1
	<i>Serratia liquefaciens</i> ^(E, O)	1
	<i>Serratia marcescens</i> ^(E, O)	2
Pasteurellaceae	<i>Mannheimia haemolytica</i> ^(A, MAP)	6
	<i>Pasteurella multocida</i> ^(A, MAP)	1
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter lwoffii</i> ^(E, O)	1
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^(E, O)	10

Annexe 5. Distribution des souches à coloration de Gram-positif selon leurs caractéristiques, E : environnementale, A : animale, MAP : pathogène majeur, O : pathogène opportuniste

Ordre / famille / groupe	Genre, espèce	Nombre de souches
Micrococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (A, MAP)	14
	<i>Staphylococcus arlettae</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus chromogenes</i> (A, mip)	6
	<i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> (A, mip)	3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (A, mip)	4
	<i>Staphylococcus equorum</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus fleurettii</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (A, mip)	5
	<i>Staphylococcus hominis</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus lentus</i> (A, mip)	4
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus sciuri</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus simulans</i> (A, mip)	1
	<i>Staphylococcus warneri</i> (A, mip)	2
	<i>Staphylococcus xylosus</i> (A, mip)	2
	<i>Micrococcus sp.</i> (A, mip)	1
	<i>Micrococcus lylae</i> (A, mip)	1
<i>Kocuria rosea</i> (A, mip)	1	
<i>Rothia sp.</i> (A, O)	1	
Lactobacillales	<i>Aerococcus viridans</i> (E, mip)	3
	<i>Enterococcus durans</i> (E, mip)	2
	<i>Enterococcus faecalis</i> (E, MAP)	2
	<i>Enterococcus faecium</i> (E, MAP)	2
	<i>Enterococcus hirae</i> (E, O)	1
	<i>Enterococcus mundtii</i> (E, O)	1
	<i>Streptococcus bovis</i> (E, mip)	1
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (E, MAP)	1
	<i>Streptococcus mitis</i> (A, mip)	1
	<i>Streptococcus salivarius/vestibularis</i> (A, mip)	1
<i>Streptococcus uberis</i> (E, MAP)	2	
Actinomycetales	<i>Corynebacterium jeikeium</i> (A, mip)	1
	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (A, MAP)	1
	<i>Trueperella pyogenes</i> (A, MAP)	1
Autre bactérie Gram-positif	<i>Bacillus cereus</i> (E, O)	2
	<i>Listeria monocytogenes</i> (E, MAP)	3

ANNEXES

Annexe 6. Nombre de souches en fonction de la sensibilité aux antibiotiques et du genre des germes

Antibiotique	Sensibilité	Nombre de souches																							
			Corynebacterium	Trueperella	Aerococcus	Enterococcus	Streptococcus	Kocuria	Micrococcus	Rothia	S. aureus	Autre Staphylococcus	Bacillus	Listeria	Enterobacter	E. coli	Klebsiella	Acinetobacter	Pantoea	Providencia	Raoultella	Serratia	Mannheimia	Pasteurella	Pseudomonas
Amoxicilline	R	43	1	0	0	0	0	0	0	0	10	6	1	0	1	4	9	0	0	0	0	1	0	0	10
	I	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	5	1	0	3	1	1	2	0	0	0
	S	68	1	1	3	8	6	1	2	1	4	27	0	3	0	2	0	1	0	1	0	0	6	1	0
Céfazoline	R	24	1	1	1	2	1	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	3	1	0	10	
	I	7	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	S	94	1	0	0	5	5	1	2	1	14	33	0	3	0	9	9	0	3	1	1	0	5	1	0
Céfotaxime	R	23	2	0	0	6	0	0	0	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	S	101	0	1	3	2	6	1	2	1	13	33	2	0	0	11	10	1	3	2	1	2	6	1	0
Clocacilline	R	61	1	1	3	3	1	0	0	0	0	1	3	1	11	10	1	3	2	1	3	6	0	10	
	S	64	1	0	0	5	5	1	2	1	14	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Enrofloxacin	R	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	122	2	1	3	7	6	1	2	1	14	32	2	2	1	11	10	1	3	2	1	3	6	1	10
Florfenicol	R	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	S	115	2	1	3	8	6	1	2	1	14	33	2	3	1	11	10	1	3	2	1	3	6	1	0
Marbofloxacin	R	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	122	1	1	3	8	6	1	2	1	14	32	2	2	1	11	10	1	3	2	1	3	6	1	10
Néomycine	R	6	0	1	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I	4	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	S	115	2	0	0	7	6	1	2	0	14	31	2	3	1	10	10	1	3	2	1	3	6	1	9
Pénicilline G	R	64	1	0	0	2	2	1	0	0	2	10	0	0	1	11	10	1	3	2	1	3	4	0	10
	I	4	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	57	1	0	0	6	4	0	2	1	12	23	2	3	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	
Rifaximine	R	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	
	I	35	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	9	8	0	0	2	1	2	0	0	9	
	S	84	2	1	1	6	6	1	2	1	14	33	1	3	0	2	0	1	3	0	0	0	6	1	0
Tétracycline	R	44	0	0	1	3	2	1	1	1	4	11	0	0	0	4	1	0	0	1	0	2	2	0	10
	I	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	S	79	2	1	2	4	4	0	1	0	10	22	2	3	1	7	9	1	3	1	1	1	3	1	0
Tiamuline	R	52	0	1	3	2	1	0	0	0	1	5	0	1	1	11	10	0	1	1	1	3	0	0	10
	I	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	S	72	2	0	0	6	5	1	2	1	13	28	1	2	0	0	0	1	2	1	0	0	6	1	0
Tilmicosine	R	44	0	0	0	3	1	0	0	0	1	0	1	1	11	10	0	0	1	1	3	1	0	10	
	I	8	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	
	S	73	2	0	0	5	5	1	2	1	14	32	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	5	1	0
Tulathromycine	R	21	0	0	0	1	2	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	10	
	I	16	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	3	9	0	0	1	0	1	0	0	0	
	S	88	2	1	3	6	4	1	1	0	14	31	2	3	0	8	1	1	1	0	1	1	6	1	0
Tylosine	R	51	0	0	0	3	2	0	0	0	1	1	0	1	11	10	0	1	2	1	2	6	0	10	
	I	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
	S	72	2	1	3	5	4	1	2	1	14	32	1	3	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	

Annexe 7. Quantité de souches résistantes (R), sensibles (S) et de cas intermédiaires (I) pour chaque antibiotique ainsi que les proportions de souches inhibées pour une concentration appliquée

Antibiotiques	Quantité de souches vs sensibilité		Proportion (%) de souches inhibées en fonction de la CMI (mg/mL)						
			0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
Pénicilline G	R	64	2,94	6,30	13,45	14,29	38,66	21,85	2,52
	I	4	25,00	0,00	0,00	0,00	37,50	37,50	0,00
	S	57	3,54	16,81	17,26	12,39	33,19	15,04	1,77
Cloxacilline	R	61	3,13	1,79	7,59	12,50	45,54	28,57	0,89
	S	64	4,69	19,14	21,09	13,28	27,73	10,94	3,13
Amoxicilline	R	43	1,79	13,10	13,69	10,71	33,93	24,40	2,38
	I	14	0,00	0,00	0,00	14,58	56,25	29,17	0,00
	S	68	6,06	11,74	18,18	14,02	33,71	14,02	2,27
Céfazoline	R	24	0,00	0,00	8,70	10,87	47,83	32,61	0,00
	I	7	15,38	0,00	0,00	15,38	30,77	30,77	7,69
	S	94	4,14	14,64	17,40	13,26	33,43	14,92	2,21
Céfoxitine	R	23	0,00	0,00	13,04	8,70	43,48	34,78	0,00
	I	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00
	S	101	4,92	13,73	15,28	13,99	34,46	15,03	2,59
Enrofloxacin	R	1	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	I	2	0,00	0,00	50,00	25,00	25,00	0,00	0,00
	S	122	3,21	11,32	14,32	12,82	36,54	19,66	2,14
Florfenicol	R	10	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00
	S	115	4,32	12,05	16,14	14,09	34,77	16,36	2,27
Néomycine	R	6	16,67	0,00	0,00	8,33	50,00	25,00	0,00
	I	4	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	81,25	12,50
	S	115	3,41	12,05	16,14	13,64	36,36	16,59	1,82
Marbofloxacin	R	2	50,00	0,00	50,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	I	1	0,00	0,00	0,00	50,00	50,00	0,00	0,00
	S	122	3,21	11,32	14,32	12,82	36,54	19,66	2,14
Rifaximine	R	6	0,00	0,00	0,00	45,45	27,27	27,27	0,00
	I	35	2,21	2,94	9,56	11,03	42,65	31,62	0,00
	S	84	4,97	15,22	18,01	11,49	33,85	13,35	3,11
Tétracycline	R	44	4,82	12,05	7,23	7,83	33,73	29,52	4,82
	I	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00
	S	79	3,57	10,71	19,16	15,91	37,99	12,01	0,65
Tiamuline	R	52	3,54	3,03	9,60	13,64	41,41	27,78	1,01
	I	1	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
	S	72	4,32	16,91	18,71	11,15	32,73	13,31	2,88
Tylosine	R	51	1,60	2,13	6,91	14,89	48,94	24,47	1,06
	I	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00
	S	72	5,59	17,13	20,28	11,89	28,32	13,99	2,80
Tilmicosine	R	44	1,83	2,44	5,49	13,41	45,73	29,88	1,22
	I	8	13,33	0,00	0,00	16,67	50,00	20,00	0,00
	S	73	4,20	17,13	21,68	12,24	29,02	12,94	2,80
Tulathromycine	R	21	0,00	3,66	7,32	14,63	47,56	26,83	0,00
	I	16	4,69	6,25	7,81	23,44	40,63	17,19	0,00
	S	88	4,79	13,77	17,96	10,48	32,34	17,66	2,99

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications :

Vinet J., Tréguier S., Lessasseur-Garcia C., Calmon A., Violleau F. 2020. “Iodine and peroxide index rapid determination by MIR and NIR spectroscopy in ozonated sunflower oil and ozonated fats compounds.” Soumise à Ozone: Science&Engineering.

Vinet J., Calmon A., Violleau F. 2021. “Ozonation of sunflower oil with added water and nonanoic acid: Impact on iodine and peroxide indices determined by Design of Experiments.” Soumise à Ozone: Science&Engineering

Communication orale :

Vinet J., Moureu S., Pierron R., Calmon A., Violleau F. 2019. “Ozonation of sunflower oils: properties, purification and application.” IOA & IUVA 2019 World Congress à Nice (France) du 21 au 25 Octobre 2019.

Communication par voie d’affiche :

Vinet J., Calmon A., Violleau F. 2019. “Optimisation de la synthèse d’huile végétale ozonée pour une application antibactérienne contre les mammites.” Journées de l’Ecole Doctorale Sciences De la Matière à Toulouse (France) du 16 au 17 Mai 2019.