

République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Mouloud MAMMERRI
Faculté des sciences biologiques et sciences agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie
option Microbiologie appliquée

Thème

**Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus fontanessi*, de
Mentha spicata et de *Mentha pulegium* sur deux souches de *Pseudomonas*.**

Application sur la soupe de poisson

Présenté par : BENMESSAOUD Amel

CHABANE CHAOUCH Fatima Zohra

Devant le jury composé par :

Président : M^r SADOUDI.R

Maitre de conférence UMMTO

Promotrice : M^{elle} OUSSAID. S

Maitre assistante UMMTO

Examineur : M^{me} HELLAL.Z

Maitre assistante UMMTO

Examineur : M^{elle} BENAHMED DJILLALIA

Maitre de conférence UMMTO

Année universitaire : 2014-2015

Résumé :

Nous avons abordé dans ce travail à l'étude des trois plantes médicinales suivantes: *Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*. L'extraction de ces huiles a été réalisé par la méthode d'hydrodistillation, et l'évaluation de leur activité antibactérienne sur deux bactéries pathogènes : *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

Le rendement en huiles essentielles De *T. fontanesii* 4,90% par contre on note un rendement plus inférieur dans le cas de *Mentha Spicata* et *Mentha pulegium* qui est respectivement de 1.76%, 1.37%.

L'HE de *Thymus Fontanesii* avait un effet antibactérien plus remarquable par rapport aux deux autre huiles, ainsi que les *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 on montré une certaine sensibilité vis-à-vis nos huile par contre les *Pseudomonas Sp* ont révélé une résistante.

Une étude sur la qualité biologique de la soupe de poisson on la combinant avec l'HE de *Thymus Fontanesii* vu son effet antibactérien considérable, à montré que le développement microbien dans l'aliment est plus faible en le comparant avec un témoin positif.

Mots-clés : *Thymus fontanesii*, *Mentha Spicata*, *Mentha pulegium*, Huile essentielle, hydrodistillation , Activité antibactérienne, CMI , CMB, matrice alimentaire.

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'intervention consciente, d'un grand nombre de personnes, Nous souhaitons ici les en remercier.

En premier lieu, Nous remercions notre encadreur M^{lle} OUSSAID S. pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes
Moments les plus difficiles.*

*A mes parents pour leur amour et leur support
continu*

*A mes sœurs, frères. Et toute ma famille
Que ce travail soit le témoignage sincère et
affectueux*

*De ma profonde reconnaissance pour tout ce que
vous avez
Fait pour moi.*

*Je tiens aussi à dédier ce travail et remercier du fond du coeur, à
ma grande mère, mon oncle mahmoud, Hannene, Samira, Nawel,
Aziz et Omar qui m'ont beaucoup aidé et orienté.*

*À mon fiancé Nassim qui a toujours été à
mes cotés*



Amel



*A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes
Moments les plus difficiles.*

*A mes parents pour leur amour et leur support
continu*

*A mes sœurs et frères. Et toute ma famille
Que ce travail soit le témoignage sincère et
affectueux*

*De ma profonde reconnaissance pour tout ce que
vous avez*

Fait pour moi.

*Je tiens aussi à dédier ce travail et remercier du fond du coeur, à
Nawel, Soumia, Kader, Younes, Saad et Billal*



Fatima

Sommaire

Liste abrégées

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....	1
1 ^{ère} partie :.....	3
Synthèse bibliographique.....	3
1. Les huiles essentielles	4
1.1. Définition :.....	4
1.2. Historique :.....	5
1.3. Localisation des huiles essentielles	5
1.4. Les propriétés physiques-chimiques des HE	6
1.5. Composition chimique des huiles essentielles.....	6
1.5.1. Les terpènes.....	7
1.5.2. Les composés aromatiques :.....	7
1.6. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles :.	8
1.6.1. Facteurs intrinsèques :.....	8
1.6.2. Facteurs extrinsèques :.....	9
1.7. Les méthodes d'extraction des HEs.....	9
1.7.1. Hydrodistillation :.....	9
1.7.2. Entraînement à la vapeur d'eau :.....	10
1.7.3. Extraction par micro-ondes :.....	10
1.7.4. Extractions par solvant organique (Soxhlet) :.....	11
1.7.5. Extraction par enfleurage :.....	12
1.8. Toxicité des huiles essentielles :.....	12
1.9. Domaines d'utilisation :.....	13
1.10. Conservation des huiles essentielles :.....	13
1.11. Les propriétés biologiques des huiles essentielles.....	14
1.11.1. Activité antibactérienne.....	14
1.11.2. Activité antifongique.....	15
1.11.3. Activité antivirales.....	15
1.11.4. Activité antiparasitaire.....	16

Sommaire

1.11.5. Autres activités	16
1.11.5.1. Activité antioxydante.....	16
1.11.5.2. Activité anti-inflammatoire	16
2. Généralités sur le Thym et la Menthe	17
2.1. Le Thym (<i>Thymus fontanesii</i>)	17
2.1.1 Description	17
2.1.2 Classification botanique du thym	18
2.1.3 Répartition	18
2.1.4 Domaine d'application	18
2.2. La menthe verte (<i>Mentha spicata</i>).....	19
2.2.1. Description	19
2.2.2. Classification botanique	19
2.2.3. Répartition	19
2.2.4. Domaine d'application :	20
2.3. La Menthe pouliot <i>Mentha pulegium L.</i> :.....	20
2.3.1. Description :	20
2.3.2. Nomenclature et taxonomie :.....	20
2.3.3. Répartition :	21
2.3.4. Domaine d'application :	21
3. Les psychrophiles et les produits de la pêche.....	22
3.1. Les psychrophiles.....	22
3.1.1. Généralités :.....	22
3.1.2. Historique	22
3.2. Adaptation au froid	23
3.3. Les produits de pêches	23
3.3.1. Altération des produits de pêches.....	24
3.4. Généralité sur le genre <i>Pseudomonas</i>	24
2 ^{ème} partie.....	25
Etude Expérimentale	25
1. Matériel et méthode.....	26
1.1. Matériel végétal	26
1.1.1. Récolte des plantes	26
1.1.2. Séchage des plantes	26
1.2. Souches bactériennes testées	26

Sommaire

1.3.	Evaluation de la qualité microbiologique des produits de la pêche.....	27
1.3.1.	Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales	27
1.3.2.	Recherche et dénombrement des différents germes	27
1.4.	Détermination de la teneur des trois plantes en huiles essentielles	29
1.4.1.	Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	29
1.4.2.	Décantation :.....	30
1.4.3.	Détermination du rendement des huiles essentielles extraites.....	30
1.5.	Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles.....	31
1.5.1.	Préparations des suspensions bactériennes :.....	31
1.5.2.	Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes).....	31
1.5.3.	Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme :.....	32
1.5.4.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	32
1.5.5.	Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide	32
1.5.6.	Etude de l'effet des différentes combinaisons des HEs sur les bactéries	33
1.6.	Activité antimicrobienne des H.E. de <i>Thymus fontanesii</i> en présence de <i>Pseudomonas</i> inoculé dans la soupe de poisson :.....	33
1.6.1.	Analyse microbiologiques	34
I.	Résultats des analyses microbiologiques des produits de la pêche	35
I.1.	Recherche et dénombrement	35
II.	L'activité antibactérienne	Erreur ! Signet non défini.
II.1.	Rendement en huile essentielle des plantes aromatiques	38
II.2.	Effet antimicrobien des huiles essentielles	38
II.2.	Résultat du test de sensibilité de <i>Pseudomonas Sp</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>ATCC27853</i> vis-à-vis <i>T. fontanesii</i>	39
III.	Sensibilité aux antibiotiques.....	43
IV.	Détermination des la CMI et la CMBs :	44
V.1.	<i>Pseudomonas Sp</i> :.....	44
V.2.	<i>P. aeruginosa</i> AATCC:	44
V.3.	Le rapport CMB/CMI	45
V.	Combinaison des huiles essentielles.....	47
VI.	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> appliquée sur la soupe de poisson.....	51
	Conclusion générale	53

Référence bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

BN : bouillon nutritif

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

DL₅₀ : Dose Létale à 50%.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DZI : diamètre de zone d'inhibition

HE : Huile Essentielle.

MH: Mueller Hinton.

MRS: Géloses de man Rogosa Sharpe

OMS : organisation mondiale de la santé

PCA: Plate count Agar.

P. earuginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

SM : solution mère.

UFC : Unité Formant des Colonies.

VRBL: Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

VRBG: gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de quelques monoterpènes	7
Figure 2 : Structure de la molécule d'isoprène.....	7
Figure 3 : Exemples de quelques sesquiterpènes	7
Figure 4 : Exemples de composés aromatiques.....	8
Figure 5 : Entraînement à la vapeur d'eau.....	10
Figure 6 : le montage d'extraction par micro-ondes	11
Figure 7 : Schéma de l'extracteur Soxhlet	12
Figure 8 : Appareillage utilisé au cours du procédé de l'hydrodistillation.....	30
Figure 9 : Rendement en HES de <i>Thymus fontanesii</i> , <i>Mentha Spicata</i> et <i>Mentha pulegium</i>	38
Figure 10 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues par l'HE de <i>T. fontanesii</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Mentha pulegium</i> sur les souches testées <i>Pseudomonas Sp</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	39
Figure 11 : effet de l'HE de <i>T. fontanesii</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	40
Figure 12 : effet de l'HE de <i>T. fontanesii</i> sur <i>Pseudomonas SP</i>	40
Figure 13: effet des ATB sur <i>Pseudomonas SP</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	43
Figure 14 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues par les antibiotiques testés sur <i>Pseudomonas Sp</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	44
Figure 15: représentation graphique des résultants du test de sensibilité de <i>pseudomonas Sp</i> vis à vis les différentes combinaisons des huiles essentielles.....	49
Figure 16 : résultat de la combinaison de 50% de l'HE de <i>thymus</i> avec 50 de la Menthe verte.....	49
Figure 17: représentation graphique des résultants du test de sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 vis à vis les différentes combinaisons des huiles essentielles.....	50
Figure 18 : Effet inhibiteur de H.E de t <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 inoculée dans la soupe de poisson pendant un stockage à 4 C	51
Figure 19 : Effet inhibiteur de H.E de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis les <i>pseudomonas Sp</i> inoculée dans la soupe de poisson pendant un stockage à 4 C.....	52

Liste des tableaux :

Tableau I : les différents combinaisons des l'huiles essentielles testées.	33
Tableau II : Les résultats des analyses microbiologiques des huit produits	36
Tableau III : pourcentage de la CMI et CMB des trois huiles essentielles sur <i>Pseudomonas Sp.</i>	44
Tableau IV : pourcentage de la CMI et CMB des trois huiles essentielles sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	44
Tableau V : Rapport CMB/CMI de l'HE de <i>T. fontanesii</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Mentha pulegium</i> sur les souches testées.....	46
Tableau VI : photos montrant le résultat des CMB sur les souches testées	47

Introduction générale

Les produits de la mer sont parmi les aliments les plus fragiles dont les qualités microbiologiques et organoleptiques se modifient rapidement après la capture, pour cela ces produits doivent être immédiatement conservés à froid (-2°C à 0°C). La congélation freine la multiplication des germes dangereux et agents responsables d'altération des produits. Mais, les psychrophiles et psychotropes peuvent facilement se trouver dans les produits congelés

Ainsi, beaucoup de techniques sont également utilisées pour conserver les poissons tels que l'addition d'additifs alimentaires, d'alcool et de vinaigre,

Actuellement l'homme s'intéresse beaucoup plus aux méthodes naturelles pour la conservation des aliments. Il s'est orienté vers la recherche de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (BOUHDID et al., 2001).

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans le processus de la lutte contre les maladies infectieuses (EL KALAMOUNI, 2010). Ainsi, les caractères antiseptiques ou antifongiques de nombreuses plantes sont maintes fois décrites; elles sont utilisées soit sous forme de plantes entières, soit sous forme d'extrait hydro-distillé ; les huiles essentielles (RAMANOELINA et al., 1987).

En aromathérapie et en industrie alimentaire différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles (BOUHDID et al., 2001).

C'est dans ce contexte que nous avons mené cette étude afin de valoriser les plantes médicinales algériennes en étudiant l'activité antibactérienne de trois plantes : *Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium L.*, pour cela nous avons effectué :

- Evaluation de la qualité microbiologique des produits de la pêche.
- Des extractions des HE par la méthode d'hydro-distillation ;
- Détermination de rendement en HE ;

Introduction générale

- Evaluation de l'effet antibactérien des HE de ces trois plantes contre deux souches bactériennes pathogènes : *pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. avec la méthode de diffusion de disque sur gélose ;
- Détermination de la CMI et la CMB des HE.
- Evaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles contre les bactéries testées sur une matrice alimentaire (soupe de poisson).

1^{ere} partie :

Synthèse bibliographique.

Chapitre I

Les Huiles essentielles

1. Les huiles essentielles

1.1. Définition

Les huiles essentielles (HEs) sont des complexes naturels de molécules volatiles, hydrophobes et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices qui les emmagasinent dans des poches spécifiques au niveau de certains organes de plantes aromatiques (LAHLOU, 2004 a).

Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée (PADRINI et LUCHERONI, 1996).

La norme AFNOR NFT 75-006 (février, 1998) in (BRUNETON, 1999) a défini l'huile essentielle comme un : « produit obtenu à partir d'une matière première Végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés physiques »

Certains auteurs définissent les huiles essentielles comme des mélanges de divers composés avec une proportion d'eau issue de la distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être généralisée aux huiles essentielles obtenues par expression à froid de l'écorce ou du zeste des fruits de citrus, et ce suivant l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour délivrer le produit libéré des alvéoles oléifères (GAARNERO, 1998).

Selon (DUQUENOIS, 1979), il n'existe pas de définition standard ou exacte pour l'huile essentielle ;, « la notion d'huile essentielle peut différencier ou dépendre des déclarations des professionnels tels que les botanistes, les industriels, les parfumeurs ou les pharmacologues ».

En plus des huiles essentielles naturelles, il y a des huiles artificielles ou synthétiques. Les imitations sont parfois parfaites comme odeur mais les corps composants sont Habituellement fort différents du produit naturel végétal. Leur emploi est souvent destiné à la Parfumerie, à la droguerie, à l'industrie, mais rarement à la thérapeutique, qui pour usage interne ou externe, n'est pratiquement faite qu'avec des essences extraites des végétaux (BERNADET, 2000).

1.2. Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (BASER et BUCHBAUER, 2010).

Utilisées à des fins diverses depuis des millénaires, les plantes aromatiques ont toujours été tenues en haute estime par les thérapeutes du monde entier. D'abord (KABERA NZEYUMWAMI, 2004). L'homme se servit des plantes entières pour apporter soulagement et bien être (sous forme de cataplasmes, infusions, macérations, décoctions), ensuite il s'est intéressé à « détacher de son support » le principe aromatique d'une plante. Il paraît que l'Inde, la Chine et l'Égypte ont été à l'origine de la recherche (LARDRY et HABERKORN, 2007). Par la suite ils se sont focalisés dans la commercialisation et la vente de ces derniers surtout tout ce qui concerne les épices et les aromates, ainsi ils donneront une belle image aux huiles essentielles (LUCCHESI, 2005).

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie (BOUGUERRA, 2012).

1.3. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux (fleur, des écorces, des bois, des racines, des rhizomes des fruits et des graines). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation (BRUNETON, 1999).

Le stockage et la synthèse des huiles essentielles peuvent s'effectuer dans des cavités, alvéoles ou poches ou canaux sécréteur, Il arrive que ces sites consistent en formation très superficielles (GARNERO, 1991).

1.4. Rôle des huiles essentielles

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (RAI et al., 2003)

Il ya beaucoup de spéculation au sujet du « rôle » d'huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparent « utiles » ont été décrits : réduction de la compétition des

autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, protection contre la flore microbienne infectieuse par la propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par gout et effets défavorables sur le système nerveux (PORTER, 2001).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques (BELAICHE, 1979).

1.5. Les propriétés physiques-chimiques des HE

Les huiles essentielles forment un groupe très homogène (BERNARD *et al.*, 1988 ; BRUNETON, 1993). Elles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (DEGRYSE *et al.*, 2008). Elles sont très inflammables et très odorantes et liquides à température ambiante. Exposées à l'air, les huiles essentielles se volatilisent et ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de saffran, de girofle et de cannelle. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (optiquement active) (BRUNETON, 1999; RHAYOUR, 2002; DESMARES *et al.*, 2008).

Elles ont parfois un toucher gras ou huileux mais ce ne sont pas des corps gras (BERNADET, 2000).

Les huiles essentielles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Entraînables à la vapeur d'eau, elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille (RHAYOUR, 2002; BENINI, 2007; BENAYAD, 2008). Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (BRUNETON, 1999).

1.6. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et fonctions chimiques très diverses (BRUNETON, 1987). Il existe environ 3000 constituants qui ont été isolés à partir des huiles essentielles (TEUSCHER *et al.*, 2003). Ils sont inclus dans deux groupes : les terpènes et les composés aromatiques, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées (KHENAKA, 2011).

1.6.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique (Figure 1) à 5 atomes de carbone (C_5H_8). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en **monoterpènes** (Figure 2) formés des deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), les **sesquiterpènes** (Figure 3), formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), **les diterpènes**, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). **Les tétraterpènes** huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. **Les polyterpènes** (C_5H_8)_n où **n** peut-être de 9 à 30 (HELLAL, 2011).

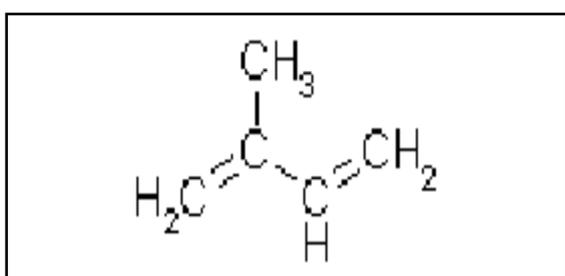


Figure 1 : Structure de la molécule d'isoprène (KHENAKA, 2011)

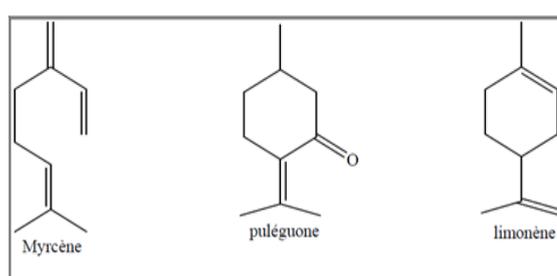


Figure 2 : Exemples de quelques monoterpènes (EL HAIB, 2011).

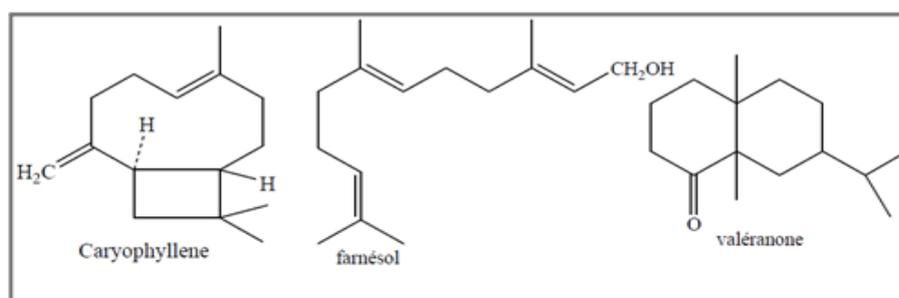


Figure 1 : Exemples de quelques sesquiterpènes (EL HAIB, 2011).

1.6.2. Les composés aromatiques

Une autre classe des composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure 4) (EL HAIB, 2011), qui empruntent une voie biosynthétique différente de celle des terpènes (MEBARKI, 2010). Et présents en quantité

beaucoup plus réduite que les terpénoïdes. Ce sont eux qui généralement confèrent aux essences leurs caractères organoleptiques (CHOSSAT, 2002).

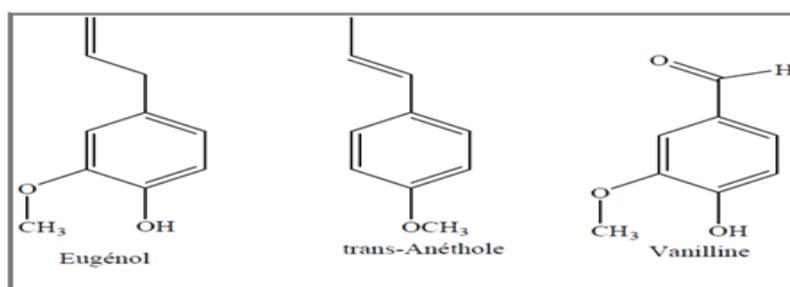


Figure 2 : Exemples de composés aromatiques (EL HAIB, 2011).

1.7. Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

1.7.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (BOUGUERRA, 2012).

Chez une même espèce, il arrive que la composition chimique de l'huile essentielle diffère d'un organe à un autre. C'est par exemple le cas de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) dont les feuilles donnent une huile riche en eugénol, les écorces fournissent un extrait où l'aldéhyde cinnamique est majoritaire, tandis que le camphre prédomine dans l'essence des racines (FIGUEREDO, 2007).

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique en huile essentielle (HIMED, 2011), les facteurs de mutation, le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques »

sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles (BOUGERRA, 2012).

1.7.2. Facteurs extrinsèques

Selon Bruneton (1999), les facteurs extrinsèques tels que les acteurs de l'environnement et des pratiques culturelles, la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe sur les structures histologiques superficielles de Stockage.

Selon Laouar (2004), l'altitude idéale pour la culture des plantes aromatiques est variable. Cependant la plupart des plantes aromatiques sont mieux adaptées à des altitudes comprises entre 800 et 1300m.

La qualité des huiles essentielles est également influencée par la météorologie au moment de la récolte, l'heure de la récolte et le stade végétatif (LAOUAR, 2001) ; Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction .D'autres facteurs tels que les traitements aux quels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (HAMEURLAINE, 2009).

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. Ils se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître (BESOMBES, 2008).

1.8. Les méthodes d'extraction des HEs

L'obtention des huiles essentielles des différentes parties de la plante se fait par différents procédés, parmi les méthodes les plus utilisées nous avons :

1.8.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation simple se base sur le principe de mettre le matériel végétal soit intact ou broyé en contact direct avec l'eau portée à ébullition. Par la suite, il y'aura condensation de

la vapeur hétérogène suite à un contact avec une surface froide, puis l'huile essentielle est différenciée de densité (BRUNETON, 1999).

1.8.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau (**figure 5**) est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans la distillation à vapeur saturée, la matière végétale n'est pas en contact avec de l'eau mais avec une vapeur qui va traverser la matière végétale disposée sur des plaques perforées. (BRUNETON, 1999).

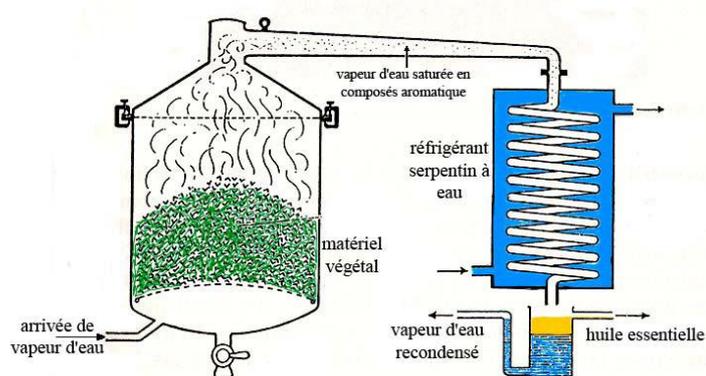


Figure 3 : Entraînement à la vapeur d'eau (LUCCHESI, 2005).

1.8.3. Extraction par micro-ondes

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation (PIOCHON, 2008).

La **figure 6** montre le montage de l'extraction par micro-onde.

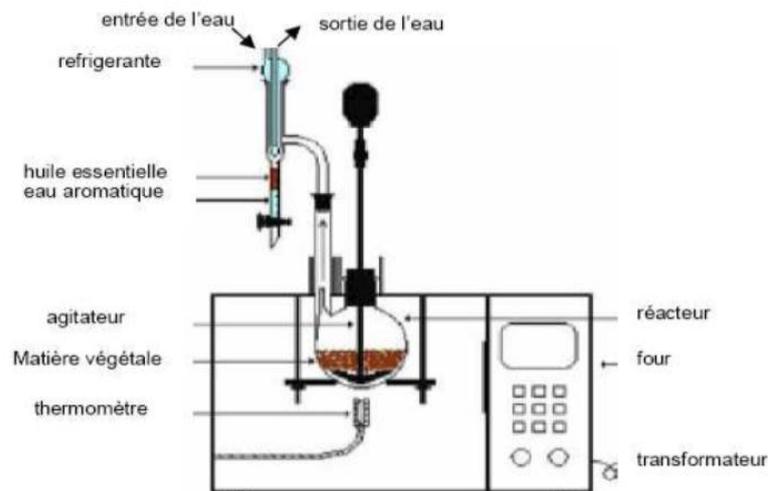


Figure 4 : le montage d'extraction par micro-ondes (HAMEURLAINE, 2009).

1.8.4. Extractions par solvant organique (Soxhlet)

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (HAMEURLAINE, 2009 ; EL HAIB, 2011).

L'extracteur de Soxhlet (**figure 7**) est une pièce de verrerie permettant d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité. L'appareil est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant (PENICHEV, 2010).

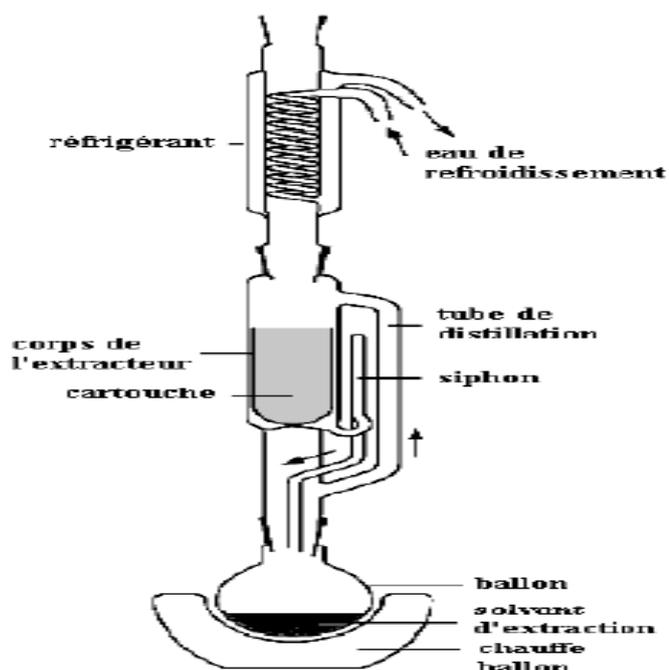


Figure 5 : Schéma de l'extracteur Soxhlet (PENICHEV, 2010).

1.8.5. Extraction par enfleurage

Elle est fondée sur l'affinité qui peut exister entre le corps gras et les huiles essentielles, en effet les HEs sont absorbées par le corps gras, ce dernier est épuisé ensuite par un solvant, qui est évaporé sous vide. Cette méthode est délicate et coûteuse (BESOMBE, 2008).

1.9. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme" (PIOCHON, 2008), certaines huiles essentielles contenant des phénols, tels que le thym, la cannelle et le clou de girofle, devraient être employées avec prudence. La toxicité du foie peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé. Les cétones contenues dans l'armoise peuvent ainsi causer ce genre de problème (HIMED, 2011).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale: une DL_{50} comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle,

lavande, etc.) ; d'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg. Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (BOUGUERRA ,2012).

Les huiles essentielles peuvent provoquer: agitation, tremblements généralisés, coma, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. Dans certains cas la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation

En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants "allyl et propénylphénols" de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers (BENZEGGOUTA, 2005).

1.10. Domaines d'utilisation

Les huiles essentielles sont utilisées dans divers activités (parfums, cosmétiques, shampooings, gel-douches, crèmes, laits, déodorants corporels, produits d'entretien : savons, détergents, lessives, assouplissants de textile), mais aussi en thérapeutiques et aromathérapie. (GIORDANI et KALOUSTIAN, 2006).

Les plantes aromatiques ont pas mal d'avantages et points. Certains extraits de plantes odoriférantes ont été approuvés à propos de leur valeur bienfaisante pour la santé. Il faut noter que ces huiles essentielles renferment un remède relaxant mais cela n'empêche pas qu'il faut être attentif et attentionnel au sujet de leurs usages (LARDRY et HABERKON, 2007).

1.11. Conservation des huiles essentielles

Elle varie selon l'huile essentielle, mais surtout en fonction de la façon dont elle a été stockée, au magasin comme chez vous (FESTY, 2008).

Du fait de la présence de fonctions chimiques réactives, les terpènes peuvent s'oxyder, lorsque l'huile essentielle est abandonnée assez longtemps, à la lumière, à l'air et à la température ambiante, ou mieux à une température élevée.

Pour éviter la formation des produits d'oxydation, notamment les peroxydes, il est nécessaire de conserver les huiles essentielles :

- A l'abri de la lumière, en présence d'un gaz inerte tel que l'azote
- A l'abri de la lumière, dans des flacons propres et secs, métalliques (aluminium ou acier inoxydable) ou en verre teinté
- A froid, de référence à + 4°C

Il faut éviter, d'une part, de mettre très peu d'huile essentielle dans le flacon et, d'autre part, d'utiliser des emballages et des bouchons en matière plastique qui peuvent être sensible au contenu (KALOUSTIAN et HADI-MINAGLOU, 2012)

1.12. Les propriétés biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et Antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, Antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (VALNET, 2005).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (LAHLOU, 2004).

1.12.1. Activité antibactérienne

Les molécules aromatiques possédant le coefficient antibactérien le plus élevé sont les phénols, ensuite viennent les aldéhydes et les cétones. Elles s'affirment par endroit supérieures aux antibiotiques classiques (GIRARD, 2010).

De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation du pouvoir antiseptique des huiles essentielles depuis très longtemps. En 1881 Koch testa l'action bactéricide de l'essence de térébenthine sur les spores du charbon. Ensuite, Chamberland (1887) étudia l'activité des essences d'origan, de cannelle et de girofle sur *Bacillus anthracis*. En 1919, Bonnaure étudia le pouvoir antiseptique des lavandes et en 1935, Bose mit en évidence les relations entre la formule chimique et le pouvoir antiseptique (BELAICHE, 1979).

Les huiles essentielles sont connues pour posséder donc l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (GACHKAR *et al.*, 2007; RASOOLI *et al.*, 2008).

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (EL KALAMOUNI, 2010 ; GUINOISEAU, 2010). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison

de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (GUINOISEAU, 2010). Selon EL KALAMOUNI (2010), l'action des HE sur la cellule bactérienne se déroule en trois phases :

- attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, la sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HEs riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne (HELLAL, 2011).

1.12.2. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (LIS BALCHIN, 2002).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés Antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, Romarin, sauge, etc... Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des Huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile (LAIB, 2010).

1.12.3. Activité antivirales

Les virus sont assez sensibles aux huiles essentielles à phénol et à monoterpénol. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales (GIRARD, 2010 ; MAYER, 2012).

1.12.4. Activité antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites. De même, les cétones et les lactones présentent une certaine toxicité (GIRARD, 2010).

1.12.5. Autres activités

1.12.5.1. Activité antioxydante

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (HUSSAIN *et al.*, 2008, 2010). Les effets Antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyles dans leur structure chimique (HUSSAIN, 2009).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des Huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande Charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des Phénomènes d'oxydation (CAILLET et LACROIX, 2007).

1.12.5.2. Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (MEBARKI ,2010).

Chapitre II

Les Plantes Médicinales

2. Généralités sur le Thym et la Menthe

La botanique a trois objets généraux : l'avantage que l'homme peut en retirer pour les progrès de son industrie ; sa nécessité pour lui procurer la subsistance ; son utilité pour le soulagement des maux qui l'affligent (JACQUE K ,2012). Les extraits des plantes étaient, déjà, connus et utilisés par les égyptiens, les romains et les grecs, pour leurs propriétés odorantes et médicinales (FELLAH et al ., 2006).

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (HE). Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires (AMARTI et al ., 2011).

Selon les statistiques de 2003 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire.

D'ailleurs la pharmacopée humaine est riche d'un répertoire de pas moins de 20000 espèces dont 50% est utilisée en industrie pharmaceutique (BALOUK et al ., 2011).

2.1. Le Thym (*Thymus fontanesii*)

2.1.1 Description

Le thym appartient à la famille des lamiacées. Originaire du bassin méditerranéen, cet arbrisseau aux nombreux rameaux serrés, est une espèce végétale vivace rustique. Il existe plus de 100 espèces du genre thymus (AÏBOUD ,2012). Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes (SOTO-MENDIVIL et al., 2006).

2.1.2 Classification botanique du thym

Selon Guignard et Dupont, (2004), la classification de genre thymus sera représentée comme suit :

- **taxon** : Trachéophytes (plantes vasculaires)
- **Embranchement** : Spermatophytes
- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicotyledones
- **Sous Classe** : Astéridées
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiacées (labiées)
- **Genre** : *Thymus*.

2.1.3 Répartition

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des Labiées (MAGHIBI F 2005). Selon Dob et al. (2006), il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya.

Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement (MEBARKI, 2010).

2.1.4 Domaine d'application

À la fois herbe magique et curative pour les Romains, il fut le remède miracle du XVI^{ième} siècle. Actuellement, l'huile essentielle de thym est utilisée pour ses vertus carminatives, antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques. Connu depuis toujours comme un antiseptique puissant, en infusion le thym peut être utilisé en bain de bouche ou en gargarisme pour lutter contre des gencives enflammées et les maux de gorges (LUCCHESI, 2005).

2.2. La menthe verte (*Mentha spicata*)

2.2.1. Description

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des labiacées (JAHANDIEZ et MARIE, 1934). Abondantes dans les régions tempérées, elles poussent facilement et peuvent même devenir très envahissante. Il existe 25 espèces de menthe. La menthe poivrée et la menthe verte sont parmi les espèces les plus courantes car elles sont très aromatiques.

La menthe verte (*Mentha spicata*), appelée aussi menthe douce, a des feuilles très odorantes, d'un vert-gris brillant, qui sont presque ronde et presque démunies de duvet. Les fleurs sont violacées (FRANCOIS, 1996).

2.2.2. Classification botanique

La classification botanique établie par Guignard et Dupont (2004) pour cette espèce

- **taxon** : Trachéophytes (plantes vasculaires)
- **Embranchement** : Spermatophytes
- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicotyledones
- **Sous Classe** : Astéridées
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiacées (labiées)
- **Genre** : *Mentha*
- **Espèce** : *Mentha Spicata*

2.2.3. Répartition

La Menthe se rencontre dans presque toutes les régions soit à l'état spontané ou cultivé (JAHANDIEZ et MARIE, 1934). Les États-Unis sont les plus gros producteurs de menthe au niveau mondial, mais il s'en produit aussi en chine, aux indes, en Australie, dans quelques pays d'Europe (France, Italie) et au Canada (LACHANCE, 2001).

En Afrique du Nord (Algérie, Maroc), l'espèce est trouvée dans beaucoup de jardins et en culture pour des buts culinaires (PERROT, 1928).

2.2.4. Domaine d'application

La menthe verte sert généralement à la préparation du thé, mais on trouve son utilisation en phytothérapie, aromathérapie, parfumerie et cosmétologie (BABA AISSA, 1999).

Des études pharmacologiques ont démontré que l'huile essentielle est utilisée surtout pour les troubles digestifs (spasme, inflammations, colites, état nauséux), contre certains parasites (acnés, dermite, démangeaisons). Elle présente un effet expectorant en cas de bronchite ou de grippe, elle est à la fois rafraichissante et analgésique (LEUNG, 1996).

L'huile essentielle de la menthe aromatise la gomme à mâcher, le chocolat, les liqueurs, Les dentifrices, les médicaments, les cigarettes et les cosmétiques (FRANCOIS, 1996).

2.3. La Menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.)

2.3.1. Description

Le nom de la menthe pouliot, *Mentha Pulegium*, dérive du latin *Pulex*, puce. En effet, la plante, très odorante, renferme une essence aromatique puissante qui fait fuir les puces (VINCENT, 2012). Elle fait partie de la sixième et la dernière série de la famille des labiées (ou lamiacées) qui renferme 4000 espèces en 200 genres, nombreuses des les pays méditerranéens dont 146 espèce en Algérie (LAHRECH, 2010).

Le pouliot à une odeur forte, aromatique, camphrée, et en quelque sorte spiritueuse. Lorsqu'on mâche cette herbe, elle procure d'abord une sensation chaude, puis on éprouve une impression de fraîcheur, comme pour les autres espèces de menthe (CHEVALLIER et al., 1828). On l'emploie dans toutes les circonstances où la menthe est convenable.

2.3.2. Nomenclature et taxonomie

D'après Quezel et Santa (1963) ; Guignard & Dupont (2004), la systématique de *Mentha pulegium* est la suivante :

- **Embranchement** : Phanérogames ou Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Eudicots
- **Sous-classe** : Astéridées

- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiacées
- **Genre** : *Mentha*
- **Espèce** : *Mentha pulegium L.*

2.3 .3. Répartition

Mentha pulegium (L.) est une plante odorante qui appartient à la famille des Lamiacées, est très répandue dans le nord de l'Europe, dans la région méditerranéenne et dans l'Asie (QUEZEL & SANTA, 1963 ; MAROTTI et al., 1994).

En Algérie *Mentha pulegium* est très abondante et pousse spontanément (QUEZEL & SANTA, 1963).

2.3.4. Domaine d'application

La menthe est considérée bénéfique pour la santé (PADRINI & LUCHERONI, 1996). Elle est plus efficace sur le foie, de plus elle calme les quintes de toux, soulage les bronches, facilite l'apparition des règles (PIERRE et LYZ., 2000). Elle est considérée autre fois comme errhine, stomachique, diurétique, ou l'employait spécialement contre l'asthme et l'hystérie ; mais son usage est de nos jours presque complètement abandonné. Cette plante entrain dans la composition d'un grand nombre de médicaments officinaux (CHEVALIER et al., 1828).

Chapitre 3

Les psychrophiles et produits de la pêche

3. Les psychrophiles et les produits de la pêche

3.1. Les psychrophiles

3.1.1. Généralités

Les psychrophiles sont des microorganismes adaptés au froid, pouvant vivre dans des environnements variés : régions arctiques, glaciers pour les températures négatives, et les océans profonds pour des températures légèrement positives (aux alentours de 4°C) etc.... Selon la classification la plus répandue (D'AMICO S et al ., 2006), les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C (MORITA, 1975).

3.1.2. Historique

La capacité de se développer au voisinage de 0°C est décrite pour la première fois par Forster en 1887 quand il isole une bactérie phosphorescente sur des poissons conservés à basse température. Par la suite, en 1892, ce même auteur isole plusieurs autres bactéries à partir de différents biotopes (eau douce, eau de mer, aliments conservés au froid, intestins de Poissons...). Schmidt (1902) propose alors le terme « psychrophile" pour désigner toutes les Bactéries pouvant se multiplier à 0°C. Un an plus tard, Müller déclenche une vaste polémique En contestant l'existence de vrais psychrophiles.

Hagen et autres chercheurs précisent que ce terme a été employé et défini de plusieurs manières et la plupart des définitions ignorent la signification étymologique du mot (MORITA, 1975), toutes ces confusions ont conduits Ingraham et Stokes à définir plus précisément que les psychrophiles sont des micro-organismes qui croissent assez rapidement à 0 °C, et à l'aide de la comparaison entre les courbes de croissance d'un *Pseudomonas* psychrophile et d'*Escherichia coli* Ingraham les a subdivisés en strictes, ou obligatoires et facultatifs (A. M. GOUNOT, 1986)

En 1975, après la confirmation de l'existence de plusieurs autres micro-organismes Incapables de se développer aux températures modérées, Morita (1975) propose de réserver le Terme « psychrophile » pour désigner uniquement les micro-organismes ayant un optimum de Croissance en dessous de 15°C et qui ne se développent pas au delà de 20°C. Il utilise le terme psychrotrophe pour désigner les micro-organismes qui peuvent se développer à basses

Températures et qui ont un optimum de croissance au delà de 15°C. Le terme « psychrotolérant » Est également adopté, par après, pour distinguer les espèces mésophiles qui peuvent s'acclimater aux basses températures (FELLER *et al.*, 1997).

3.2. Adaptation au froid

Les organismes vivants en milieux extrêmes ont au cours de l'évolution développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales, leurs permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale (QUERELLOU & GUEZENNEC, 2010)

L'évolution des bactéries psychrophiles est probablement due à de nombreux événements génétiques (MORITA, 1975), leur capacité de survivre et de proliférer à de basses températures implique que ces microorganismes ont surmonté les barrières principales inhérentes aux environnements froids, ces défis incluent (D'AMICO *et al.*, 2006) :

- Réduction de l'activité enzymatique.
- Diminution de la fluidité membranaire.
- Problèmes de transport des aliments et des déchets.
- Diminution du taux de transcription, de traduction et de division cellulaire.
- Dénaturation des protéines.
- Repliement des protéines inadéquat.
- Givrage intracellulaire.

3.3. Les produits de pêches

Les produits de la mer sont des aliments très fragiles, dont les qualités microbiologiques et Organoleptiques se modifient rapidement après la capture. Ces produits n'ont subi qu'une transformation légère, permettant de conserver au mieux leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques.

Ces produits sont microbiologiquement sensibles pour plusieurs raisons. Tout d'abord les différentes étapes des processus de fabrication comportent des manipulations importantes, les exposant aux contaminations. De plus les procédés n'incluent pas d'étapes Permettant d'éliminer totalement la flore microbienne (endogène ou contaminant). Ces produits sont

souvent conservés plusieurs semaines à basse température, permettant le Développement de micro-organismes psychrotrophes.

3.3.1. Altération des produits de pêches

Dès qu'un poisson meurt, il commence à s'altérer. Sa décomposition résulte de toute une série de modifications complexes provoquées par ses propres enzymes, des bactéries et des phénomènes chimiques (GRAKAM et al., 1994). La conséquence est ; une rapide altération des propriétés organoleptiques, une réduction de la valeur nutritive et la formation de substances toxiques (BOULOGNESUS-MER, 1986).

Les espèces bactériennes peuplant les poissons sont bien adaptées aux facteurs de sélection qui sont la teneur de l'eau en NaCl (espèce halophiles) et à la température ambiante (espèce *psychrophiles* et *psychrotrophes*)

Les bactéries d'altération sont des bactéries en général naturellement présentes et qui vont suite à leur développement favoriser l'altération des poissons. La peau, la carapace, le mucus, les branchies et le tractus gastro-intestinal des animaux marins renferment une flore microbienne importante, dont la composition varie avec l'espèce, mais aussi avec les paramètres environnementaux comme la qualité de l'eau, la température, la salinité, la profondeur, etc. De façon générale, on peut dire que le microbiote des poissons d'eaux tempérées est composé de bactéries à Gram négatif, psychrotolérantes appartenant Principalement aux genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Psychrobacter* et *Photobacterium*. (HUBER et al, 2004 ; WILSON et al, 2008).

3.4. Généralité sur le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines (BOSSIS et al., 2000 ; PALLERONI et MOORE, 2004 ; BOTELHO et al., 2006).

Ce sont des bactéries à Gram négatif, mobiles, non sporulantes, elles sont aérobies obligatoires et Les cellules sont en forme de bâtonnets fins. Les *Pseudomonas* ont un métabolisme chimio-organotrophe, la plupart étant saprophytes (BOSSIS et al., 2000). De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souche psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur.

2^{ème} partie

Etude Expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

1. Matériel et méthode

Le but de l'étude est l'extraction des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* *Mentha Spicata* et *Mentha pulegium* et l'évaluation de leur activité antibactérienne vis-à-vis de deux souches bactériennes psychrotrophes isolées d'espadon congelé.

L'extraction des huiles essentielles est effectuée au sein du laboratoire protection des végétaux, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie de l'Université d'Ibn Khaldoun de Tiaret. Les tests microbiologiques sont réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie, faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Récolte des plantes

Dans notre étude, nous avons utilisé trois plantes aromatiques :

- *Thymus fontanesii* a été récolté à Mechraa sfa wilaya de Tiaret, au mois d'avril.
- *Mentha Spicata* a été récoltée dans la région d'Aïn Deheb wilaya de Tiaret, au mois d'avril.
- *Mentha pulegium* a été récoltée dans la région de frenda wialaya de tiaret, au mois de mai.

Ces plantes sont identifiées par Mr Ait Hammou au niveau du laboratoire écologie végétale (Ibn kheldoun- Tiaret).

1.1.2. Séchage des plantes

Les échantillons sont débarrassés des mauvaises herbes puis séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Après séchage, la partie aérienne des plantes est récupérée pour l'utiliser dans l'extraction des huiles essentielles.

1.2. Souches bactériennes testées

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été évaluée sur deux souches Bactériennes isolées à partir des de l'espadon congelé.

1.3. Evaluation de la qualité microbiologique des produits de la pêches

Cette partie vise essentiellement la recherche des psychrophiles existant dans les produits de la pêche congelés. Huit échantillons de poissons congelés différents ont été achetés dans une supérette et transportés au laboratoire dans une glacière.

1.3.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

25 g de chaque échantillon ont été prélevés et broyés de manière aseptique. 225 ml de TSE (eau physiologique peptonnée) ont été ajoutées au broyat puis homogénéisé le mélange et filtré à l'aide d'une compresse stérile. A partir de cette suspension mère des dilutions décimales ont été effectuées.

A l'aide d'une pipette graduée, Introduire 1 mL de la SM qui correspond à la dilution 1/10 dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique. Après homogénéisation, on recommence l'opération jusqu'à la dilution 10^{-6} .

1.3.2. Recherche et dénombrement des différents germes

❖ Recherche et dénombrement de la flore psychrophile totale

Elle a été réalisée par un ensemencement en masse. 1 ml de la suspension mère et de ses dilutions décimales en duplicata ont été versés dans une boîte de pétri puis couler la gélose Plate Count Agar (PCA) en surfusion et laisser solidifier.

Les boîtes de Pétri sont incubées à 4°C pendant 10 jours. Le comptage des colonies s'effectue uniquement sur les boîtes contenant entre 10 au minimum et 300 au maximum de colonies.

❖ Recherche et dénombrement des *staphylococcus aureus*

Le *staphylococcus aureus* est un germe bactérien du genre *Staphylococcus* dont différentes souches existent, notamment le *Staphylococcus aureus* (ou staphylocoque doré). Il peut être présent dans tous les environnements mais aussi sur la peau, les muqueuses, dans le nez, et n'entraîner aucun symptôme : on dit qu'il est ubiquitaire. Il peut néanmoins également être pathogène (responsable d'une pathologie) et à l'origine d'infections diverses.

A partir de la suspension mère, on fait un ensemencement en strie à l'aide d'une anse à fil bouclé ou une pipete pasteur sur le milieu de culture Chapman. Les boîtes sont incubées à

une température de +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

❖ Recherche et dénombrement des coliformes totaux

La présence de coliformes dans les produits alimentaires indique généralement qu'il y a contamination fécale ou qu'il y a un risque sanitaire

La technique de dénombrement consiste à Transférer 1 mL de la SM et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles et faire couler la gélose VRBL (Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) et laisser solidifier. Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 10 jours. Des colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 1 mm son comptés.

❖ Recherche et dénombrement des entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif dont la plupart sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière pérétriche. Leur culture est facilement réalisée sur les milieux usuels.

Leur abondance dans l'intestin, leur mobilité, leur rapidité de multiplication, leur fréquente résistance aux antibiotiques expliquent qu'elles soient les bactéries les plus impliquées en pathologie infectieuse humaine, surtout en milieu hospitalier (GUEYUE, 2007).

La technique consiste à transférer 1 mL de la SM et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles et faire couler la gélose VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre), laissé solidifier. Les boîtes sont ensuite incubées à 4°C pendant 10 jours.

❖ Recherche et dénombrement des bactéries lactique

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes, Gram positif, généralement immobiles. Elles ont toujours occupé une place importante parmi les auxiliaires de fabrication alimentaire. .

La technique de dénombrement consiste à transférer 1 mL de la SM et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles et faire couler la gélose MRS en double couche et laisser solidifier. Les boîtes sont incubées à 4°C pendant 10 jours.

❖ Recherche et dénombrement des *Pseudomonas*

Pseudomonas est un, coccobacille, Gram (-), asporulé, oxydase (+), ne fermente pas le glucose (métabolisme respiratoire), aérobic stricte et catalase (+).

La technique de dénombrement consiste à faire couler la gélose cétrimide sur les boites de Pétri. 0,1ml de la SM et de ses dilutions ont été transférées et étalées sur la surface de la gélose. Les boites sont incubées 4°C pendant 10 jours.

❖ Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

Les streptocoques sont définis comme des cocci à Gram positif disposés, le plus souvent en chaînettes. Certains streptocoques font partie de la flore normale d'un individu, c'est-à-dire de l'ensemble des bactéries, qui vivent habituellement à l'intérieur, ou sur le corps humain (BORJAH, 2011).

La technique de dénombrement se pratique en deux étapes :

- test présomptif sur bouillon de Rothe.
- test confirmatif sur bouillon de Litsky.

On Ensemence 1ml de la suspension mère et ses dilutions dans des tubes contenant 9 ml du milieu sélectif Rothe à raison de 3 tubes par dilution, et on incube à 4°C pendant 10 jours. Les tubes présentant un trouble sont soumis au test confirmatif sur bouillon de Litsky. On prélève 2 gouttes à partir du tube positif et on ensemence le milieu Eva Litsky.

Homogénéiser parfaitement l'inoculum dans le milieu et incuber tube à 4°C pendant 10 jours. Un trouble dans le liquide signale la présence des streptocoques.

1.4. Détermination de la teneur des trois plantes en huiles essentielles

1.4.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Le matériel végétal séché est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction démontré dans la figure 8 .Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 100 g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile

essentielle passent à travers la colonne réfrigérante où aura lieu la condensation et qui sont recueillies à l'autre bout du montage.

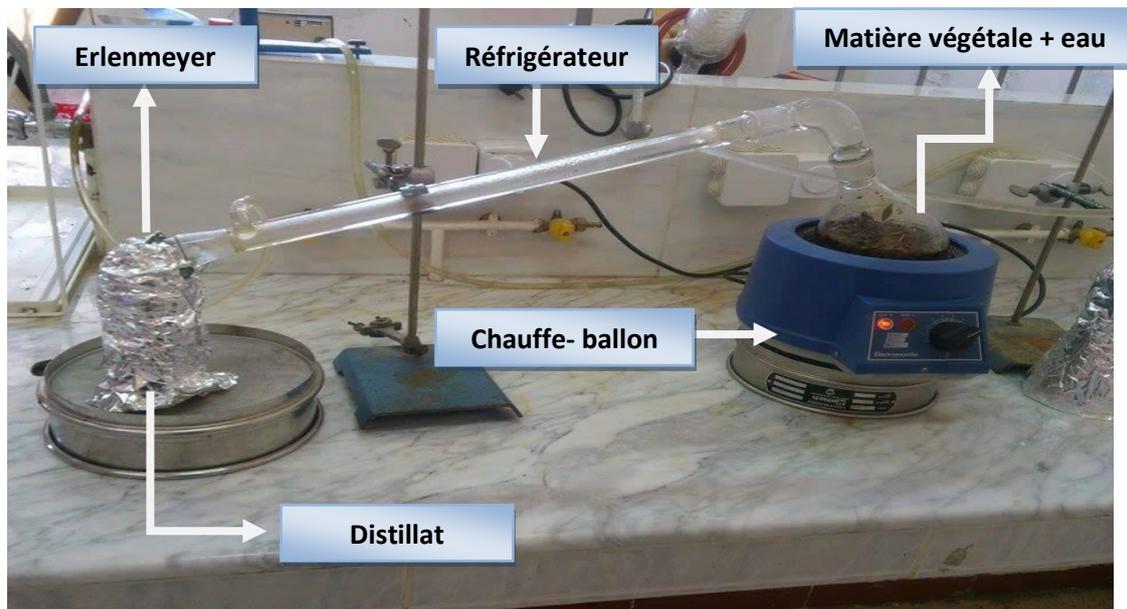


Figure 6 : Appareillage utilisé au cours du procédé de l'hydrodistillation.

Pour réaliser l'hydrodistillation à l'échelle du laboratoire, nous nous sommes basés sur quatre conditions :

- Quantité de matière végétale : 100g
- Quantité d'eau : 600ml
- Température : 100°C
- Temps d'extraction : 4h
- Pression du système : Atmosphérique

1.4.2. Décantation :

La décantation est réalisée dans une ampoule à décanter de 250 ml, dans laquelle, le mélange précédant, se sépare en deux phases non miscibles.

1.4.3. Détermination du rendement des huiles essentielles extraites

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite sur le poids sec de la matière végétale. Ce rapport permet d'estimer la production en huile essentielle des plantes (WILLIAMS et LUSUNZI, 1994)

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = (P_x / P_y) \times 100$$

R: Rendement de l'huile en pourcentage.

P_x: Poids de l'huile en gramme.

P_y: Poids de la plante en gramme.

1.5. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles

1.5.1. Préparations des suspensions bactériennes

A partir d'une boîte contenant des colonies jeunes (âgée de 18 heures) et bien isolée, 3 à 5 colonies sont prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique L'inoculum est ajusté à une densité optique entre 0,08-0,1 à 625nm, qui équivalente à 10⁷ UFC/ml.

1.5.2. Méthode de diffusion sur disques (aromatogrammes)

Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques.

Elle consiste à déposer des disques en papier absorbant sur une gélose Muller Hunton (permet une meilleure diffusion) préalablement ensemencée avec le germe cible.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, il consiste à tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer à l'intérieur du tube puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution homogène de l'inoculum.

Des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés puis déposés à la surface des boîtes ensemencées. 20 µl d'HE diluée dans du DMSO (90%) sont déposés à la surface des disques, ces derniers vont absorber progressivement l'HE jusqu'à l'imprégnation totale.

Au bout de 2 heures de diffusion à 4°C, les boîtes ensemencées sont incubées à 27°C et à pendant 24 heures pour *Pseudomonas*. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés. Ainsi qu'un témoin négatif a été réalisé par un dépôt de 20 µl de DMSO sur des disques entreposés sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie testé.

1.5.3. Test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme)

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet des HE. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélosé (Muller Hinton), préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'HE (YAKHLEF, 2010).

On a utilisé quatre antibiotiques différents : la cefoxitine [FOX³⁰], l'imipeneme [I¹⁰], la kanamycine [K³⁰] et l'oxytetracycline [O³⁰], Le choix a été fait en fonction de la disponibilité.

1.5.4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le protocole utilisé pour la détermination des CMI est celui décrit par Djenane et al., (2012) Des dilutions de demi en demi ont été effectuées dans une gamme de concentration allant de 300 µl /ml à 0,01 µl/ml de l'HE à DMSO (10%).

Les mêmes dilutions ont été réalisées pour la détermination de la CMI pour chaque HE.

- 300 µl de chacune des dilutions est ajoutés dans des eppendorf tubes contenant 285 µl de bouillon nutritif.
- L'ensemble des tubes est inoculé de 15 µl de la suspension bactériennes standardisée à 10³ germes / ml.
- Un témoin positif qui ne contient pas l'huile essentielle est réalisé (585 µl de bouillon nutritif + 15 µl de suspension bactérienne).
- Un témoin négatif qui contient 300 µl de l'huile essentielle + 300 µl de BN.
- Lecture visuelle (trouble) après 24 heures d'incubation à 27°C.

La concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu (BOUGUERRA, 2012).

1.5.5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

Pour la détermination de CMB, on ensemence à partir des préparations précédentes n'ayant pas présenté de trouble sur gélose nutritive. Toujours on fait référence à un témoin positif (585 µl de BN + 15 µl de la souche bactérienne). Une CMB correspond à la concentration minimale bactéricide.

1.5.6. Etude de l'effet des différentes combinaisons des HEs sur les bactéries

Les différentes combinaisons des HEs extraites à partir du *thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* ont été réalisées suivant le tableau ci dessus.

Tableau I : les différents combinaisons des l'huiles essentielles testées.

Test \ plante	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha pulegium</i>
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	½	½	0
5	½	0	½
6	0	½	½
7	1/3	1/3	1/3
8	1/6	1/6	4/6
9	1/6	4/6	1/6
10	4/6	1/6	1/6

1.6. Activité antimicrobienne des H.E. de *Thymus fontanesii* en présence de *Pseudomonas* inoculé dans la soupe de poisson

Nous avons annulé l'utilisation de *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* à raison de leur faible activité antibactérienne par rapport au *Tymus fontanesii*

Une soupe de poisson (soupe idéale), dont les compositions sont présentées en annexe, a été choisie comme matrice alimentaire. 13ml de la soupe de poisson est ajouté dans des tubes stériles contenant 0.8% de l'HE de *Thymus fontanesii*, le mélange est inoculé par la souche (avec une charge bactérienne de 10^4 UFC/ml).

L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur pour bien répartir la distribution de l'huile et de la bactérie à travers la soupe. Le témoin a été préparé en remplaçant l'huile essentielle par l'eau distillée stérile.

L'opération est répétée deux fois, les tubes sont ensuite conservés à 6°C pendant 5 jours

1.6.1. Analyse microbiologiques

Pour déterminer l'efficacité inhibitrice de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* appliqué à la soupe de poisson inoculé par la bactérie utilisée, des analyses microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique microbienne de chaque espèce en présence et en absence d'H.E. Toutes les analyses ont été réalisées en duplicata.

La technique consiste à suivre le développement des bactéries pendant 5 jours (J₁.J₂.J₃.J₄.J₅). 100µl sont prélevés de l'échantillon et introduit dans 5 ml d'eau physiologique stérile (solution mère). Puis on réalise des dilutions décimales à partir de la SM et on ensemence 0,1 de chaque une des dilutions sur gélose cétrimide.

Incubation à 27°C pendant 24h. La lecture est réalisée par comptage direct des colonies caractéristiques pour l'espèce.

Chapitre II

Résultat et discussion

I. Résultats des analyses microbiologiques des produits de la pêche

I.1. Recherche et dénombrement

La qualité microbiologique de huit produits de la pêche a été étudiée ;

Les boîtes retenues sont celles qui présentent un nombre de colonie compris entre 30 et 300.

Le dénombrement des bactéries est calculé par l'utilisation de la formule suivante :

$$N = (N_1 + N_2) / V[X_1 + 0,1(X_2)].d$$

Avec :

X_1 = nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

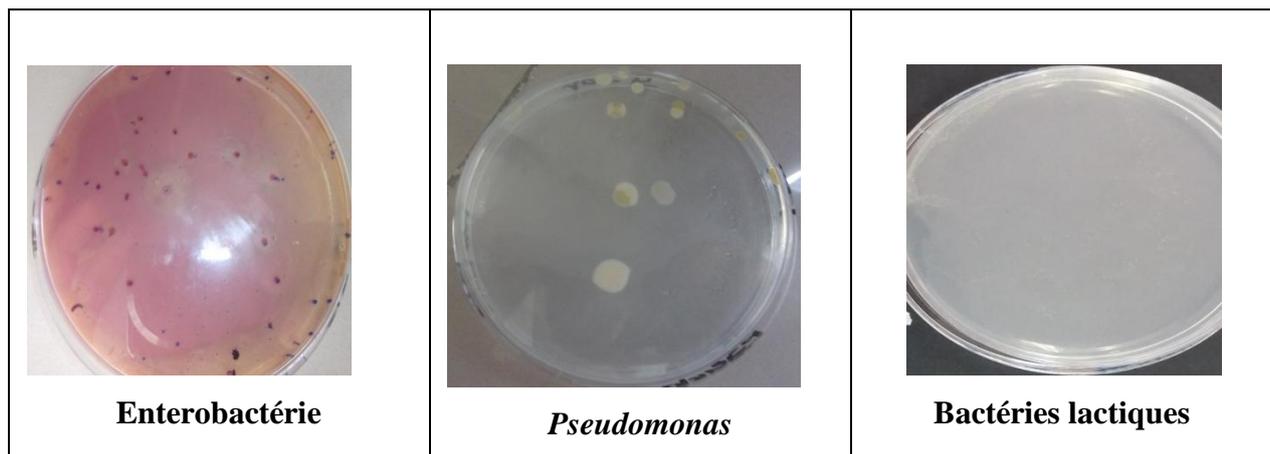
X_2 = nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

V = volume disposé ;

d = facteur de la première dilution extrême ;

N = nombre de colonies.

Les tableaux et la figure n 8 ci-dessus montrent le résultat de dénombrement des différents germes psychrophiles existant dans les produits de la pêche congelés



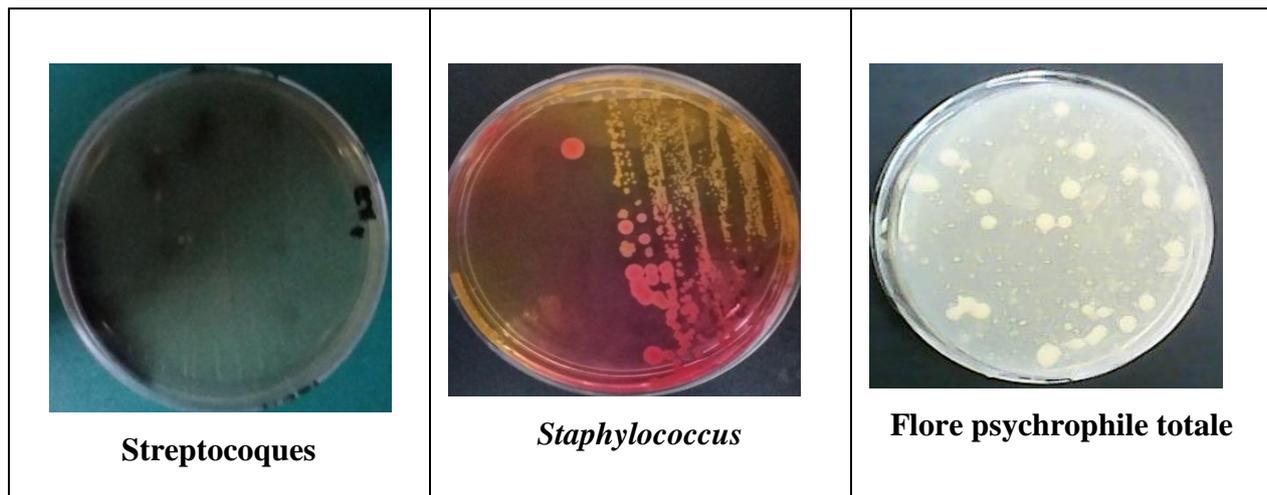


Figure 8 : Les résultats des analyses microbiologiques des huit produits

Tableau II : Les résultats des analyses microbiologiques des huit produits

	Calamar (Espagne) UFC/g	Calamar (France) UFC/g	Seiches (Inde) UFC/g	Saumon (Chine) UFC/g	Saumon (Espagne) UFC/g	Crevette (Inde) UFC/g	Crevette (Espagne) UFC/g	Chien de mer (Espagne) UFC/g
Flore psychrophile	$5,3 \cdot 10^6$	$1,39 \cdot 10^7$	$8,99 \cdot 10^6$	$1,02 \cdot 10^7$	$1,55 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$8,18 \cdot 10^5$
Coliforme totaux	$3,5 \cdot 10^6$	$7,98 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$	$1,68 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^7$	$6,38 \cdot 10^7$
Entérobactéries	$2,30 \cdot 10^6$	$4,84 \cdot 10^7$	$6,09 \cdot 10^6$	IND	$3,2 \cdot 10^7$	$1,95 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^7$	$3,23 \cdot 10^7$
Pseudomonas	$1,95 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^8$	$4,81 \cdot 10^5$	$3,09 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^8$	$5,9 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^5$
Staphylocoque	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	PRES	ABS	ABS
Bactérie lactiques	$2,7 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Streptocoques	ABS	ABS	PRE	ABS	ABS	PRE	ABS	ABS

- **La flore psychrophile totale**

D'après le tableau on remarque une variété plus au moins différente des résultats, avec des charges allant de $1,5 \cdot 10^6$ UFC/g pour l'échantillon 5 à $8,9 \cdot 10^7$ UFC /g pour l'échantillon 3.

- **Les coliformes totaux**

On marque la présence des coliformes dans tous les échantillons. La charge la plus faible est enregistrée dans l'échantillon 4 ($1,20 \cdot 10^6$).

- **Les entérobactéries**

Ces colonies qui ont un aspect violacées sur milieu VRBG sont présentes avec des charges importantes dans tous les échantillons allant de $3,09 \cdot 10^5$ à $4,84 \cdot 10^7$.

- **Les *Pseudomonas***

Les colonies présentent une pigmentation caractéristique jaune sur gélose cétrimide. Le Dénombrement montre une variété considérable des *Pseudomonas* dans les huit échantillons, la charge la plus élevée est ma chez l'échantillon 2 ($1,2 \cdot 10^8$ UFC/g).

- **Les staphylocoques**

Les résultats indiquent une absence totale des staphylocoques dans tous les échantillons testés, sauf l'échantillon 6

- **Les bactéries lactiques**

Les colonies se sont de taille uniforme avec une couleur blanchâtre, leur présence indique une acidification dans le milieu par production d'acide lactique. Les résultats montrent la présence e de ces bactéries dans l'échantillon 1et 2 avec une charge de $2,7 \cdot 10^4$ et $5,4 \cdot 10^4$ UFC /g respectivement.

- **Les Streptocoques**

L'analyse microbiologique indique l'absence des streptocoques dans tous les échantillons sauf l'échantillon 3 et 6 qui ont révélé une présence des streptococcus du groupe D (apparition d'un sédiment violet dans le milieu Listky).

II. Rendement en huile essentielle des plantes aromatiques

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation durant quatre heures. Le rendement en huile essentielle des plantes étudiées est exprimé en pourcentage massique % (m/m), et illustrés dans la figure 20.

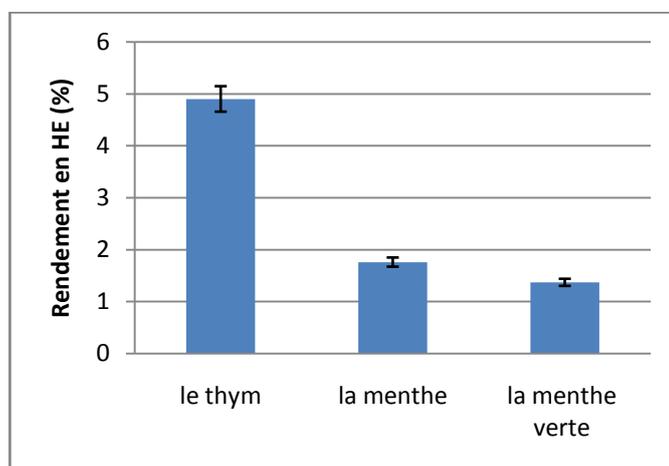


Figure 7 : Rendement en HES de *Thymus fontanesii*, *Mentha Spicata* et *Mentha pulegium*

Le rendement en HE *Thymu Fontanesii* obtenu par hydrodistillation après 4h d'extraction est de 4,90% ± 0,13. Des rendements inférieurs sont obtenus dans le cas de *Mentha Spicata* et *Mentha pulegium* qui sont de 1,76% ± 0,40, 1,37% ± 0,13 respectivement.

Haddouchi et al. (2009) ont trouvé un rendement de l'HE 2%, à partir des feuilles *T. fontanesii*, par entraînement à la vapeur d'eau. Leur résultat est nettement inférieur au notre. Toutefois, le rendement en HE de *Mentha pulegium* obtenu est inférieur à celui obtenu par Hmiri et al., (2011) qui est de 3,3% pour la même espèce végétale.

III. Effet antimicrobien des huiles essentielles

La méthode de l'aromatogramme a été utilisée dans l'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles sur deux souches bactériennes les quelles *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* AATC 27853.

L'interprétation des aromatogrammes et l'estimation de la sensibilité et/ou la résistance de nos souches a été effectuée en se basant sur l'échelle donnée par Mebarki (2010), qui classifie

la sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens par le diamètre de zone d'inhibition comme suit :

- Extrêmement sensible $D \geq 20$ mm ;
- Sensible $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$;
- Intermédiairement sensible $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$;
- Non sensible $D \leq 8\text{mm}$.

III.1. Résultat du test de sensibilité de *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* AATC 27853 vis-à-vis *T. fontanesii*

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les trois l'HEs sur les deux souches sont représentés dans la figure 10. Diamètre des disques y conclu.

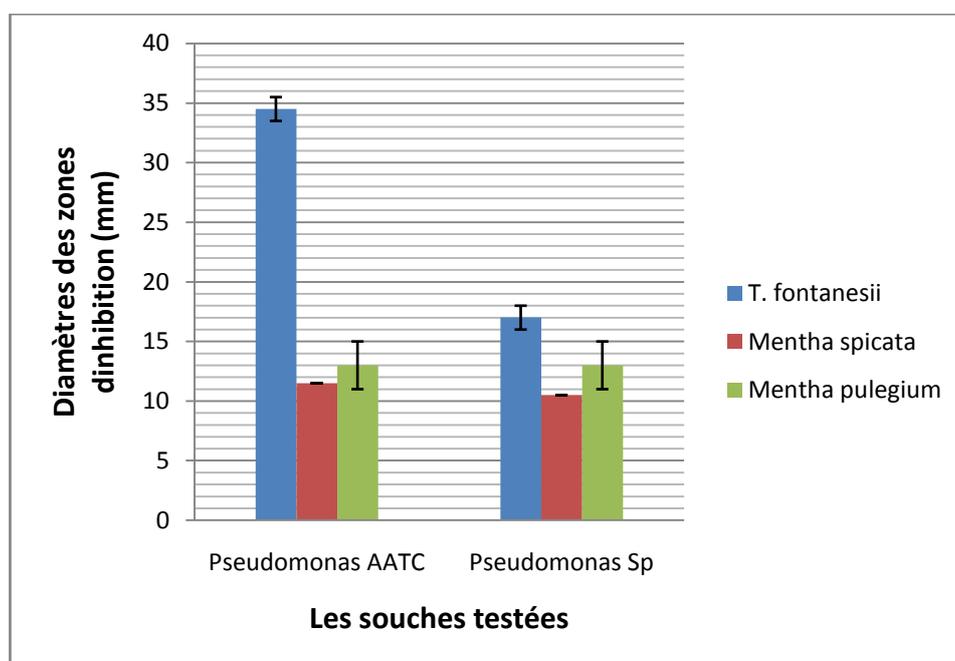


Figure 8 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues par l'HE de *T. fontanesii* de *Mentha spicata* et de *Mentha pulegium* sur les souches testées *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

D'après la figure 10, Nous remarquons que le meilleur effet inhibiteur de L'HE de *T. fontanesii* est obtenu dans le cas des *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec un diamètre de $D = 34,5$ mm, par contre *Pseudomonas Sp*. est moins sensible avec des zones d'inhibition de 17 mm.

. En se référant à la classification de la sensibilité des bactéries aux HE, faite par Mebarki (2010), on peut dire que la souche *Pseudomonas Sp* est sensible, par contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est extrêmement sensible, envers l'HE de *T. fontanesii*.

Haddouchi et al. (2009), dans leur étude sur l'activité antimicrobienne de l'HE de *T. fontanesii*, extraite par entraînement à la vapeur d'eau, ont constaté que *P. aeruginosa* possède une résistance vis-à-vis cette huile avec un DZI de 9 (mm) différents de nos résultats. Dans notre étude, Les deux souches montrent une sensibilité importante vis-à-vis L'HE de *T. fontanesii* avec un diamètre > 16. Une étude similaire faite par Mebarki, (2010) avait montré que l'effet antimicrobien de l'HE de *T. fontanesii* sur *P. aeruginosa* donne un DZI <16 mm.

Pseudomonas Sp et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont une sensibilité intermédiaire vis-à-vis de *Menta spicata* avec des diamètres de $11,5 \pm 3$ (mm) et $10,5 \pm 2$ (mm) respectivement. L'HE de *Mentha pulegium* a montré le même effet sur les deux souches bactériennes avec un DZI de 13 mm.



Figure 9 : effet de l'HE de *T. fontanesii* sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

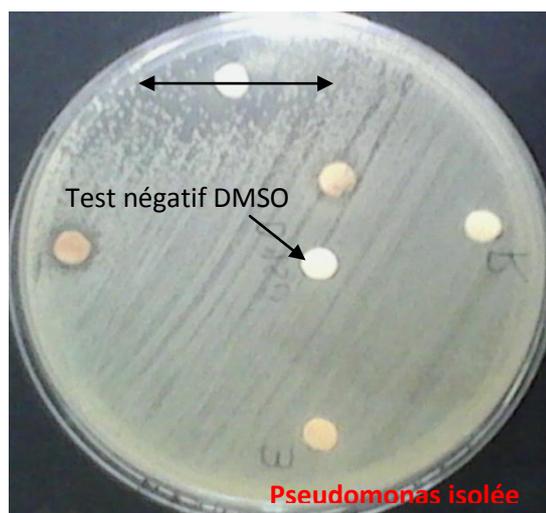


Figure 10 : effet de l'HE de *T. fontanesii* sur *Pseudomonas SP*

La différence des résultats obtenus pour les DZI des huiles essentielles des trois plantes médicinales utilisées dans cette étude par rapport à ceux trouvés dans la littérature est due à la méthode d'extraction des HE, la nature des solvants utilisés, la période de récolte et le chémotype de l'HE.

Cette activité antibactérienne des HE pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants des HE avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions (Hassania, 2012).

Selon Amarti et *al*, (2011), l'importante bioactivité des HE de thym est en relation avec sa teneur en thymol (33,02 %). Ces auteurs ont montré que les HE riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) possèdent une forte activité antimicrobienne. Les HE de *Thymus bleicherianus* et de *Thymus ciliatus*, riches en thymol (respectivement 24 et 44,2 %), ont exercé une forte activité antimicrobienne, et que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées. Ils ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne. Ou que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure.

D'après Boutineau, (2010), l'activité antibactérienne de l'HE de *Mentha spiata* pourrait être associée à sa composition en 1-carvone (55-67%)

M. pulégium est surtout riche en monoterpènes, ce qui pourrait expliquer son effet antibactérien. Zouari et al. (2010) ont montré que les monoterpènes peuvent détruire les membranes cellulaires, ce qui augmente la perméabilité de la cellule et l'inhibition de la respiration.

En effet, Ipek et al. (2005) ont attribué cette activité aux altérations des activités membranaires des cellules microbiennes, sous l'effet de certains composés des HE, cette altération est à l'origine de modification de la perméabilité cellulaire.

Andercon et al. (2006) ont montré que, les composés phénoliques des huiles essentielles par leur richesse en groupement hydroxyle (OH), ont la capacité de se complexer avec les enzymes et certains éléments minéraux (fer et cuivre) responsable de métabolisme microbien.

D'après OUSSALAH et al. (2006) les HE possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches microbiennes, mais d'une manière générale leurs actions se déroulent en trois phases :

- Attaque de la paroi cellulaire ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule microbienne.
- Destruction de matériel génétique.

IV. Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Nous avons testé l'activité de quatre antibiotiques choisis selon la disponibilité par la méthode standard des disques. Les résultats sont représentés dans la figure 13

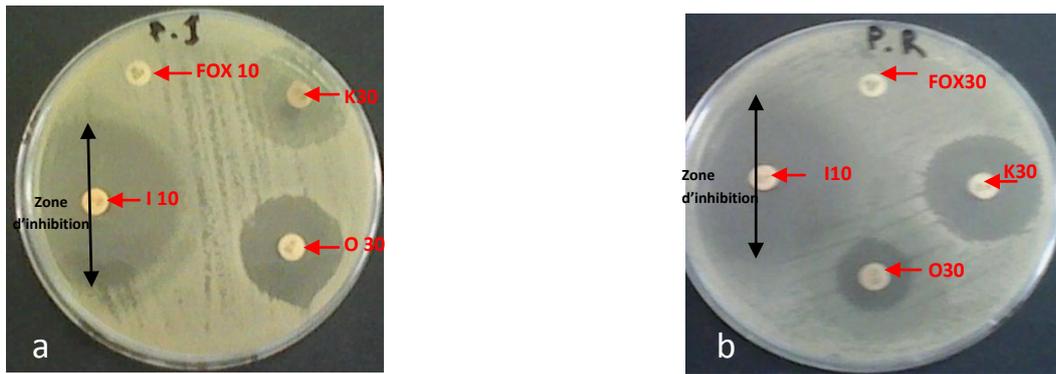


Figure 13: Effet des ATB sur les souches

a- *Pseudomonas* Sp b- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

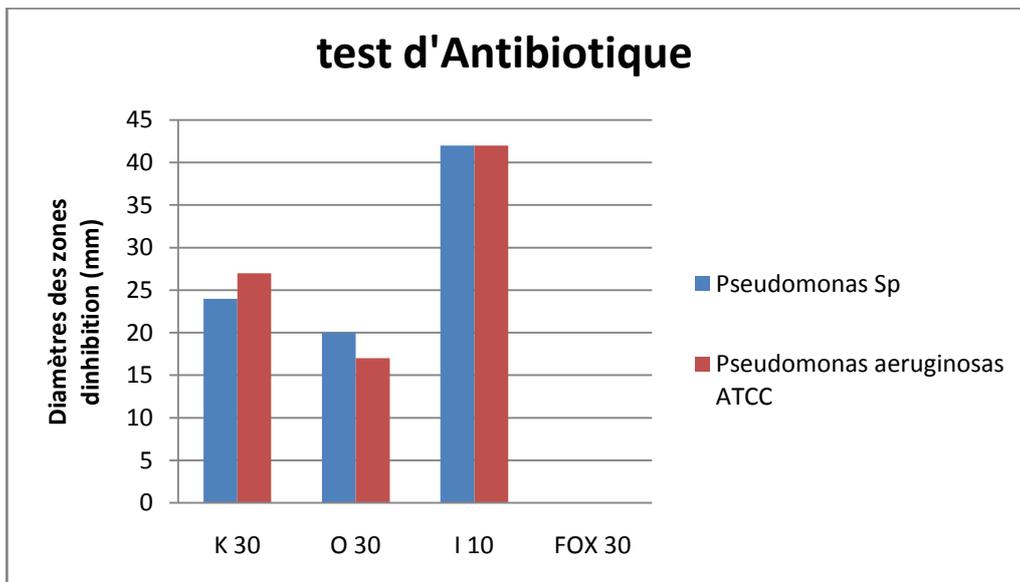


Figure 14 : Diamètre des zones d'inhibitions obtenues par les antibiotiques testés sur *Pseudomonas* Sp et *P. aeruginosa* ATCC 27853

D'après l'histogramme représenté dans la figure 14 nous constatons que les souches bactériennes réagissent différemment aux antibiotiques testés, les souches présentent des zones supérieures à 14mm cela explique leur sensibilité à k30; O30; I10. En revanche, fox30 n'exprime aucune activité sur les deux souches testées.

V. Détermination des la CMI et la CMBs :

Des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles

Les résultats de la CMI et CMB sont représentés dans les tableaux 3 et 4

V. 1. *Pseudomonas Sp* :

Tableau III : pourcentage de la CMI et CMB des trois huiles essentielles sur *Pseudomonas Sp*

L'HE	CMI%	CMB%
<i>Thymus fontanesii</i>	1.56	1.56
<i>Mentha Spicata</i>	0.04	0.19
<i>Mentha pulegium</i>	6.25	6.25

V. 2. *P. aeruginosa* ATCC27853:

Tableau IV : pourcentage de la CMI et CMB des trois huiles essentielles sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

L'HE	CMI%	CMB%
<i>Thymus fontanesii</i>	0.19	1.56
<i>Mentha Spicata</i>	6.25	6.25
<i>Mentha pulegium</i>	6.25	12.5

Dans le cas de *Pseudomonas Sp*. les résultats de la diffusion sur gélose ont montré que parmi les trois huiles essentielles testées, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est caractérisée par la faible activité par rapport aux autres huiles. L'HE de *Thymus fontanesii* a montré un effet inhibiteur à la dilution de 1,56%, ce qui correspond à une concentration équivalente à 9.37 µl/ml, par contre pour l'HE de *Mentha pulegium* l'effet inhibiteur a été observé à la dilution de 6,25% correspondant à la concentration de 37.5 µl/ml. D'après les CMI obtenues l'HE de *Mentha Spicata* a montré une meilleure performance antibactérienne avec une concentration de 0.29 µl/ml par rapport à l'HE de *Thymus fontanesii*.

Pour les *Pseudomonas aeruginosa*, l'HE de *T. fontanesii* a exercé une importante activité inhibitrice à partir de 1.17 µl/ml. Par contre, dans ce cas les *Pseudomonas Sp* ont manifesté une certaine résistance vis à vis l'HE de *Mentha Spicata* avec une concentration minimale inhibitrice de 37.54 µl/ml. L'HE de *Mentha pulegium* a toujours avec un effet inhibiteur moins considérable par rapport au *T. fontanesii*.

Une concentration minimale inhibitrice de 1% a été obtenue sur *P. aeruginosa* avec l'HE de *T. fontanesii* par (Mebarki ,2010).

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis de déterminer les concentrations minimales bactéricides (CMB) sur les deux souches bactériennes testées.

La concentration minimale bactéricide est souvent égale ou plus élevée que la CMI. Sur toutes les HEs testées, la valeur de CMB est superposable à la valeur de CMI pour les *pseudomonas Sp* qui montre une sensibilité importante avec une CMB égale à 0.19%, tandis que *P. aeruginosa* ATCC était la plus résistante avec la plus haute CMB (12.5%).

V. 3 Le rapport CMB/CMI

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4, l'HE est bactéricide. Quand ce rapport est supérieur à 4, l'HE est dite bactériostatique (Mebarki, 2010).

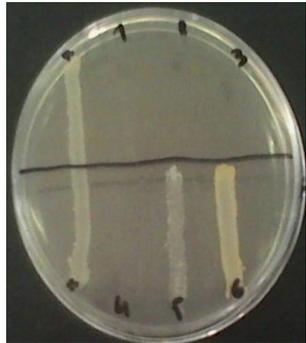
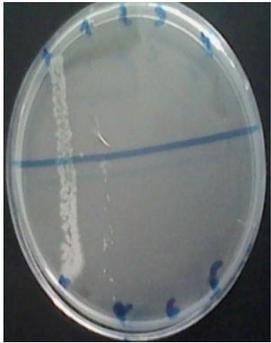
Tableau V : Rapport CMB/CMI de l'HE de *T. fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* sur les souches testées.

Souches	<i>T. fontanesii</i> CMB/CMI	<i>Mentha spicata</i> CMB/CMI	<i>Mentha pulegium</i> CMB/CMI
<i>Pseudomonas Sp</i>	1	4.75	1
Interprétation	Bactéricide	Bactériostatique	Bactéricide
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8.21	1	2
Interprétation	Bactériostatique	Bactéricide	Bactéricide

D'après le tableau V, on peut dire que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a un effet bactéricide contre toutes les bactéries testées. Ce qui explique leur application aux produits pharmaceutiques.

Les résultats de la CMB testé sur *P. aeruginosa* de Mebarki, (2010) sont presque identiques à nos résultats pour le *T. fontanesii* qui sont de 1%.

Tableau VI : photos montrant le résultat des CMB sur les deux souches testées

	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Thymus fontanesii</i>
<i>Pseudomonas Sp</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			

VI. Combinaison des huiles essentielles

Selon Younes et *al.* (2012), l'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à un effet synergique ou antagoniste entre plusieurs composés majoritaires et minoritaires de ces HE.

Afin d'étudier l'effet synergétique des huiles essentielles et leur activités antibactériennes, des combinaisons ont été effectuées avec des concentrations différentes des trois huiles testées.

Le tableau suivant montre les différentes combinaisons des huiles essentielles et leur effet sur les deux souches testées.

Tableau VII: les différentes combinaisons des huiles essentielles testées

- Test 4: 50 % *Thymus fontanesii* + 50% *Mentha spicata* + 0% *Mentha pulegium*.
- Test 5: 50% *Thymus fontanesii* + 0 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.
- Test 6: 0% *Thymus fontanesii* + 50 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*
- Test 7: 33.3% *Thymus fontanesii* + 33.3 % *Mentha spicata* + 33.3% *Mentha pulegium*.
- Test 8: 25% *Thymus fontanesii* + 25 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*
- Test 9: 50% *Thymus fontanesii* + 0 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.
- Test 10: 50% *Thymus fontanesii* + 50 % *Mentha spicata* + 25% *Mentha pulegium*

Les effets antimicrobiens des associations d'H.E, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définis selon quatre interactions possibles:

- **Indifférence:** l'activité d'une H.E. n'est pas affectée par l'autre.
- **Addition:** l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque H.E.
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque H.E.
- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des H.E.

L'effet de la combinaison sur *Pseudomonas Sp.*

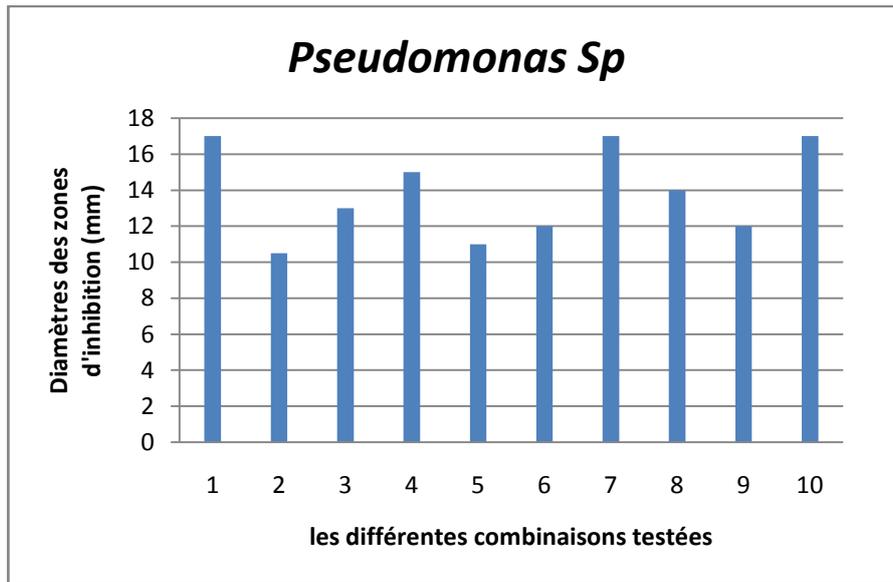


Figure 15: représentation graphique des résultats du test de sensibilité de *Pseudomonas Sp* vis à vis les différentes combinaisons des huiles essentielles.

D'après l'histogramme représenté dans la figure 15, nous remarquons que toutes les combinaisons qui contiennent l'HE de *Tymus fontanesii* ont donné des ZDI significatives sauf le test qui combine le thymus et la Menthe pouliot ou la souche *Pseudomonas Sp* a montré une résistance.

Le meilleur effet antibactérien constaté est celui obtenu avec le test 7 qui combine les 3 HEs avec des quantités égales.

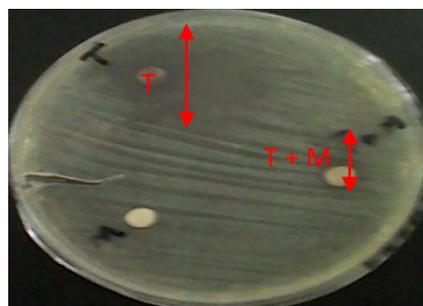


Figure 16 : résultat de la combinaison de 50% de l'HE de *thymus* avec 50 de la Menthe verte

Effet de la combinaison sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :

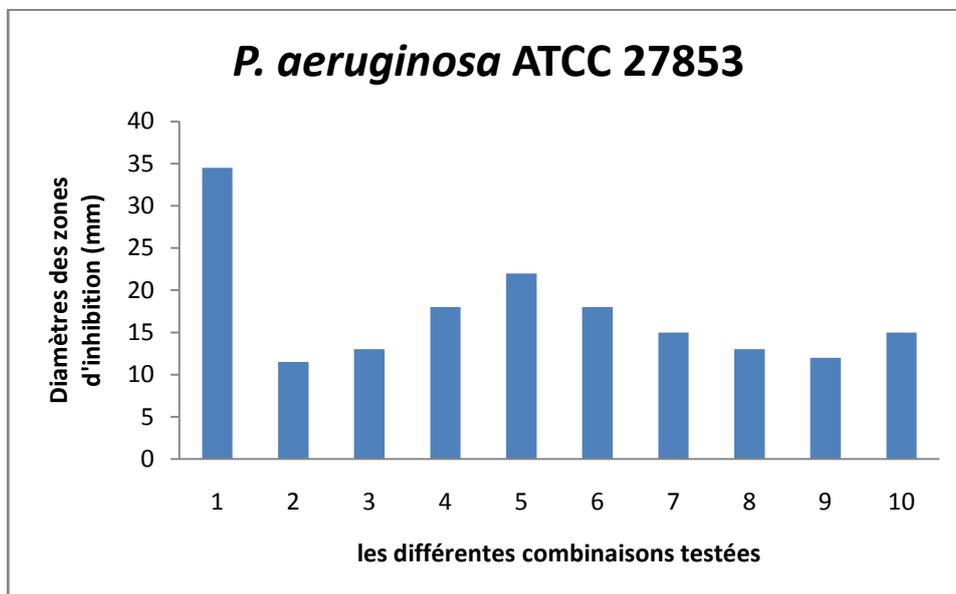


Figure17 : représentation graphique des résultats du test de sensibilité de *P. aeruginosa* ATCC27853 vis à vis les différentes combinaisons des huiles essentielles.

D'après l'histogramme, on remarque toujours que le thym présente un effet considérable dans son état individuel. Son effet inhibiteur devient moins important en le combinant avec les deux autres huiles. Par contre, la combinaison entre la menthe pouliot et la menthe verte a donnée des ZDI plus remarquables (18mm) que celles obtenus dans le cas de la Menthe pouliot seule (13mm), ou dans le cas de la Menthe verte seule (10mm).

On conclut que la combinaison entre les trois HEs (50% de Menthe pouliot, 25% de Thym, 25% de Menthe verte) a donné un effet antagonisme envers *P. aeruginosa* ATCC 27853, tandis que les autres combinaisons ont montré un effet indifférent sauf la combinaison entre les deux menthes qui a donné un effet synergétique

L'effet antibactérien des huiles essentielles varie selon les différentes Combinaisons, les concentrations et les souches testées.

Le mélange des huiles essentielles pourrait rendre leurs effets antibactériens encore plus meilleurs, comme il peut le réduire en cas de mauvaises combinaisons. Certain essences ont tendance à dominer comme le cas de thym.

Les mécanismes d'action des HEs qui peuvent être impliqués pour expliquer leur activité antimicrobienne sont rapportés dans plusieurs travaux.

VII. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* appliquée sur la soupe de poisson

Nous avons suivi le développement de *Pseudomonas* Sp. et de *P. aeruginosa* ATCC 27853 dans la soupe de poisson avec et sans huiles essentielles de *Thymus fontanesii*. Les résultats sont illustrés dans les figures 18 et 19.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

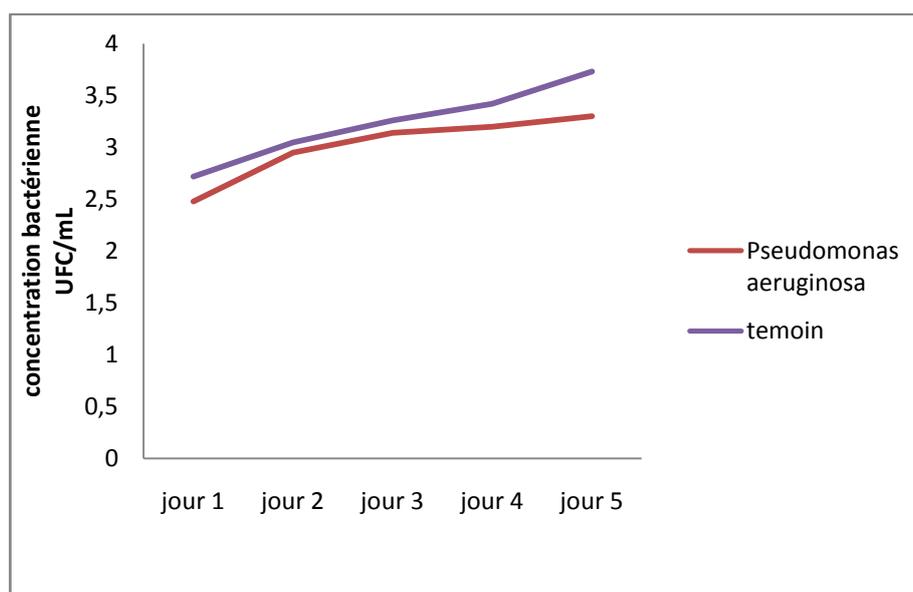


Figure 18 : Effet inhibiteur de H.E de *Thymus fontanesii* inoculée dans la soupe de poisson

La figure 18 illustre l'activité antimicrobienne de H.E. de *Thymus fontanesii* sur la croissance de *Pseudomonas* dans la soupe de poisson pendant une période de conservation de 5 jours.

La figure montre une réduction légère sur le développement des *Pseudomonas* dans la soupe en présence de l'HE de *Thym* par rapport au témoin positif (absence de l'HE).

Il est noté à travers ce graphique que le nombre de *Pseudomonas*, sans l'huile, donne une valeur de 2,48 Log UFC/ml au début de la conservation puis atteint une valeur de 3,73 Log UFC/ml à la fin de la période de conservation (au 5^{ème} jour), par contre avec l'ajout de l'HE le nombre atteint une valeur de 2,72 au début de conservation et 3,30 Log UFC/ml à la fin de la période de conservation. Cette différence de résultats explique l'activité antibactérienne de H.E de *Thymus fontanesii*.

Pseudomonas Sp :

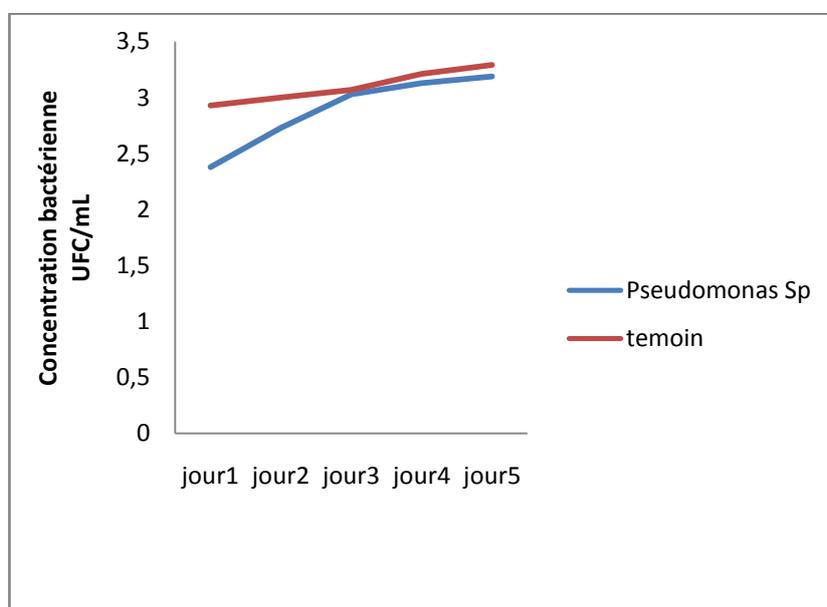


Figure 19 : Effet inhibiteur de H.E de *Thymus fontanesii* inoculée dans la soupe de poisson

La figure 19 montre l'activité antimicrobienne des H.E de *Thymus fontanesii* sur *Pseudomonas Sp* inoculée dans la soupe de poisson maintenue à une T° de réfrigération pendant une période de 5 jours.

Les résultats obtenus révèlent une augmentation importante du nombre de *Pseudomonas Sp* en absence d'huile (témoin positif) chaque jour et qui atteint au 5eme jour de stockage une charge bactérienne de 2,93 Log UFC/ml. En présence de l'HE, une augmentation légère du nombre de *Pseudomonas Sp* qui atteint au 5eme jour une valeur de 2,38 Log UFC/ml. L'HE de *Thymus fontanesii* qui possède un effet inhibiteur plus au moins considérable vis-à-vis

sur la souche *Pseudomonas* Sp. Selon les résultats de la figure 2 et 3, la charge bactérienne (*pseudomonas* Sp et *P. aeruginosa* ATCC 27853) en absence de l'HE de *Thymus fontanesii*, est beaucoup plus importante par rapport à sa présence et cela due à l'activité antibactérienne de l'HE. D'après les résultats cette activité antibactérienne est beaucoup plus active pour *pseudomonas* Sp que pour *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Les résultats de notre étude ont montré que les effets antibactériens sont différents de ceux qu'on a obtenus *in vitro*. L'HE de *Thymus fontanesii* à une forte activité antibactérienne *in vitro* par contre, leur application sur la matrice (la soupe de poisson) donne une faible activité antibactérienne.

Il est bien connu que le pouvoir antimicrobien des H.E. dans des matrices alimentaires est généralement réduit une fois comparé au travail "*in vitro*", du fait que la présence de graisses, des hydrates de carbone, de protéines, de sels et de pH (facteurs intrinsèques) influence fortement l'efficacité de ces agents (BURT, 2004).

Plusieurs HEs ont une activité antibactérienne avérée *in vitro*, mais elles sont moins efficaces lorsqu'elles sont appliquées dans des matrices alimentaires. Des analyses identiques ont été amenées par Firouzi et al. (1998) sur le poulet, en étudiant l'effet antibactérien des HEs d'origan et de muscade contre *L. monocytogenes*.

D'après Caillet et Lacroix (2007), certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des H.E. Il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage.

Conclusion générale

A côté des substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes, différentes plantes aromatiques synthétisent des molécules odorantes, qui constituent les huiles essentielles, capables d'exercer un effet similaire à celui des antibiotiques.

Le travail vise l'extraction des HEs à partir de trois plantes médicinales à savoir *Thymus fontanesii* ; *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* par hydrodistillation, et l'évaluation leur activité antibactérienne sur deux souches bactériennes testées.

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que :

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle de *Thymus Fontanesii* obtenu est de 4,90%, il est de 1.76% et 1.37%. *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* respectivement.

La méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des trois huiles essentielles. L'huile essentielle de *T. fantanesii* exerce une forte activité antibactérienne à la *M. spicata* et *pulegium* sur les deux souches

Le diamètre des zones d'inhibition obtenu avec l'HE de *T.fantanesii* sur *Pseudomonas* de référence est de 34mm, il est de 17mm sur *Pseudomonas Sp*, alors que le diamètre d'inhibition de l'HE de *M.spicata* est de 11mm, et de 10mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas Sp* respectivement.

Les résultats obtenus par l'antibiogramme montrent que les huiles essentielles peuvent constituer une alternative intéressante aux antibiotiques, en effet :

- Le diamètre d'inhibition obtenus par l'utilisation de l'HE de thym sur *Pseudomonas Sp* (15mm) est inférieur à ceux obtenu avec les ATBs K30;I10;O30. Par contre Le DZI obtenus par l'utilisation de l'HE de thym sur *P. aeruginosa* ATCC27853 (34mm) est supérieur a ceux qui obtenus de K30;O30 et inférieur de l'ATB I10.

Les résultats de l'étude ont montré que les l'effets antibactériens sont différents de ceux qu'on a obtenus *in vitro*. L'HE de *Thymus fontanesii* à une forte activité antibactérienne in

Conclusion générale

in vitro par contre, leur application sur la matrice (la soupe de poisson) donne une faible activité antibactérienne.

Nos résultats, bien que préliminaires, montrent que l'HEs des trois plantes testés témoignent d'une activité antibactériennes surtout pour HE de *Thymus fontanesii* qui donne une activité antibactérienne importante vis-à-vis les deux souches testées.

Vu l'importance de cette étude, nous espérons que ces résultats puissent être approfondis par d'autres méthodes et feront l'objet de futures recherches telles que l'évaluation de l'effet antimicrobien de ces huiles essentielles sur d'autres souches ainsi que leur effet insecticide.

Bibliographie

Références bibliographiques :

AÏBOUD K., 2012, Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles à l'égard de la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : bruchidae) et impacts des traitements sur la germination des graines de *Vigna unguiculata* (L.)Walp, Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. P 83.

13^{ème} éd. Masson, Paris, 237p.

AMARTI F., EL AJJOURI M., GHANMI M., SATRANI B., AAFI A., FARAH A., KHIA A., GUEDIRA A., RAHOUTI M., CHAOUCH A., 2011, Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydant de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc, Article original Pharmacologie, aromathérapie, Phytothérapie , Springer-Verlag France

BALOUK A., BHAR H., 2011, les Plantes aromatiques et médicinales, l'espace marocain n° 68 / 2^o trimestre.

BELAICHE P. (1979) traité de phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome 1. L'Aromathérapie ED. Maloine S.D.Paris. **MALOINE S.A EDITEUR**, Paris. 1979. 204 pages.

BENAYAD N., 2008, Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs , Projet de Recherche, Université Mohammed V – Agdal .P 63.

BENINI C., 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109p.

BENZEGGOUTA N., 2005, Etude de l'activité antibactérienne des huiles Infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. P 153.

BERNADET M., 2000. Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Ed.

BOUHDID S., IDAOMAR, M. ; ZHIRI, A.; BOUHDID, D.; SKALI, N. S. ; ABRINI, J. (2006) Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, *Congrès International de biochimies, Agadir*. 324-327.

Bibliographie

BESOMBES C., 2008, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de Doctorat, Université de La Rochelle. P 289.

BOUGUERRA A., 2012, Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de foeniculum vulgare mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. P 128.

CAILLET S. & LACROIX M., 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA).P:1- 8

Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chem., 102: pp.898-904.

CHAKER EL KALAMOUNI 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, thèse DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE.

CHOSSAT L., 2002. L'histomonose en production A.O.C. « dinde fermière de Bresse » essai de prévention par phytothérapie, Thèse de Doctorat, Université Claude Brenard-Lyon 1. P 107.

DANIELE FESTY, 100 REFLEXE AROMATH2RAPIE, je me soigne avec les huiles essentielles.

DEGRYSE A.C., DELPLA I. & VOINIER M.A., 2008. Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p. désertiques méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris.

DESMARES C., LAURENT A. & DELERME C., 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.

EL HAIB A., 2011, Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Thèse de Doctorat, l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. P195.

Bibliographie

FELLAH S., ROMDHANEM., ABDERRABA M., 2006, extraction et étude des huiles essentielles de la salvia *Officinalis*.l cueillie dans deux régions différentes de La Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie, 16(2), 193-202.

FIGUEREDO G., 2007, Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal . P 416.

GACHKAR L., YADEGARI D., REZAEI M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007.

GIRARD G., 2010, les propriétés des huiles Essentielles dans les soins bucco - Dentaires d'hier a aujourd'hui, Thèse de Doctorat, Université Henri Poincare - Nancy 1. P 116.

GUERRIDA Z., 2011, Contribution à l'étude de l'activité antioxydant de *Rhetinolepis Lonadioides* Coss , Thèse de Master , Université Kasdi Marbah Ouargla . P 61.

GUEYE O. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de

GUIGNARD J. L., & DUPONT F., 2004. Botanique : Systématique moléculaire,

HADDOUCHI F., LAZOUNI H A., MEZIANE A., BENMANSOUR A., 2009, Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut, Afrique SCIENCE 05(2) 246 – 259.

HAMEURLAINE S., 2009, Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa, Mémoire de Magister, Université de Kasdi Merbah –Ouargla. P 86.

HASSANIA K B., GHANMI M., SATRANI B., AAFI A., CHAOUCH A, 2012, Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 81, P 4 – 21.

HELLAL Z., 2011, Contribution à l'étude des propriété antibactérienne et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites de Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. P 120.

HIMED L., 2011, Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. P 91.

Bibliographie

HUSSAIN A.I., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Doctorale thesis, Pakistan ; 257p.

HUSSAIN A.I., ANWAR F., CHATHA S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., 2010.

HUSSAIN A.I., ANWAR F., T.H.S. SHERAZI AND PRZYBYLSKI R., 2008. Chemical composition. antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry. 108: pp.986-995.

IMELOUANE B., EL BACHIRIA., ANKIT M., KHEDID K., WATHEL ET JP., AMHAMDI H., 2010, Essential oil composition and antimicrobial activity of artemisia herba-alba asso grown in morocco, Banat's Journal of Biotechnology, I(2),

JACQUE KALOUSTION et FRANCIS HADJI la connaissance des huiles essentielles 2012

JAHANDIEZ E. ET MARIE R., Catalogues des plantes du Maroc, Spermatophytes et

KABOUCHE A., 2005, Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae, Thèse de Doctorat, Université Mentouri-Constantine. P 389

KHENAKA K., 2011, Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. P 81.

LAHLOU M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research 18 : pp. 435-448.

LAIB I., 2011, Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. P 122.

LAOUER H. (2004) -Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.

Bibliographie

LIS-BALCHIN M.,2002. Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London.p: 37, 40,50, 155-200.

LUCCHESI M E., 2005, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de Doctorat, Université de La Reunion. P 146.

MAGHIBI F; MASSADEG M; MOHAMMEDI MS ET GHORBANI A labiotae family in folk medicine in Iren: from Ethino botony to pharmacology-journal of pharmaceutical research; vol.2; pp63-79 2005

MAYER F., 2012, Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite, Thèse de Doctorat, Université de Lorraine. P 107.

MEBARKI N., 2010, Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne, Mémoire de Magister, Université M'hamed Bougara Boumerdes.P185.

NDOYE R. Algorithme d'identification des Entérobactéries et des bacilles gram négatifs non fermentaires. Thèse Pharm., 2004 ; n° 83.

NGUEMTCHOUIN MBOUGA M G., 2012, Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de *Xylophia aethiopica* et de *Ocimum gratissimum* sur des argiles camerounaises modifiées, Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure De Chimie de Montpellier. P 293.

Paris. 1934,42.

PANJA A.R. RAMANOELINA, EMILE M. GAYDOU, J.P. BIANCHINI, Caractérisation des huiles essentielles industrielles de niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) de Madagascar - Propositions d'Avant-projet de Normes.

PENCHEV P I., 2010, Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse .P239.

PIOCHON M., 2008, Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse, Mémoire de la maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec A Chicoutimi. P 213.

Bibliographie

PORTER N. (2001) Essential oils and their production. Crop and food research. Number 39.

ptérydophytes. Tome III, P. Lechevalier, librairie 12, rue de Tournon VIe, Alger- quelques bacilles à Gram négatif. Thèse de pharm., 2007 ; n° 36.

QUEZEL P., et SANTA S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions

RAI M. K., ACHARYA D. ET WADEGAONKAR P. (2003) plant derived-antimycotics : potential of Asteraceous plants, In : plant-derived antimycotics :current trends and future prospects, Haworth press, N-York, London, oxford, 165-185.

RHAYOUR K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.

ROSMARINUS OFFICINALIS ESSENTIAL OIL: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 41: pp.1070-1078.

VALNET M., 2005. Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth International. Journal of Food Microbiology.85,p:73-81.

WILLIAMS L R AND LUSUNZI I. (1994). Essential oil from Melaleuca dissitiflora. A potential source of high quality tea tree oil. Industrial corps and products. 2, 122-217 pp

Annexe 1

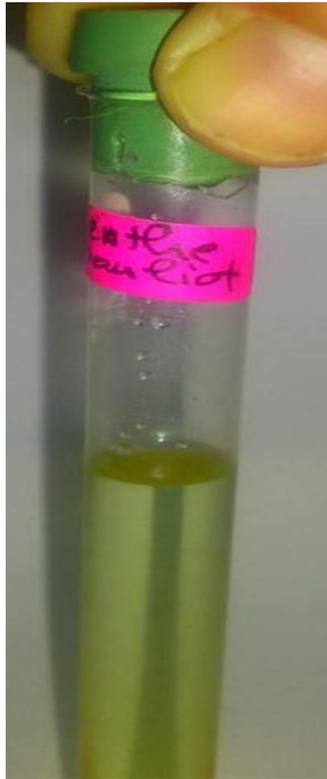


Figure1 : photo d'un rotavapeur



Figure 2 : photo montrant le dispositif utilisé pour l'hydrodistillation simple

Annexe N°2



Huile essentielle de *Mentha spicata*



huile essentielles de *Mentha pulegium*



Huile essentielle de *T. fontanesii*

Photo 3 : Photos de l'huile essentielle de *T. fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*

Annexe N°3

Les milieux de culture

Bouillon nutritif (Marchal *et al.*, 1973).

- Macération de viande..... 1 litre
(ou eau distillé + extrait de viande q.a.)
- Peptone tryptique..... 15 g
- NaCl ou KCl..... 5 g

Milieu Muller Hinton gélosé : pour un litre (Rhayour, 2002).

- Infusion de viande bovine..... 02,0g
- Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g
- Amidon soluble..... 01,5g
- Agar agar..... 15,0g

Autoclaver 20 minutes à 115°C

Milieu de Chapman : (g/l) (Djabou, 2006).

- Peptone 11g
- Extrait de viande 1g
- NaCl 75g
- Mannitol 10g
- Agar 15g
- Rouge de phénol 0,025g

pH = 7,6 – 7,8

Tableau I : Valeur des dilutions utilisé pour déterminé la CMI

Rapport de dilution d'HEs	1/2	1/4	1/6	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
(%)	50%	25%	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04
µl HEs/ml	150	75	37.5	18.75	9.37	4.68	2.34	1.17	0.58	0.29	0.14

Rapport de dilution d'HEs	1/2048	1/4096	1/8192
(%)	0.02	0.01	0.006
µl HEs/ml	0.07	0.03	0.01

Annexe N°5



Figure : photos montrant l'effet d'HE de *Thymus fontanesii* et *Mentha spicata* sur les *Pseudomonas Sp.*

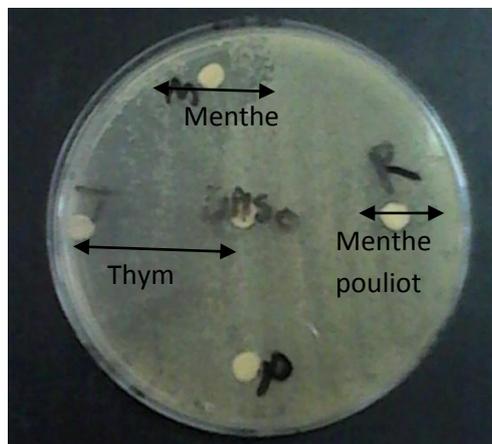


Figure : photo montrant l'effet d'HE de *Thymus fontanesii* et *Mentha spicata* sur les *Pseudomonas aeruginosa*

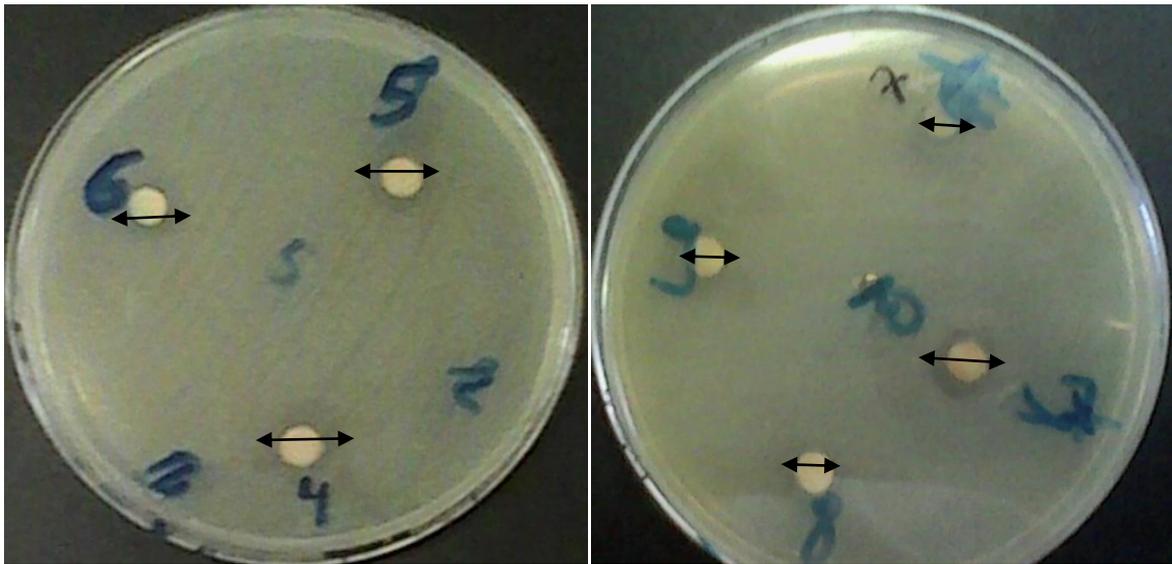


Figure : photo montrant l'effet des différentes combinaisons des HEs sur *Pseudomonas aeruginosa*

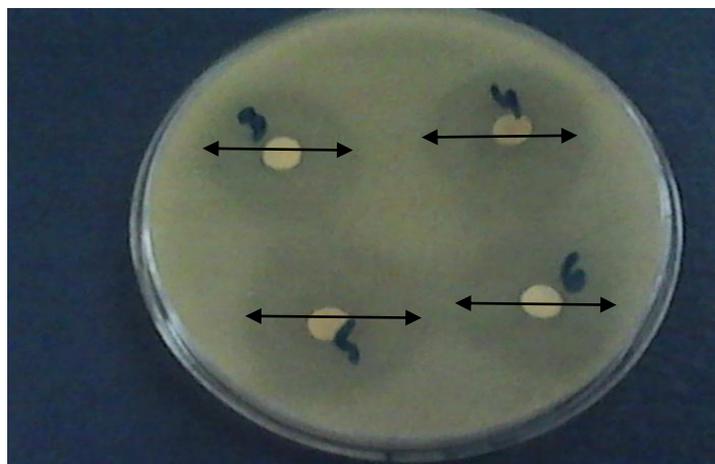


Figure : photo montrant l'effet des différentes combinaisons des HEs sur *Pseudomonas aeruginosa*

Annexe N°6



Figure : la soupe de poisson utilisée comme matrice alimentaire

Annexe N 7



Figure : application de l'HE de Thymus sur la souche de poisson inoculé par une souche bactérienne

Annexe 8

Tableau II : valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI

Rapport de dilution d'HE	1/2	1/4	1/8	1/32	1/64	1/128	1/156	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192	1/16384	1/32768
%	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	0,04	0,02	0,01	0,006	0,003
µl HE/ ml	300	150	75	37,5	18,75	9,37	4,68	2,34	1,17	0,58	0,29	1,14	0,07	0,03	0,01

Tableau VI : Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques
(diamètre de la zone d'inhibition en mm)

ATB	K30	O30	I10	Fox30
<i>Souches</i>				
<i>Pseudomonas Sp</i>	24mm	20mm	42mm	0mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27mm	17mm	42mm	0mm