

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud MAMMERY Tizi-Ouzou



Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département des sciences alimentaires

Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme Master académique en :

Sciences alimentaires

Spécialité : Agro-alimentaire et Contrôle Qualité

Thème

**Étude des effets antimicrobiens du chitosane et de l'huile
essentielle de thym appliquée au poulet.**

Réalisé par :

M. AMOURA Amine

&

M. FELLAG Takfarinas

Membres du jury :

Présidente : Mme LAMMI-MEFIDEN Sarah M.C.B à l'UMMTO

Promoteur : M. AMROUCHE Tahar Professeur à l'UMMTO

Co- Promoteur : M. KADOUCHE Slimane Professeur à l'UMMTO

Examinatrice : Mme BENMALLEM REMANE Yakout M.C.B à l'UMMTO

Examinatrice : Mme CHENAH May M.C.B à l'UMMTO

Année universitaire : 2022-2023.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre sincère reconnaissance à Dieu, source d'inspiration et de guidance, dont la présence bienveillante a illuminé chaque étape de notre parcours.

Notre gratitude s'adresse particulièrement au Professeur AMROUCHE Tahar, dont l'éminente compétence et la bienveillance académique ont illuminé ce mémoire par son rôle de promoteur. Parallèlement, nos pensées et remerciements au Professeur KADOUICHE Slimane, notre co-promoteur, dont l'expertise nous a été précieuse.

Nous présentons nos vifs remerciements aux membres du jury, en l'occurrence Docteur LAMMI MEFIDEN Sarah, pour avoir accepté de présider le jury, docteur BENMALLEM REMANE Yakout et docteur CHENAH May, pour avoir examiné notre mémoire.

Nous souhaitons honorer l'ensemble de nos enseignants dont l'apport pédagogique a enrichi notre parcours académique.

Nos remerciements vont aussi vers les ingénieurs de laboratoire, Madame IAZOURENE et Madame CHAOUCHI, pour leur accompagnement précieux. Et aussi vers Madame OUHADDA pour son aide.

Nous exprimons notre gratitude au docteur MSELA pour son hospitalité généreuse en nous offrant l'opportunité d'utiliser sa paillasse au sein du laboratoire de microbiologie. Nos remerciements s'étendent à Madame SACI pour son assistance dévouée ainsi qu'à madame OULD OUALI et au personnel du laboratoire.

Notre gratitude est également exprimée au Docteur CHERIFI pour avoir facilité notre accès au laboratoire de microbiologie du CHU Nedir Mohamed, ainsi qu'au personnel du laboratoire. Que le Docteur SEKLAOUI soit rassuré de notre gratitude contribution tant appréciée.

Nous n'oublions pas de remercier chaleureusement Monsieur METNA pour son aide précieuse apportée lors notre étude statistique, son apport a grandement enrichi notre travail et contribué à son excellence.

Enfin, notre reconnaissance est exprimée au Professeur MAMOU pour son accord précieux en autorisant l'analyse HPLC et envers le Docteur CHEKROUN pour son encadrement expert.

Nous témoignons ainsi notre gratitude à toutes les personnalités qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce mémoire de fin d'études en Master 2.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

A mon cher Père,

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que t'as consenti pour mon instruction et mon bien être. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices, bien que je ne m'en acquitterai jamais assez.

A ma chère Maman,

Combattante, courageuse, honorable, aimable, sage et très patiente, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, tu as tout fait pour que je sois ce que je suis aujourd'hui.

*Je ne te remercie jamais assez. Je vous aime à l'éternité
Que DIEU vous bénisse et vous garde pour moi mes chers parents.*

*A mes chers frères Tarik, Tahar et Toufik,
A mes chères sœurs Taoues, Tassadit et Tania,*

Merci pour vos encouragements, vos soutiens, votre amour et pour tout ce que vous faites pour moi. Je vous aime.

A ma grande mère Aïcha.

A une âme qui résonne près de mon cœur.

A toute ma famille,

A mon binôme et ami Amine,

Réussite méritée, je te souhaite la meilleure des continuités

*A tous mes amis (es) Merzouk, Djahid, Sihem, tizou...
A tous mes camarades de la promotion AACQ 2022*

TAKFARINAS

Dédicace

Je dédie ce travail à :

À mon vénéré Père,

Les mots demeurent impuissants à traduire l'étendue de mon respect, de mon amour inaltérable et de ma considération envers les innombrables sacrifices consentis pour mon éducation et mon bien-être. Vos soutiens inébranlables et l'affection dont vous m'entourez m'inspirent une gratitude profonde. Puissent les réalisations modestes de ce travail humblement exaucer vos aspirations, honorant ainsi vos dévouements incalculables, même si je demeure conscient de leur caractère insuffisant.

À ma tendre Mère,

Véritable guerrière empreinte de courage, d'honneur, de bienveillance, de sagesse et d'une patience exemplaire, vous incarnez pour moi l'essence même de la bonté. Chaque effort que vous avez déployé pour forger mon identité ne saurait être assez remerciée. L'ampleur de mon amour pour vous dépasse les frontières du temps. Que Dieu vous accorde Ses bénédictions et veille sur vous, mes chers parents.

À ma chère sœur Fatima,

A une âme proche de mon cœur, le destinataire saura aisément se reconnaître. Votre soutien indéfectible, votre affection sincère et tout ce que vous entreprenez en mon nom sont autant de motifs d'une reconnaissance infinie. Mon amour pour vous transcende le temps.

À toute ma famille,

À mon binôme et ami TAKFARINAS,

Ton succès est mérité, et je te souhaite une trajectoire des plus fructueuses à venir.

À tous mes amis, Abdou, Amine, Yacine, Rayan, Nazim, Khaled, Yamine, Sihem, Manel...

À l'ensemble de mes camarades de la promotion AACQ 2022

AMINE

Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Altération microbienne des aliments	
1. Concept	4
2. Evolution de la flore microbienne dans l'aliment	4
3. Les facteurs d'altération des aliments	5
3.1. Facteurs intrinsèques	6
3.1.1. pH.....	6
3.1.2. Activité de l'eau (a_w).....	7
3.1.3. Potentiel d'oxydo-réduction	7
3.1.4. Structure physique de l'aliment	8
3.1.5. Présence d'agents antimicrobiens naturels	8
3.2. Facteurs extrinsèques.....	8
3.2.1. Température	8
3.2.2. Humidité relative (HR)	9
3.2.3. Présence et concentration de gaz	9
4. Conséquences de l'altération microbienne	9
4.1. Les conséquences pour la santé liées à la présence de micro-organismes	9
4.2. Maladies alimentaires	10
Chapitre II : Agents antimicrobiens : chitosane et huile essentielle de thym.	
I. Agents antimicrobiens	12
I.1. Concept des agents antimicrobiens	12
I.2. Types d'agents antimicrobiens	12
I.2.1. Agents naturels.....	12
I.2.2. Agents chimiques (synthétiques)	12
I.2.3. Agents biologiques.....	13
I.2.4. Agents physiques	13
I.3. Spectre d'action des agents antimicrobiens	13

I.4. Combinaison de différents agents antimicrobiens	13
I.5. Détermination des différents paramètres.....	14
I.5.1. Sensibilité et résistance des souches microbiennes	14
I.5.2. Détermination de la CMI des agents antimicrobiens.....	14
I.5.3. Détermination de la (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) des agents antimicrobiens.....	15
II. Chitosane.....	15
II.1. Provenance du chitosane	15
II.2. Agencement chimique du chitosane.....	16
II.3. Processus d’obtention de chitosane.....	16
II.4. Propriétés du chitosane.....	17
II.4.1. Propriétés physicochimiques du chitosane	17
II.4.2. Propriétés biologiques du chitosane.....	18
II.5. Domaines d’application du chitosane	18
II.5.1. Domaine agroalimentaire	19
II.5.2. Domaines biomédical et pharmaceutique	20
II.5.3. Domaine cosmétique.....	20
III. Huile essentielle de thym	20
III.1. Notion de l’huile essentielle	21
III.2. Provenance.....	21
III.3. Agencement chimique	21
III.4. Processus d’extraction	22
III.5. Attributs	22
III.5.1. Caractéristiques.....	22
III.5.2. Propriétés	23
III.6. Domaine d’application	23
 Chapitre III : Emballages alimentaires.	
I. Concept de l’emballage alimentaire.....	26
I.1. Evolution de l’emballage	26
I.2. Caractérisation des matériaux utilisés pour l’emballage.....	27
I.3. Différentes variétés et niveaux de l’emballage alimentaire	27

I.3.1. Variétés de l’emballage alimentaire.....	27
I.3.2. Niveaux d’emballages alimentaires	27
I.4. Facteurs influençant le choix de l’emballage alimentaire adéquat.....	28
I.5. Interaction (aliment/emballage)	29
II. L’emballage actif	30
II.1. Concept et spécificités de l’emballage actif.....	30
II.1.1. Concept de l’emballage actif.....	30
II.1.2. Spécificités de l’emballage actif	30
II.2. Différentes catégories.....	31
II.3. Emballage actif antimicrobien.....	32
II.3.1. Concept des emballages actifs antimicrobiens.....	32
II.3.2. Systèmes d’emballage antimicrobien.....	32

Partie II : Partie pratique

Matériel et méthodes

I. Matériel	35
I.1. Matériel non biologique	35
I.1.1. Acide acétique.....	35
I.1.2. Diméthylsulfoxyde (DMSO)	35
I.1.3. Cuisses de poulet.....	35
I.2. Matériel biologique	36
I.2.1. Micro-organismes testés	36
I.2.2. Extraits biologiques étudiés	36
I.2.3. Disques témoins positifs	37
II. Méthodes.....	38
II.1. Vérification des souches de référence	38
II.1.1. Etude macroscopique (Observation macroscopique).....	38
II.1.2. Examen microscopique	38
II.1.3. Repiquage	39
II.2. Préparation des suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens...	40
II.2.1. Préparation des suspensions microbiennes	40
II.2.2. Préparation des solutions des agents antimicrobiens	41
□ Extraction du chitosane	41

II.3. Évaluation de l'effet antimicrobien du chitosane, de l'HE de thym et de leur combinaison.....	43
II.4. Étude statistique	44
II.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	44
II.5.1. Détermination des CMI's	44
II.5.2. Détermination des CMB's.....	45
II.6. Composition chimique de l'HE de <i>T. algeriensis</i>	46
II.6.1. Principe	46
II.6.2. Conditions chromatographiques	46
II.7. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym sur les cuisses de poulet... 46	
II.7.1. Application de l'HE de thym sur les cuisses de poulet « Tests <i>in-situ</i> »	46
II.7.2. Tests microbiologiques pour évaluer l'effet de l'HE de thym	48
 Résultats et discussions	
I. Vérification des souches de références	50
I.1. Observations macroscopiques	50
I.2. Observations microscopiques.....	51
II. Suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens.....	53
II.1. Standardisation des suspensions microbiennes	53
II.2. Sélection des solutions d'agents antimicrobiens	53
III. Présentation des résultats (antibiogrammes / antifongigrammes).....	54
III.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne du chitosane.....	54
III.1.1. Antibiogrammes.....	55
III.1.2. Antifongigrammes	55
III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym	56
III.2.1. Antibiogrammes.....	56
III.2.2. Antifongigrammes	58
III.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la combinaison du chitosane et HE de thym.....	58
IV. Présentation des ZIs des agents antimicrobiens	59
V. Détermination des CMI's / CMB's	64
V.1. Détermination des CMI's	64
V.2. Détermination de la CMB's et CMF's.....	69

V.2.1. CMBs	69
V.2.2. CMFs.....	69
VI. Résultats de l'HPLC.....	70
IV. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym sur les cuisses de poulet.....	71
IV.1. Résultats des effets de l'HE de thym sur les propriétés sensorielles.....	71
IV.2. Résultats des tests microbiologiques des effets de l'HE de thym sur les cuisses de poulet	74
IV.2.1. Echantillon témoin non emballé	77
IV.2.2. Méthode d'emballage (barquette + film plastique)	77
IV.2.3. Emballage complet de l'échantillon avec un film plastique (sans barquette).....	78
Conclusion.....	82
Références bibliographiques	
Annexes	

- **Agent prophylactique** : Une substance préventive visant à empêcher ou à réduire le risque de développement d'une maladie ou d'une infection. Il est utilisé pour prévenir l'apparition de problèmes de santé potentiels chez les individus exposés à des risques spécifiques, tels que les infections microbiennes. Ils peuvent agir en renforçant le système immunitaire, en inhibant la croissance de microorganismes pathogènes ou en minimisant les facteurs de risque.
- **Antibiogramme** : Une méthode de laboratoire utilisée pour évaluer la sensibilité d'un microorganisme, tel qu'une bactérie, à différents antibiotiques. Cette technique implique de cultiver la bactérie en présence de différents antibiotiques pour déterminer quels médicaments sont les plus efficaces pour inhiber sa croissance, en tenant compte de la résistance potentielle de la bactérie à certains antibiotiques
- **Antifongigramme** : Une méthode similaire à l'antibiogramme, mais spécifiquement appliquée aux champignons et levures pathogènes. Il permet d'évaluer la sensibilité de ces microorganismes à différentes classes d'antifongiques, qui sont des médicaments utilisés pour traiter les infections fongiques, tout en considérant les variations de sensibilité des champignons aux différents médicaments antifongiques.
- ***Aspergillus niger* ATCC 16404** : Une souche standardisée du champignon *Aspergillus niger* utilisée à des fins de recherche.
- **Bactéricide** : Une substance qui tue les bactéries.
- **Bactériostatique** : Une substance qui inhibe la croissance des bactéries sans les tuer.
- **Bioconservateur** : Une substance naturelle ou synthétique utilisée pour prolonger la durée de conservation des aliments en inhibant la croissance microbienne.
- ***Candida albicans* 71453** : Une souche standardisée de la levure *Candida albicans*, souvent associée aux infections fongiques.
- **Carvacrol** : Utilisé en faibles concentrations comme ingrédient aromatisant alimentaire et conservateur, en raison de son odeur agréable et de son activité antimicrobienne, pour la prévention de la croissance et contamination.
- **Chitosane** : Un polysaccharide naturel dérivé de la chitine, un composé que l'on trouve principalement dans les carapaces de crustacés tels que les crevettes et les crabes. Il possède des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires et hémostatiques.
- **CMB** : La concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui détruit 99,9% de la concentration bactérienne finale.
- **CMF** : La concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui détruit 99,9% de la concentration fongique finale.
- **CMI** : Correspond à la plus petite concentration de la substance antimicrobienne pour laquelle aucune croissance microbienne n'est observée après 24h pour les bactéries et après 48h pour les levures et moisissures
- **Commissions Codex Alimentarius** : Une organisation internationale, créée en 1963 par la FAO et l'OMS, chargée d'élaborer des normes alimentaires, des définitions et des critères applicables aux aliments, de contribuer à leur harmonisation et donc, notamment, de faciliter les échanges internationaux. Elle joue un rôle prépondérant dans la normalisation alimentaire mondiale.

- ***Escherichia coli* ATCC 25922** : Une souche standardisée de la bactérie *Escherichia coli* utilisée à des fins de recherche et de référence.
- **Film alimentaire** : Une pellicule fine et flexible utilisée pour envelopper et protéger les aliments.
- **Fongicide** : Une substance qui tue les champignons.
- **Fongistatique** : Une substance qui inhibe la croissance des champignons sans les tuer.
- **HPLC** : La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.
- **Huile Essentielle** : Une substance volatile et aromatique extraite de plantes, généralement par distillation à la vapeur ou par pression à froid. Ces huiles sont composées de divers composés chimiques naturels présents dans les parties de la plante, elles sont utilisées depuis longtemps pour leurs propriétés thérapeutiques, aromatiques, cosmétiques, antibactériennes, antifongiques et relaxantes.
- **PC** : Protocole conventionnel
- **P-cymène** : Précurseur biologique du carvacrol et thymol. C'est un hydrocarbure aromatique naturel à substitution alkyle.
- ***Staphylococcus aureus* ATCC 23922** : Une souche standardisée de la bactérie *Staphylococcus aureus* utilisée pour les études microbiologiques.
- **Thymol** : Un monoterpène naturel dérivé phénolique de cymène et un isomère de carvacrol. Le thymol (10–64%) est l'un des principaux constituants des huiles essentielles de thym.
- ***Thymus algeriensis*** : Une plante originaire d'Algérie, connue pour ses propriétés antimicrobiennes et ses applications potentielles en tant que bioconservateur.
- **γ -terpinene** : Hydrocarbures isomères qui présentent des différences dans la localisation de leurs doubles liaisons carbone-carbone dans leurs squelettes chimiques.

- ATCC: American type culture collection.
- a_w : Activité de l'eau.
- BE : Brunissement enzymatique.
- BM : Bleu de méthylène.
- *C. albicans* : *Candida albicans*.
- CHU : Centre hospitalier universitaire.
- CMB : Concentration minimale bactéricide.
- CMF : Concentration minimale fongicide.
- CMI : Concentration minimale inhibitrice.
- DDA : Degré de désacétylation.
- DMSO : Diméthylsulfoxyde.
- FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- FPAT : Flore psychrotrophe aérobie totale.
- H₂O₂ : Peroxyde d'oxygène.
- HE : Huile essentielle.
- HPLC : High Performance Liquid Chromatography.
- HR : Humidité relative.
- KMnOH : Permanganate de potassium.
- MH : *Mueller-Hinton*.
- MM : Masse Moléculaire.
- OMS : Organisation mondiale de la santé.
- pH : Potentiel hydrogène.
- Ppm : Partie par million.
- T : Test.
- TIA : Toxi-infection alimentaire.
- UFC : Unité formant colonie.
- UV : Ultra-violet.
- ZI : Zone d'Inhibition.

Figure 1 : Classification des facteurs d'altération des aliments.....	5
Figure 2 : La vitesse de croissance de quelques microorganismes en fonction du pH	6
Figure 3 : Développement des microorganismes en fonction du pH	6
Figure 4 : Développement des microorganismes en fonction de l'a _w	7
Figure 5 : Constante de vitesse dénaturante des protéines en fonction de la température	9
Figure 6 : Les principales interactions aliment / microorganisme / consommateur	10
Figure 7 : Sources de chitine et de chitosane	16
Figure 8 : Structure chimique du chitosane.....	16
Figure 9 : Procédés de fabrication de chitine et de chitosane	17
Figure 10 : <i>T. Algeriensis</i> Bois.& Reut	21
Figure 11 : Structure chimique des huiles essentielles des plantes thymus	22
Figure 12 : Niveaux d'emballages alimentaires	27
Figure 13 : Courbe de contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible	29
Figure 14 : Principales caractéristiques d'un emballage actif	31
Figure 15 : Les trois grandes catégories d'emballages actifs	31
Figure 16 : Systèmes d'emballages alimentaires et comportement des substances actives	32
Figure 17 : Chitosane extrait des exosquelettes de crevettes recueilli localement (a) : Exosquelettes de crevettes ; (b) : chitosane	36
Figure 18 : l'HE de Thym d'Algérie	37
Figure 19 : Représentation schématique de la méthode de l'antibiogramme	43
Figure 20 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de thym effectuées pour la détermination des CMI's	44
Figure 21 : Schéma représentant les dilutions du chitosane effectuées pour la détermination des CMI's	45
Figure 22 : Représentations des 9 échantillons de cuisses de poulet	47
Figure 23 : Résultats des tests d'antibiogrammes du chitosane sur deux souches bactériennes (A) : <i>E. coli</i> ; (B) : <i>S. aureus</i>	55
Figure 24 : Résultats des tests d'antifongigrammes du chitosane.....	55
Figure 25 : Résultats des tests antibiogrammes de l'HE de thym pour les deux souches microbiennes (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)	56
Figure 26 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym pure sur <i>E. coli</i>	57
Figure 27 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym (solution 1) sur <i>E. coli</i>	57
Figure 28 : Résultats des tests antifongigrammes de l'HE de thym sur une levure(<i>C. albicans</i>) et une moisissure (<i>A. niger</i>).....	58
Figure 29 : Tests antibiogrammes et antifongigrammes de la combinaison des deux molécules bioactives.....	58
Figure 30 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches bactériennes en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens	60
Figure 31 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches fongiques en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens	63

Figure 32 : Résultats des dilutions des 2 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur <i>E. coli</i>	64
Figure 33 : Résultats des différentes dilutions des 2 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur <i>S. aureus</i>	64
Figure 34 : Résultats des différentes dilutions du chitosane afin de fixer sa CMI sur <i>C. albicans</i>	65
Figure 35 : Résultats des différentes dilutions de l'HE de thym afin de fixer sa CMI sur <i>C. albicans</i>	65
Figure 36 : Résultats des différentes dilutions du chitosane afin de fixer sa CMI sur <i>A. niger</i>	65
Figure 37 : Résultats des différentes dilutions de l'HE de thym afin de fixer sa CMI sur <i>A. niger</i>	66
Figure 38 : Détermination de la CMB des 2 agents antimicrobiens sur <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> ..	69
Figure 39 : Détermination de la CMF des 2 agents antimicrobiens sur <i>C. albicans</i>	69
Figure 40 : Détermination de la CMF de HE de thym sur <i>A. niger</i>	70
Figure 41 : Cuisse de poulet témoin non emballée (groupe 1)	71
Figure 42 : Analyse comparative entre cuisse emballée avec film plastique seul (a) et cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym (b).....	72
Figure 43 : Confrontation entre (c) : cuisse contaminée par <i>E. coli</i> emballées avec film plastique, et (d) cuisse contaminée par <i>E. coli</i> emballées avec film plastique contenant de l'HE	73
Figure 44 : Étude comparative entre (a) cuisse emballée avec film plastique seul et (b) cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym	73
Figure 45 : Comparaison entre (c) cuisse contaminée par <i>E. coli</i> , puis emballée avec film plastique, et (d) cuisse contaminée par <i>E. coli</i> , puis emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym.....	74
Figure 46 : Profil microbiologique de cuisse de poulet témoin : (a) milieu PCA ; (b) milieu Hektoen	75
Figure 47 : Impact de (a) l'emballage plastique et (b) de l'HE de thym sur la qualité microbiologique des cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA)	75
Figure 48 : Résultats d'emballage des cuisses de poulet contaminer intentionnellement par <i>E. coli</i> : comparaison (a) film plastique ; (b) emballage à l'HE de thym (milieu Hektoen)	76
Figure 49 : Comparaison de (a) l'emballage plastique simple et de (b) l'emballage à l'HE de thym pour la conservation microbienne des cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA)	76
Figure 50 : Résultats d'emballage des cuisses de poulet contaminer intentionnellement par <i>E. coli</i> : comparaison (a) film plastique ; (b) emballage à l'HE de thym (milieu Hektoen)	76

Tableau I : Principales applications du Chitosane en Agro-Alimentaire.....	19
Tableau II : Quelques développements dans le domaine de l'emballage	26
Tableau III : Propriétés macroscopiques des différentes souches microbiennes	50
Tableau IV : Propriétés microscopiques des différentes souches microbiennes	51
Tableau V : Résultats de repiquage des différentes souches microbiennes.....	52
Tableau VI : Récapitulatif des différentes ZIs sur les 4 souches microbiennes	59
Tableau VII : Diamètres des ZIs des différentes dilutions des agents antimicrobiens sur les 4 souches microbiennes.....	66
Tableau VIII : Sélection des dilutions où les CMI sont observées.....	67



Introduction

Les préoccupations grandissantes du secteur agroalimentaire concernant la sécurité alimentaire, la durabilité et l'impact environnemental ont incité les chercheurs et les acteurs de ce secteur à explorer de nouvelles approches pour répondre à ces défis. Dans ce contexte, où la sécurité alimentaire est devenue un enjeu primordial, la préservation de la qualité et de la salubrité des produits alimentaires revêt une importance cruciale. En effet, l'industrie agroalimentaire est constamment à la recherche de solutions novatrices pour prolonger la durée de conservation des produits via un emballage adéquat assurant la protection du consommateur contre les risques microbiens. Dans ce contexte, l'utilisation d'agents antimicrobiens naturels associés à l'emballage alimentaire suscite de plus en plus d'intérêt et ouvre ainsi la voie à de nouvelles avancées dans le domaine de l'emballage alimentaire.

Selon la littérature scientifique (Mirsharifi et *al.*, 2023), les substances bioactives naturelles montrent des propriétés antimicrobiennes prometteuses, offrant ainsi des perspectives significatives pour leur incorporation dans les emballages alimentaires. En effet, l'intégration de ces composés naturels dans les matériaux d'emballage pourrait non seulement prolonger la durée de conservation des produits alimentaires, mais également contribuer à la réduction de l'utilisation d'additifs synthétiques potentiellement nocifs.

Le domaine de l'agroalimentaire représente un secteur clé de l'économie, liant la production, la distribution et la consommation des denrées alimentaires.

La présente étude est focalisée sur l'évaluation des potentialités antimicrobiennes de deux agents naturels, en l'occurrence le chitosane, un polymère dérivé de la chitine présente dans les carapaces de crustacés, et l'huile essentielle issue de la plante locale *Thymus algeriensis*. Ces deux substances bioactives ont déjà fait objet d'étude *in vitro*, mais peu ou pas d'essais effectués *in situ* ou sur leur incorporation dans les emballages alimentaires.

L'objectif principal de ce mémoire est d'évaluer les effets antibactériens et antifongiques du chitosane et de l'huile essentielle de *T. algeriensis* et de déterminer l'impact de leur incorporation dans les matériaux d'emballage sur la qualité microbiologique des produits alimentaires en vue d'explorer leur potentiel en tant qu'alternatives aux agents conservateurs conventionnels. Il consiste à effectuer des essais *in vitro* et *in situ* sur les bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif d'un côté, et sur des champignons filamenteux (moisissures) et non filamenteux (levures).



Partie I :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Altération microbienne des aliments

1. Concept

Une altération microbiologique émane d'une contamination " innée " conséquente à laquelle se succède soit l'anéantissement, la persistance ou la propagation des micro-organismes.

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux (Guiraud et *al.*, 1998). Il est important de souligner que tous les produits alimentaires, qu'ils soient soumis à une transformation ou non, sont susceptibles de faire l'objet d'une contamination par des microorganismes. Cette contamination peut engendrer divers degrés de gravité, impactant à la fois la qualité du produit et la santé du consommateur. En effet, elle peut entraîner une altération du produit, entraînant ainsi la perte de ses caractéristiques organoleptiques et/ou commerciales, et dans certains cas, elle peut être la cause de troubles sévères tels que des intoxications ou des TIAs.

La détérioration des denrées alimentaires se manifeste par une altération notable de leurs aspects visuels, de leurs fragrances et de leurs saveurs, les rendant ainsi impropres à la consommation.

Lorsque les denrées alimentaires ne sont pas convenablement préservées, des microorganismes ont la capacité de les altérer, illustrant ainsi des exemples classiques tels que la détérioration causée par des champignons sur le pain.

2. Evolution de la flore microbienne dans l'aliment

L'évolution de la flore d'altération dépend de plusieurs types de facteurs appelés facteurs d'évolution. La croissance des levures et des moisissures est généralement plus lente que celle des bactéries, mais la grande variété de niches écologiques qu'elles peuvent exploiter, la capacité d'utiliser une variété de substrats et la tolérance à des conditions plus extrêmes que les bactéries (végétatives) en font de formidables agents d'altération (Blackburn, 2006).

La flore d'altération est constituée d'une part de la flore naturelle du produit lui-même, qui est principalement influencée par ses conditions environnementales. D'autre part, d'une flore issue d'une contamination croisée pendant ou après le traitement via des surfaces, des machines, des humains ou d'atmosphère environnante. La flore microbienne n'est pas statique, la flore initiale diffère de la flore de l'aliment en fin de vie. De plus, seul un petit nombre de microorganismes est souvent responsable de la perte de qualité en fonction des caractéristiques des aliments, des conditions environnementales et des interactions entre les microorganismes (Kreyenschmidt et Ibal, 2012).

Les nombreux types de microorganismes présents dans les aliments ont développé des mécanismes biochimiques leur permettant de digérer les composants des aliments (protéines, lipides, lactose), fournissant ainsi des sources d'énergie pour leur propre croissance et/ou libérant des composés indésirables (Sperber, 2009).

La transformation des composés disponibles donne une large gamme de produits finaux qui affectent les propriétés sensorielles, chimiques et physiques de l'aliment et se traduisent par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (Howell, 2016).

L'éventail des composés produits par le microorganisme dépend non seulement de la capacité génétique de celui-ci en question, mais aussi des caractéristiques intrinsèques du produit et des caractéristiques extrinsèques de manipulation et de l'environnement de stockage qui peuvent modifier considérablement les voies biochimiques (Joffin, 2003).

3. Les facteurs d'altération des aliments

Les facteurs d'altération des aliments sont nombreux et peuvent être externes ou internes à l'aliment.

On peut classer les facteurs d'altération des aliments selon leur caractère intrinsèque ou extrinsèque (Becila, 2009). La classification des facteurs d'altération des aliments est illustrée dans la figure 1 :

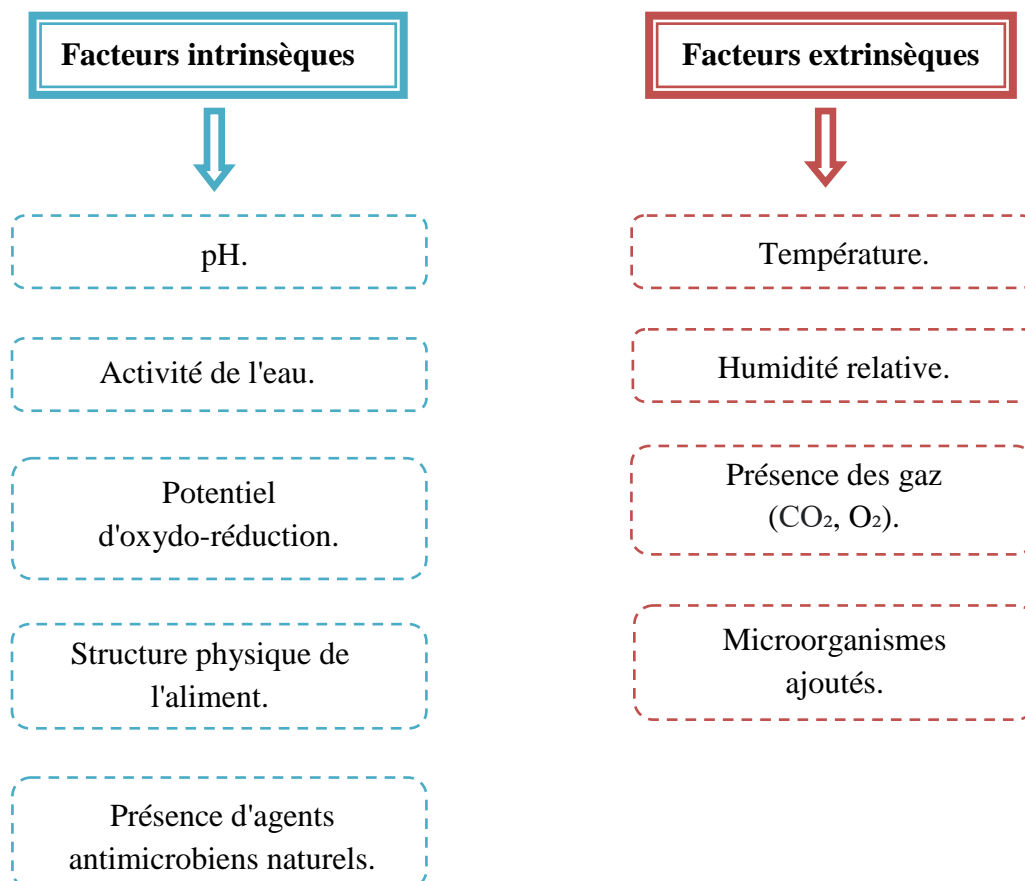


Figure 1 : Classification des facteurs d'altération des aliments.

3.1. Facteurs intrinsèques

3.1.1. pH

Pour un microorganisme donné, la vitesse de croissance en fonction du pH passe par un optimum. Ce sont souvent des activités enzymatiques sensibles au pH qui sont les facteurs limitants de la croissance microbienne (figure 2).

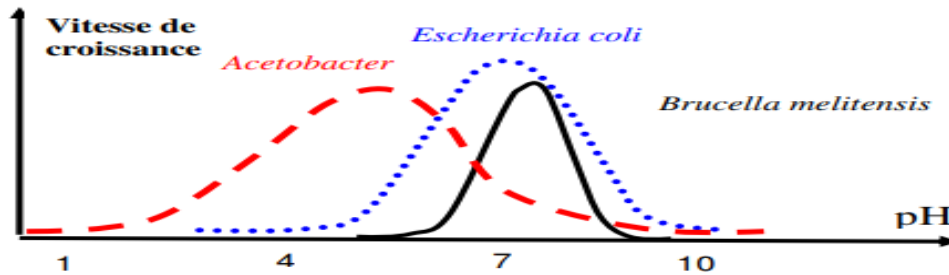


Figure 2 : La vitesse de croissance de quelques microorganismes en fonction du pH (Jean-Louis, 2007).

Le pH joue un rôle crucial dans le développement des microorganismes. Un pH bas favorise les levures et les moisissures, tandis qu'un pH neutre ou alcalin favorise les bactéries responsables de la putréfaction. Chaque type de microorganisme a un niveau de pH optimal pour sa croissance. Les activités enzymatiques sensibles au pH limitent souvent la croissance microbienne (figure 3).

L'altération de la conformation des protéines à un pH spécifique peut entraîner la perte d'activité, ce qui arrête la croissance des microorganismes si l'activité est essentielle à leur survie. Les aliments sont classés en deux groupes en fonction de leur pH (inférieur ou supérieur à 4,5). Les altérations et la prolifération des bactéries pathogènes se produisent principalement dans les aliments avec un pH compris entre 4,5 et 9,5. La prolifération des microorganismes est favorisée lorsque le pH de l'aliment se rapproche de leur pH de croissance optimal.

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>E coli</i>											
<i>S. aureus</i>											
<i>Pseudomonas .aeruginosa</i>											
<i>Acinéto bacter .baumannii</i>											
<i>Levures</i>											
<i>Moisissures</i>											

Figure 3 : Développement des microorganismes en fonction du pH.

3.1.2. Activité de l'eau (a_w)

La multiplication des microorganismes nécessite de l'eau disponible, caractérisée par son activité (a_w) déterminée par le rapport de la pression partielle de l'eau dans l'aliment par rapport à celle de l'eau pure. L' a_w varie de 0 à 1.

Différentes méthodes permettent de réduire l' a_w dans les aliments, comme la congélation, la déshydratation, le salage et le sucrage.

Une a_w inférieur à 0,65 empêche la multiplication des microorganismes, mais ils peuvent survivre. Une a_w inférieur à 0,85 empêche la multiplication des microorganismes pathogènes, sauf certaines moisissures produisant des mycotoxines comme le montre la figure 4 (Jean-Louis, 2007).

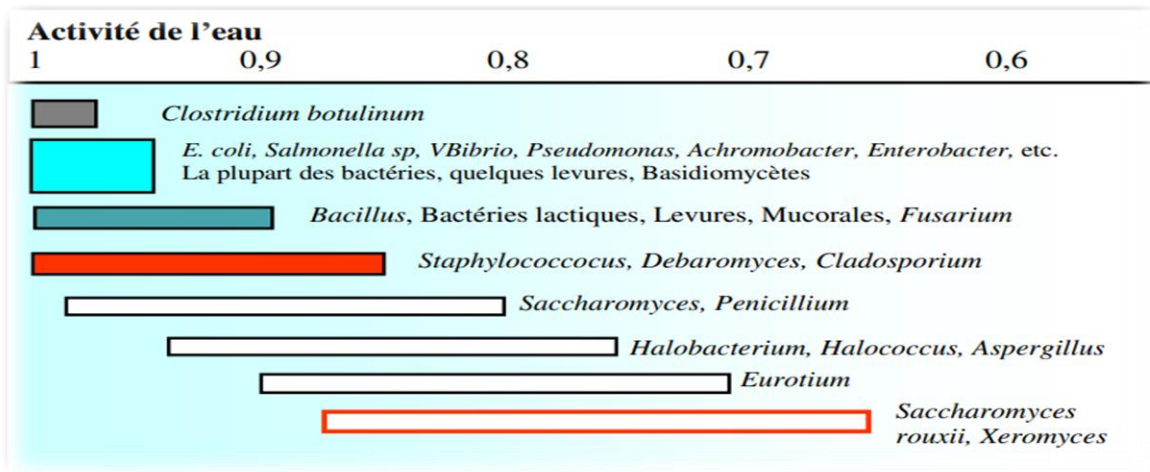


Figure 4 : Développement des microorganismes en fonction de l' a_w (Jean-Louis, 2007).

3.1.3. Potentiel d'oxydo-réduction

Un faible potentiel d'oxydo-réduction favorise le développement de microorganismes. Par exemple, les produits carnés, comme les bouillons, contiennent beaucoup de molécules qui sont directement disponibles pour les microorganismes, puisque leur potentiel d'oxydoréduction est faible (Jean-Louis, 2007).

En d'autres termes, la disponibilité de substrats réducteurs favorise la croissance microbienne dans ces produits alimentaires.

- Les moisissures et les levures aérobies strictes se développent en surface en formant des voiles plus ou moins épais.
- Les levures fermentantes se multiplient en profondeur avec production de gaz.
- Les *Clostridium* ne se développent qu'en absence d'oxygène (masse, conserve..).
- Les *Pseudomonas* ne se développent qu'en présence d'oxygène (surface).
- Les *Lactobacillus* microaérophiles ne se développent qu'à une teneur réduite en oxygène (Jean-Louis, 2007).

3.1.4. Structure physique de l'aliment

La surface de l'aliment joue un rôle crucial dans la prolifération des microorganismes. Le broyage ou le hachage de la nourriture augmente sa surface et crée des points d'entrées pour les germes contaminants, ce qui favorise leur propagation à travers l'aliment. Cela peut rendre les produits alimentaires insalubres. Par exemple, une boulette de bœuf hachée est plus susceptible d'être rapidement contaminée que d'autres coupes de viande, telles qu'un steak entier. En revanche, les pelures de fruits et de légumes agissent comme une barrière contre les microorganismes en limitant leur accès à la chair de l'aliment.

3.1.5. Présence d'agents antimicrobiens naturels

Ce sont des composés présentant soit des propriétés bactériostatiques, soit des propriétés bactéricides. Parmi ces substances, on peut citer l'éthanol ainsi que des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide tartrique, l'acide malique, et autres.

Divers aliments renferment des agents antimicrobiens d'origine naturelle, lesquels entravent la croissance de certains microorganismes. Les épices, par exemple, abondent en ce type d'agents. Parmi celles-ci, la sauge et le romarin se distinguent en tant qu'épices les plus puissamment antimicrobiennes. La cannelle, la moutarde et l'origan, quant à elles, renferment d'autres inhibiteurs chimiques. L'ail, riche en allicine, et le clou de girofle, contenant de l'eugénol (molécule organique conférant l'arôme caractéristique du clou de girofle), figurent également parmi ces agents antimicrobiens.

La coumarine, une enzyme présente dans les fruits et légumes, agit aussi comme un antimicrobien (Dion, 2000).

3.2. Facteurs extrinsèques

3.2.1. Température

La température joue un rôle crucial dans la croissance des microorganismes. L'augmentation de la température accélère les réactions métaboliques, Cependant, une augmentation de la température peut également accélérer la dénaturation des protéines bactériennes, entraînant une diminution de la croissance (figure 5).

Les microorganismes peuvent être classés en trois principales catégories en fonction de leur préférence de température :

- Les thermophiles peuvent se multiplier à des températures élevées (45 à 80°C).
- Les mésophiles qui se développent dans une plage de température allant de 15 à 45°C.
- Les cryophiles, également appelés psychrophiles ou psychrotrophes, ont une température optimale de croissance voisine de 15°C.

Il est important de noter que la thermophilie et la thermorésistance sont deux concepts distincts. La thermophilie se réfère à la capacité d'un microorganisme à se multiplier à des températures élevées, tandis que la thermorésistance fait référence à sa capacité à survivre à un traitement thermique spécifique (Jean-Louis, 2007).

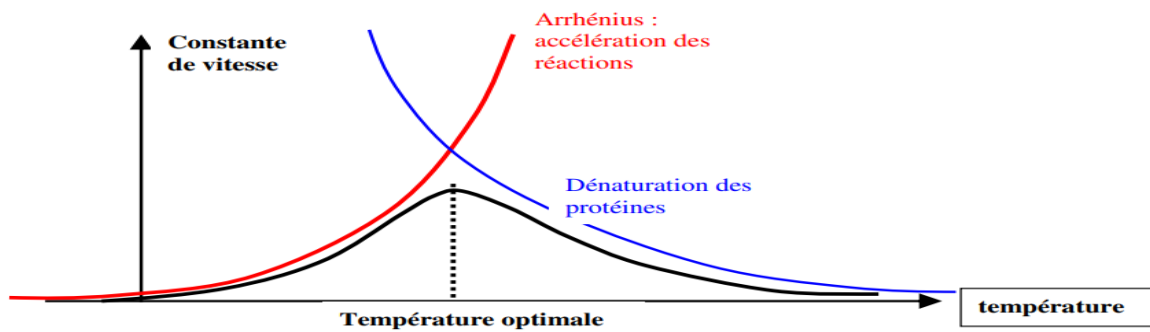


Figure 5 : Constante de vitesse dénaturante des protéines en fonction de la température (Jean-Louis, 2007).

3.2.2. Humidité relative (HR)

L'humidité relative du lieu d'entreposage influence l'activité de l'eau dans l'aliment et la croissance des microorganismes en surface. Il est essentiel de contrôler l'humidité relative pour éviter une augmentation de l'activité de l'eau qui favoriserait la croissance microbienne.

Par exemple, lorsque l'activité de l'eau d'un aliment est de 0,6, il faut prévenir une augmentation de l'activité de l'eau en surface qui permettrait la croissance des microorganismes.

3.2.3. Présence et concentration de gaz

La notion d'atmosphère contrôlée est une méthode de conservation ancienne. En augmentant la concentration de dioxyde de carbone (jusqu'à 10%) et en réduisant la quantité d'oxygène, on peut améliorer la conservation des fruits et légumes (4^{ème} gamme) en retardant la croissance de certains microorganismes, notamment les moisissures.

Utiliser une atmosphère d'azote ou emballer sous vide permet de prévenir les contaminations par des microorganismes aérobies.

4. Conséquences de l'altération microbienne

4.1. Les conséquences pour la santé liées à la présence de micro-organismes

La prolifération non contrôlée de micro-organismes dans un aliment peut poser des problèmes au niveau industriel, mais aussi au niveau sanitaire. Les risques encourus varient en fonction de nombreux paramètres (Roussary, 2010) :

- Nature du micro-organisme.
- Niveau de contamination (dose infectante).
- Nature de l'aliment.
- L'état physiologique du consommateur.

4.2. Maladies alimentaires

Les maladies alimentaires sont causées par la consommation d'aliments ou de boissons contaminés par des agents pathogènes tels que des bactéries, virus, des parasites ou des toxines. Les symptômes des maladies alimentaires peuvent varier en fonction de l'agent pathogène responsable, mais peuvent inclure des nausées, des vomissements, de la diarrhée, de la fièvre, des crampes abdominales et des maux de tête.

Les bactéries sont souvent la cause la plus courante de maladies alimentaires, notamment *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Listeria monocytogènes*. Ces bactéries peuvent se trouver dans des aliments tels que la viande crue ou insuffisamment cuite ou longtemps réfrigérer, les œufs, les produits laitiers, les fruits de mer et les fruits et légumes crus (figure 6).

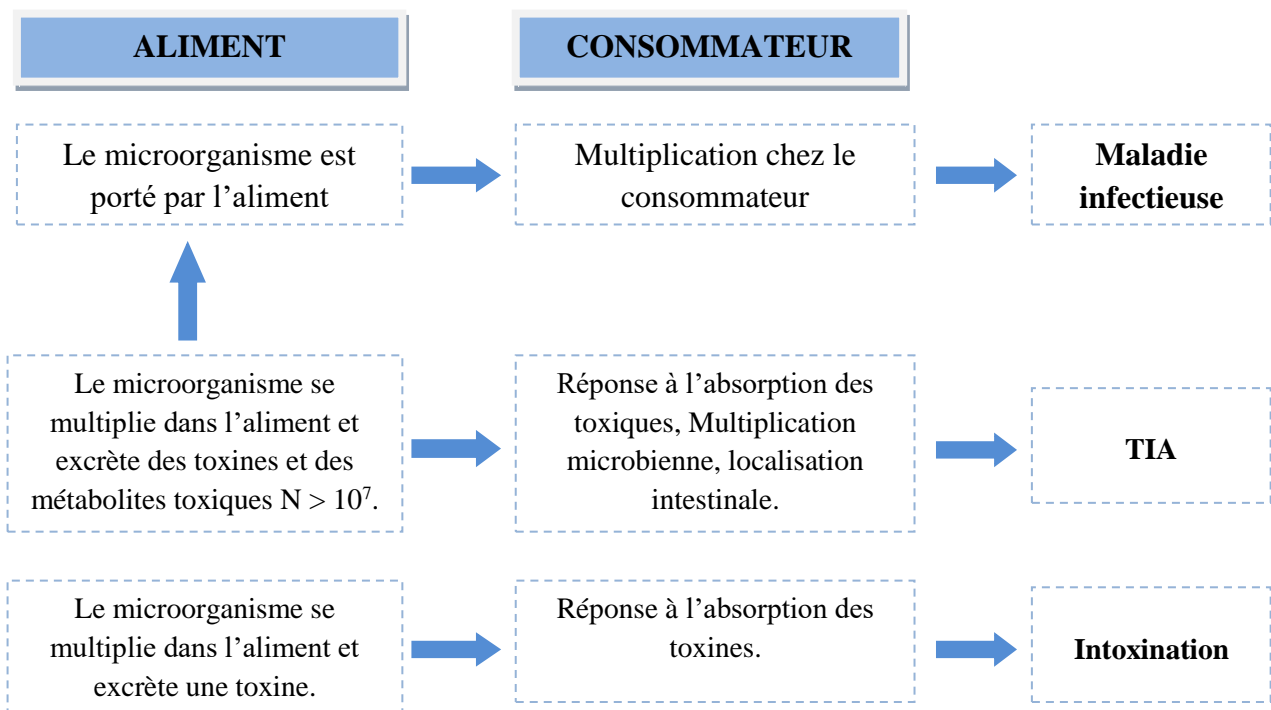


Figure 6 : Les principales interactions aliment / microorganisme / consommateur (Lesage, 2013).

Chapitre II :

**Agents antimicrobiens : Chitosane et
Huile essentielle de thym**

I. Agents antimicrobiens

I.1. Concept des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont des substances ou des composés qui ont la capacité d'inhiber ou de tuer des micro-organismes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils peuvent être utilisés pour traiter les infections microbiennes chez l'homme, l'animal et les plantes. Ces agents peuvent être synthétisés chimiquement ou obtenus à partir de sources naturelles telles que les plantes, les bactéries et les champignons (Russell, 2007).

En d'autres termes, un agent antimicrobien est toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (CE, 2001).

Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus forts que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (Perry et *al*, 2002).

I.2. Types d'agents antimicrobiens

On distingue trois types d'agents antimicrobiens selon leur nature : agents naturels, agents synthétiques (chimiques) et agents biologiques (Guiraud, 2003).

I.2.1. Agents naturels

Les consommateurs des pays industrialisés souhaitent aujourd'hui disposer de produits non traités contenant peu de conservateurs synthétiques mais dont la qualité sanitaire doit bien sûr être préservée. Pour répondre à cette nouvelle demande sociétale, les industriels se sont tournés vers des antimicrobiens dérivés de plantes, de produits animaux ou encore de micro-organismes.

Il pourrait aussi être envisagé dans ce contexte de remplacer, pour les traitements de surface, les désinfectants chimiques par des antimicrobiens alternatifs naturels. Parmi ces antimicrobiens « naturels », se trouvent les composés aromatiques d'huiles essentielles, des acides ou certains sels...

Knowles et Roller (2001) ont démontré l'efficacité du chitosane et du carvacrol sur différents micro-organismes pathogènes ou d'altération, adhérents sur de l'acier inoxydable. Par ailleurs, l'activité antimicrobienne de trois composés aromatiques extraits de plantes, le thymol, le carvacrol et l'eugénol, a été testée sur des cellules planctoniques et sur des cellules adhérentes à de l'acier inoxydable (Dubois-Brissonnet et *al.*, 2006).

I.2.2 Agents chimiques (synthétiques)

Les procédures de nettoyage ne permettant qu'une élimination partielle de la bio-salissure, les traitements de désinfection restent nécessaires pour assurer l'hygiène des matériaux. Outre l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique...), les agents chimiques sont couramment employés pour la désinfection des surfaces inertes. L'efficacité de ces agents reste toutefois variable d'une application à une autre.

En effet, de nombreux auteurs ont observé que les bactéries organisées en biofilm étaient plus résistantes aux produits de désinfection que leurs homologues planctoniques (Leche-Vallier et *al.*, 1988 ; Franck et Koffi, 1990 ; Surdeau et *al.*, 2006).

Un agent antimicrobien synthétique est un médicament développé à partir d'un produit chimique introuvable dans la nature. Parmi ces agents chimiques on distingue : les alcools, les phénols, Les aldéhydes...etc.

I.2.3. Agents biologiques

Les actions spontanées ou provoquées des micro-organismes sont susceptibles d'apporter une stabilité à leur environnement, ainsi que de prévenir tout péril pour la santé. Ces attributs peuvent découler de la synthèse de métabolites, tels que des acides ou des composés possédant une activité antimicrobienne, tels que le nitrate, le nitrite présent dans les antibiotiques, ou encore de la dégradation de substrats exploitables par des bactéries pathogènes, et ainsi de suite.

Certains microorganismes sont des prédateurs pour d'autres microorganismes (protozoaire, bactériophages) (Guiraud, 2003).

I.2.4. Agents physiques

Diverses classifications de méthodes physiques sont disponibles, dont la majorité se révèle efficace contre l'ensemble des microorganismes en altérant les acides nucléiques ou les protéines fonctionnelles ou structurales, responsables des effets microbicides ou plus rarement microbiostatiques observés.

La plupart des agents physiques antimicrobiens sont efficace sur l'ensemble des microorganismes (Guiraud, 2003). Les agents les plus couramment utilisés sont : la chaleur, le froid, les radiations ...etc

I.3. Spectre d'action des agents antimicrobiens

Le spectre d'action des agents antimicrobiens est la gamme de micro-organismes qu'ils sont capables d'inhiber ou de tuer.

Certains agents antimicrobiens ont un spectre étroit et ne sont efficaces que contre un nombre limité de micro-organismes, tandis que d'autres ont un spectre large et sont efficaces contre un grand nombre de micro-organismes.

Par exemple, les antibiotiques à spectre étroit sont efficaces contre un nombre limité de bactéries, tandis que les antibiotiques à large spectre sont efficaces contre un grand nombre (Alekhshun et Levy, 2007).

I.4. Combinaison de différents agents antimicrobiens

Les combinaisons d'agents antimicrobiens sont souvent utilisées pour traiter les infections causées par des souches microbiennes résistantes à un seul agent.

D'après Pibiri (2005), les effets antimicrobiens des combinaisons d'agents antimicrobiens, sont définis selon quatre interactions possibles :

- **Indifférence** : l'activité d'un agent antimicrobien n'est pas affectée par d'autres agents antimicrobiens.
- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque agent antimicrobien étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque agent antimicrobien étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des agents antimicrobiens. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque agent antimicrobien pris séparément.

I.5. Détermination des différents paramètres

I.5.1. Sensibilité et résistance des souches microbiennes

Il existe diverses méthodes spécifiques qui peuvent être utilisées pour déterminer la sensibilité (et non la croissance) ou la résistance (croissance) d'une souche microbienne à un agent antimicrobien, telles que :

- Méthode des disques (Milieu solide)
- Méthode des puits (Milieu solide)
- Méthode des spots (MH solide)
- Méthode en milieux liquides (MH liquide)
- Méthode de micro atmosphère (MH solide)

La sensibilité d'une souche microbienne à un agent antimicrobien est déterminée par des tests *in vitro* tels que la diffusion en milieu gélosé ou la dilution en milieu liquide. Les résultats de ces tests sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration minimale bactéricide (CMB) d'un agent antimicrobien pour une souche donnée. La résistance est définie comme l'incapacité d'un agent antimicrobien à inhiber ou à tuer une souche microbienne à des concentrations normalement utilisées pour traiter les infections (Goff, 2010).

I.5.2. Détermination de la CMI des agents antimicrobiens

La CMI est la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui empêche la croissance visible d'une souche bactérienne dans un milieu de culture liquide ou solide. Cette méthode est couramment utilisée pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne à un agent antimicrobien donné. Les méthodes couramment utilisées pour déterminer la CMI comprennent la méthode de la diffusion en milieu gélosé, la méthode de la microdilution en bouillon et la méthode de la dilution en milieu gélosé (Andrews, 2001).

Les résultats de la CMI sont interprétés à l'aide de seuils de sensibilité établis pour chaque agent antimicrobien et chaque espèce de micro-organisme (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

I.5.3. Détermination de la (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) des agents antimicrobiens

La CMB C'est la plus petite concentration aboutissant à la destruction notable de l'inoculum bactérien (par définition, 0,01% de survivants), (Meyer et *al.*, 2008).

La CMF est la plus faible concentration d'un agent antifongique qui tue complètement une souche fongique donnée. Cette méthode est couramment utilisée pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche fongique à un agent antifongique donné. Les méthodes couramment utilisées pour déterminer la CMF comprennent la méthode de la micro-dilution en bouillon et la méthode de la dilution en milieu gélosé (Espinel-Ingroff, 1998).

Les résultats de la CMB et CMF sont également interprétés à l'aide de seuils de sensibilité établis pour chaque agent antimicrobien et chaque espèce de micro-organisme (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

II. Chitosane

La chitine a été découverte par le scientifique anglais A. Hachett, qui a rapporté en 1799 « un matériau particulièrement résistant aux produits chimiques habituels ».Hoppe-Seyler a confirmé en 1894 que le chitosane est la forme désacétylée de la chitine et lui a donc donné son nom actuel (Kangde et *al.*, 2012).

La production de la chitine a débuté en 1920, mais la structure des biopolymères (chitine et chitosane) n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge (Winterowd et Sandford, 1995).

Depuis 1970 la production industrielle et l'utilisation de ces deux biopolymères, issus de ressources renouvelables, sont en constante augmentation (Attila et *al.*, 2009). Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes est devenue économiquement rentable (Ravi, 2000).

II.1. Provenance du chitosane

Le chitosane ne se trouve que rarement dans la nature. Il n'est présent que dans la paroi d'une classe particulière de champignons les Zygomycètes, et chez quelques insectes au niveau de la paroi abdominale des reines termites par exemple (Seng, 1988).

Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est actuellement observé chez les crustacés qui en constituent la principale source au niveau industriel (Crini et *al.*, 2007).

Cependant, d'autres sources de chitine (et donc de chitosane) sont apparues au niveau des autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues chlorophycées, au niveau de l'endosquelette des céphalopodes, ainsi que dans la paroi de certaines levures et bactéries (Figure 7).

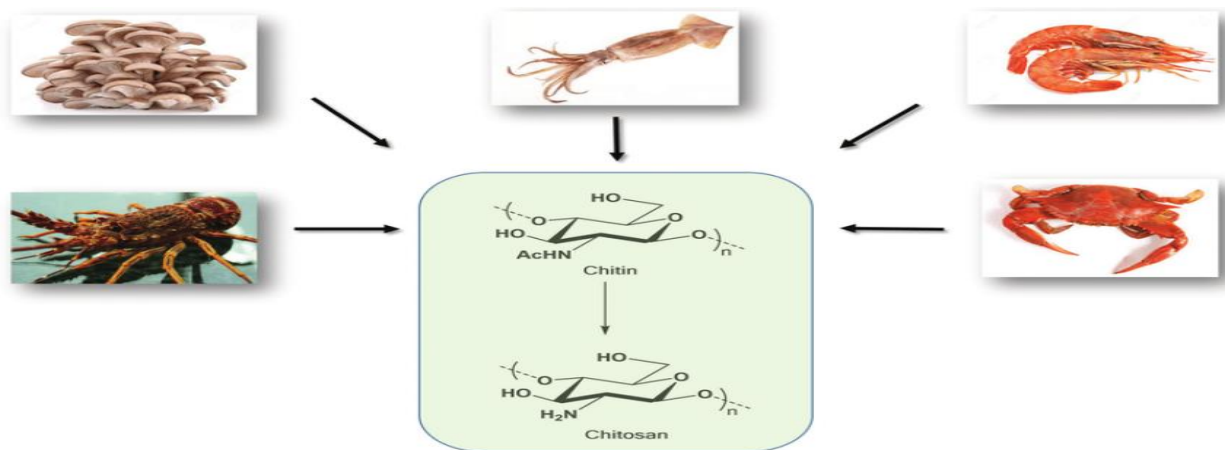


Figure 7 : Sources de chitine et de chitosane (Jardine et Sayed, 2017).

II.2. Agencement chimique du chitosane

Cette molécule naturelle sa structure chimique semblable à celle de la cellulose (De Alvarenga, 2010) et qui s'adresse à toute une famille de copolymères est composée d'un arrangement aléatoire d'unités de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons β -(1-4) (Caroline et *al.*, 2006).

Possédant trois groupements fonctionnels, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6 respectivement, la nature cationique du chitosane lui confère une propriété particulière comparée à la majorité des polysaccharides qui sont généralement soit neutres, soit chargés négativement dans un milieu acide (Cheung et *al.*, 2015).

La structure chimique de ce biopolymère est donnée dans la (Figure 8).

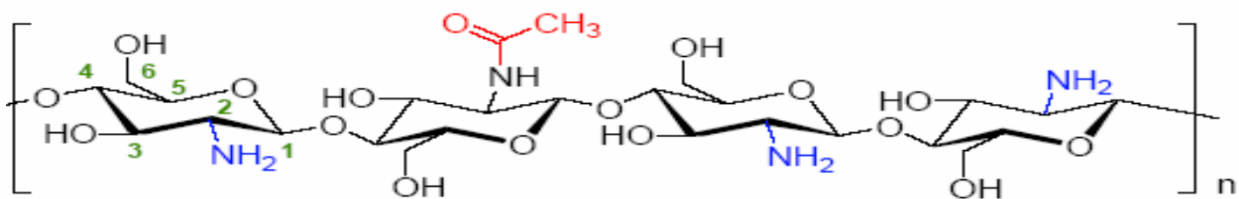


Figure 8 : Structure chimique du chitosane (Olteany et Enescu, 2007).

II.3. Processus d'obtention de chitosane

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine et de chitosane. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, ces méthodes consistent à éliminer les protéines (déprotéinisation), les éléments minéraux (déminalisation), la couleur (blanchiment) et les groupements d'acétamides (désacétylation). La méthode standard pour préparer la chitine et le chitosane est expliquée dans la Figure 9 (Onsoyen et Skaugrud, 1990).

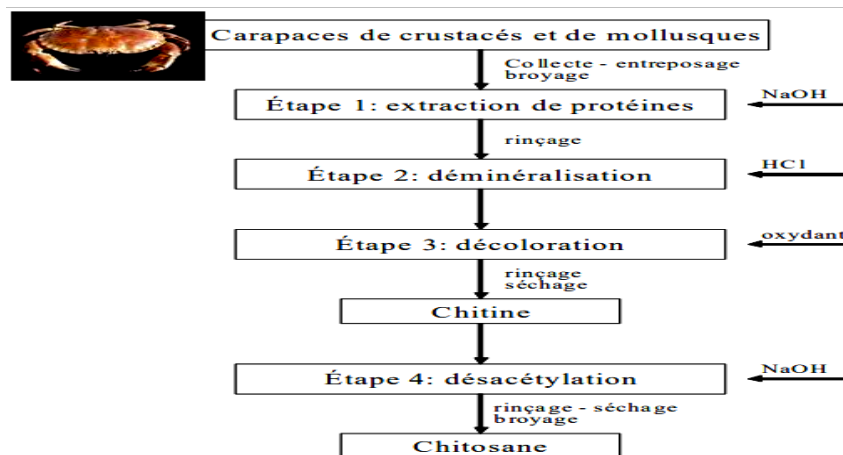
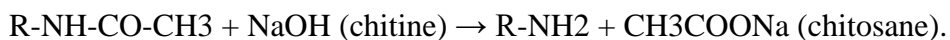


Figure 9 : Procédés de fabrication de chitine et de chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990).

Le processus d'extraction du chitosane selon (Aljawish, 2013) comprend les étapes suivantes :

- **Préparation des carapaces** : Les carapaces de crevettes sont lavées, conservées (3 °C), séchées (103 °C / 20h) et broyées finement.
- **Déprotéinisation** : Les protéines sont extraites des carapaces en les faisant bouillir dans une solution alcaline diluée (NaOH à 3 %) ou en utilisant une enzyme protéinase.
- **Déminéralisation** : Les substances minérales, principalement le carbonate de calcium, sont éliminées en utilisant de l'acide chlorhydrique. Le résidu est filtré, lavé à l'eau déminéralisée et subit un traitement à l'éthanol. Ensuite, il est séché à une température de (65 °C/16h). on obtient un produit déminéralisé entre 0.6 et 0.7 %.
- **Blanchiment** : Une étape de décoloration est effectuée pour éliminer les pigments résiduels à l'aide d'un agent oxydant (KMnO₄, NaOCl ou H₂O₂).
- **Désacétylation** : Les groupements acétyles de la chitine sont hydrolysés en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium.



Ces étapes permettent d'obtenir du chitosane avec un faible pourcentage de matières minérales et un degré de désacétylation (DD) d'environ 90%.

II.4. Propriétés du chitosane

II.4.1. Propriétés physicochimiques du chitosane

Le chitosane possède plusieurs propriétés importantes, notamment :

- **Degré de désacétylation (DDA)** : Le principal paramètre qui distingue la chitine du chitosane. Il est défini comme le rapport molaire des unités D-glucosamine et N-acétyl-D glucosamine dans la structure du polymère.

- **Masse moléculaire (MM) :** Sa détermination qui nécessite la mise en solution du polymère, peut se faire par des mesures viscosimétriques ou par chromatographie .La valeur de la MM d'un chitosane dépend intimement du procédé de fabrication car, celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production (Kalut, 2008).
- **Solubilité :** Alors que la chitine est insoluble dans la plupart des solvants organiques, le chitosane est facilement soluble dans les solutions acides diluées à un pH inférieur à 6,0, tels que les acides acétique, formique et lactique Le plus couramment utilisé est une solution d'acide acétique à 1% à un pH d'environ 4,0 à titre de référence (Kalut, 2008).Au-dessus de pH 7,0, la solubilité du chitosane est médiocre. (Kurita, 2006).
- **Viscosité :** elle dépend du DDA et également de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée), plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (Berth et *al.*, 1998).

II.4.2. Propriétés biologiques du chitosane

- **Biodégradabilité :** elle dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DDA, MM...). L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétylglucosamines et de leur distribution a été aussi mise en évidence (Halla et Chaib, 2017).
- **Biocompatibilité :** elle est d'une importance capitale pour une utilisation thérapeutique potentielle (Ueno et *al.*, 2001) et caractérisée par trois propriétés principales : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité (Aljawish, 2013).
- **Propriétés antibactériennes :** Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes : bactéries, virus, champignons, levures et moisissures (Juneja et *al.*, 2006), plus le chitosane est désacétylée, plus son activité antimicrobienne est forte, plus la concentration en polymères de chitosane est élevée, plus l'activité antimicrobienne est observée, ainsi que le type d'organismes ciblés (Cuero, 1999).
- **Propriétés antioxydantes :** Le chitosane est utilisé pour retarder ou prévenir l'oxydation d'autres composés, principalement les graisses (lipides), ce qui évite le rancissement de certain aliment (Kaminski et *al.*, 2008 ; Wydro et *al.*, 2007).

II.5. Domaines d'application du chitosane

Le chitosane, biopolymère de plus en plus important pour l'industrie, a un impact majeur sur la recherche et le développement dans les domaines de la chimie, de la biologie, de la santé et de la protection de l'environnement. Ses propriétés particulières expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle extraite de la carapace des crustacés, jusqu'à récemment considérée comme un déchet.

Le chitosane a plusieurs domaines d'applications, nous présentons ici les plus prometteuses.

Il s'est avéré que ce coproduit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée et pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor (Muzzarelli, 1997).

II.5.1. Domaine agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments.

En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire (Crini *et al.*, 2007).

Les principales applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont mentionnées dans le tableau I.

Tableau I : Principales applications du Chitosane en Agro-Alimentaire (Desbrières, 2002).

Domaines d'applications	Exemples d'applications
<p>Agroalimentaire :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alimentaire • Emballages <p>Agriculture :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agricole • Animale 	<ul style="list-style-type: none"> • Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation). • Restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande. • Stabilisation de la couleur et des arômes. • Clarification et désacidification des liquides alimentaires. • Préservation des aliments (antibactérien, antioxydant). • Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes). • Support d'immobilisation d'enzymes ou de cellules (fromagerie, domaine diététique, aquaculture). • Emballages biodégradables (comestibles). • Enrobage de semences (encapsulation). • Immobilisation cellulaire (horticulture). • Fongicide « bio-pesticide ». • Fertilisant, protection des cultures, traitement des sols. • Augmentation des rendements. • Films biodegradables (protection des récoltes, des feuillages). • Alimentation animale. • Vaccination animale.

II.5.2. Domaines biomédical et pharmaceutique

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques agent (antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant...). Il est également utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (Chaussard G., 2002).

Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de vieillissement (Ravi Kumar, 2000).

Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes (Prabaharan et Mano, 2005).

II.5.3. Domaine cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations françaises et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés.

Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée au chitosane car il présente diverses fonctions jouant ainsi plusieurs rôles lui permettant d'être utilisés dans des formulations cosmétiques contemporaines (Crini, 2006).

En effet, le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, micro-encapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique.

III. Huile essentielle de thym

Le terme "huile essentielle" est dérivé du nom inventé au 16^{ème} siècle par le réformateur médical suisse Paracelsus von Hohenheim; il a nommé l'ingrédient actif d'un médicament *Quinta essentia*.

Les huiles essentielles HEs sont reconnues depuis l'Antiquité pour leur activité antiseptique considérable. Leur utilisation s'étend à de nombreux domaines, tels que les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

III.1. Notion de l'huile essentielle

Une HE, appelée également « essence végétale = huile volatile », constitue « la matière odoriférante » de la plante aromatique. C'est un mélange naturel de composition assez complexe renfermant des molécules aromatiques volatiles (Ben Abdelkader, 2012).

Les HEs sont définies comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation sèche (AFNOR, 2010).

Généralement, la teneur des plantes en essences végétales est faible de l'ordre de 0,1 à 3% du poids sec du matériel végétal (Hassiotis, 2010).

III.2. Provenance

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs (exemple : la famille des labiées odorantes renfermant presque toute une huile essentielle). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles et moins souvent les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits et les graines (Bruneton, 1999).

T. algeriensis est une espèce à feuilles florales peu différentes des feuilles caulinaires, peu dilatées. Fleurs de 5 à 6 mm. Il pousse dans toutes les régions montagneuses. La longueur peut dépasser les 10 cm (figure 10) (Quezel et Santa, 1963).



Figure 10 : *T. Algeriensis* Bois.& Reut.

III.3. Agencement chimique

L'étude de l'activité biologique d'une HE est intrinsèquement liée à sa composition chimique complexe et à la présence de différents groupes fonctionnels (les alcools, les phénols, les composés terpéniques et les cétoniques) au sein de ses composés constitutifs. Chacun de ces groupes fonctionnels joue un rôle significatif dans les propriétés et les interactions biologiques de l'HE de thym. En analysant en détail ces composés majeurs, il est possible de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à l'activité biologique de cette HE (figure 11).

Les analyses chromatographiques des HEs ont permis d'identifier 48 composés qui représentent (98,87 %) pour *T.algeriensis* du Maroc, dont deux constituants chimiques dominant: le camphre (27,7 %) et l' α -pinène (20,5 %) (Amarti et al., 2010).

D'autres composés sont également présents, mais à des teneurs moins importantes : α -thujène (9,64 %), β -pinène (8,02 %), 1,8-cinéole (7,69 %), limonène (4,85 %), sabinène (3,84 %) et bornéol (2,53 %) (Amarti et al., 2010).

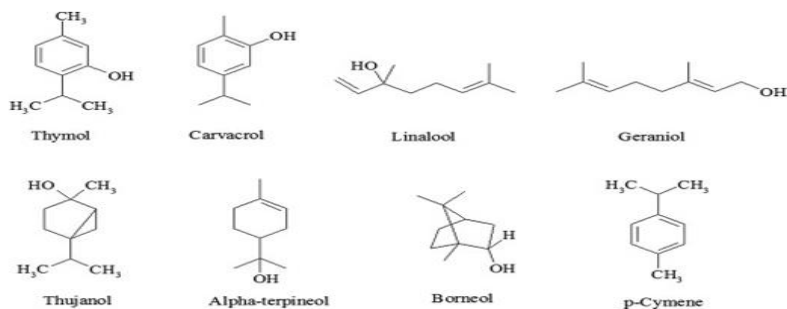


Figure 11 : Structure chimique des huiles essentielles des plantes thymus (Martins, 2020).

Quant au *T. algeriensis* d'Algérie contient comme principaux constituants le linalol (47,3 %), le thymol (29,2 %), le p -cymène (6,8 %) et carvacrol (1,7%) (Dob et al., 2006).

III.4. Processus d'extraction

L'extraction des HEs est effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928).

Trois distillations ont été réalisées par ébullition, pendant 1h30, de 200 g de matériel végétal frais avec 1l d'eau dans un ballon de 2l surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Le rendement en HE a été déterminé par rapport à la matière sèche, évaluée à partir de trois échantillons de 30 g séchés pendant 48 h à l'étuve à 60 °C. L'HE a été stockée à 4 °C dans l'obscurité en présence de sulfate de sodium anhydre. Elle est diluée dans du méthanol (1 %, v/v) avant de procéder aux analyses chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

III.5. Attributs

III.5.1.Caractéristiques

Les HEs ne doivent pas être considérées comme des produits exempts de risques potentiels lors de leur utilisation. Elles font partie de la catégorie des produits naturels, pour lesquels il convient de souligner que leur caractère naturel ne garantit pas automatiquement leur innocuité vis-à-vis de l'organisme. Ainsi, il est essentiel de ne pas présumer de la sécurité absolue des HEs en raison de leur origine naturelle. Cette notion rappelle que la nature intrinsèque d'une substance ne permet pas nécessairement de conclure à son absence de danger pour le corps humain.

L'extraction des HEs des feuilles des parties aériennes de *T. algeriensis* Boiss & Reut récolté en Algérie, a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement obtenu varie de 3.16 - 5.15% (Kouache, 2019).

Les HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leurs pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) (Smith et *al.*, 2000). D'autres HEs ont un effet neurotoxique, les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Franchomme et Penoël, 1990).

Les HEs de plusieurs espèces de thym ont déjà prouvées leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (Pellecuer et *al.*, 1980 ; Benjilali et *al.*, 1987 ; Agnihotri et *al.*, 1996)

III.5.2. Propriétés

Les HEs et les extraits de plantes de *Thymus* présentent différentes propriétés : antioxydante, antibactérienne, antivirale, antifongique, antiparasitaires, anti-inflammatoires et expectorantes, activité tonique, carminatives, digestives, antispasmodiques...(Nikolic et *al.*, 2014).

a. Propriétés physicochimiques

- Liquides à température ambiante, incolores ou jaune pâle.
- Non ou peu miscible à l'eau, Volatiles, odorantes et inflammables.
- Solubles dans les solvants organiques et alcools.
- Densité plus souvent inférieure à 1 (Rhayour, 2002).
- Entraînables par la vapeur d'eau (Bruneton, 1987).
- Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation.

b. Propriétés pharmacologiques

- Pouvoir antiseptique.
- Expectorantes et diurétiques.
- Spasmodiques et sédatives (Vokou et *al.*, 2002).
- Pouvoir irritant (Brunton, 1993).
- Dépurative ou Cicatrisante (Lavande) (Caillard, 2003).
- Activité analgésique (Origan, Thym) (Schwammle et *al.*, 2001).

III.6. Domaine d'application

Les HEs des plantes ont trouvées leurs places en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leurs utilisations sont liées à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Paster et *al.*, 1990 ; Lamiri et *al.*, 2001 ; Cimanga et *al.*, 2002). Dans cette situation, cette HE suscite un vif intérêt au sein de l'industrie alimentaire en raison de son potentiel antiseptique remarquable, tout en étant reconnue unanimement comme une option sûre et fiable.

Les HEs peuvent être exploitées comme additifs antimicrobiens dans les aliments, en raison de leur pouvoir bactéricide ou une activité bactériostatique contre les agents pathogènes d'origine alimentaire (*Salmonella typhimurium*, *E coli* et *S aureus*...etc) (Martins, 2020).

Les HEs sont souvent utilisées pour conserver la viande et les produits carnés car leurs arômes n'altèrent pas les propriétés organoleptiques de ces aliments (Nikolic et *al.*, 2014).



Chapitre III : Emballages alimentaires

I. Concept de l'emballage alimentaire

De nos jours, l'emballage a transcendé son rôle initial qui consistait simplement à préserver les aliments. On entend par « Emballage » un matériau de conteneur secondaire ou tertiaire qui permet de protéger contre les influences extérieures et d'assurer un entretien et un stockage adéquats. Un Emballage multiple est un emballage secondaire de vente, imprimé ou transparent, spécialement conçu pour contenir et exposer un certain nombre d'unités de produits identiques ou différents, chaque unité contenue doit être étiquetée individuellement. En option, il peut contenir un objet promotionnel (CODEX ALIMENTARIUS, 2019).

Les emballages ont un rôle primordial en assurant une barrière protectrice contre divers facteurs externes. Ils préservent contre la prolifération de micro-organismes et servent de bouclier contre les éléments chimiques comme les gaz, l'humidité et la lumière. Ils préservent la qualité nutritionnelle, les caractéristiques sensorielles et la durée de conservation des aliments, tout en offrant une sécurité physique pour le transport et la distribution.

I.1. Evolution de l'emballage

Dans les périodes nomades de l'histoire humaine, l'alimentation reposait sur la cueillette et la recherche de nourriture sans considération pour sa conservation. Cependant, avec l'établissement de communautés et l'utilisation d'outils, la nécessité de contenir et de préserver les aliments est devenue essentielle. Le tableau II résume les évolutions de l'emballage alimentaire.

Tableau II : Quelques développements dans le domaine de l'emballage (Robertson, 2013).

Années	Développement des paquets
1800-1850	1809, Nicolas Appert (France) produit des bocaux en verre hermétiques. 1813, Angleterre, on produit des boîtes de conserve artisanales de viande brevetée. 1824, les conserves sont utilisées par la marine britannique.
1915	1915, la brique de carton Pure-Pak® de lait est commercialisée.
1935	1935, les brasseurs américains commencent à vendre de la bière en canette.
1950-1960	1950, la cellophane est commercialisée et utilisée pour l'emballage. 1956, TetraPak® lance sa forme multicouche tétraédrique pour le lait.
1973	les emballages antimicrobiens ont été utilisés pour prolonger la durée de conservation des aliments.
1986	1986, première utilisation des termes « emballage intelligent » et « emballage interactif ».
2006	2006, les nanotechnologies ont été utilisées pour modifier les propriétés de la surface interne des bouteilles en plastique.

I.2. Caractérisation des matériaux utilisés pour l’emballage

En plus de ne pas être toxiques, selon Šcetar Mario et *al*, 2021, les matériaux d’emballage alimentaire doivent répondre à des exigences importantes, notamment :

- Protection sanitaire et barrière (humidité, gaz, odeur, lumière, graisse).
- Résistance aux chocs.
- Transparence.
- Inviolabilité.
- Facilité d’ouverture, de refermeture et d’élimination.
- Limites de taille, de forme, de poids, D’apparence et d’imprimabilité.
- Faible coût.

I.3. Différentes variétés et niveaux de l’emballage alimentaire

I.3.1. Variétés de l’emballage alimentaire

Šcetar Mario et *al*, 2021, ont découvert que les premières formes d'emballage utilisées par l'homme étaient le lin, les feuilles de bananier et les produits animaux comme le cuir et les estomacs ou vessies, qui sont encore utilisés aujourd'hui.

La production des emballages destinés aux denrées alimentaires requiert l'utilisation d'une gamme variée de matériaux. Parmi ces matériaux figurent le verre, les métaux, les plastiques, le bois, les cartons et les papiers, chacun d'entre eux présentant des caractéristiques de performance spécifiques. En ce qui concerne les emballages en plastique, leur capacité de protection varie en fonction des polymères utilisés lors de leur fabrication.

I.3.2. Niveaux d’emballages alimentaires

Les emballages peuvent être classés en 4 niveaux (Figure 12).

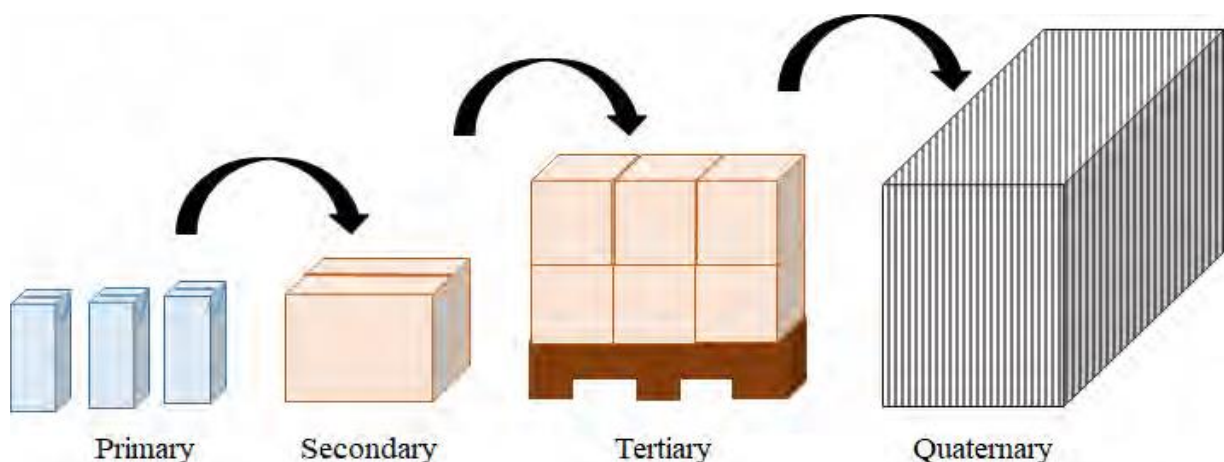


Figure 12 : Niveaux d'emballages alimentaires (Scetar Mario et *al*, 2021).

- **L'emballage primaire :** tel qu'une bouteille en verre, une boîte métallique, un sachet ou une pochette en plastique, revêt une importance primordiale car il est en contact direct avec le produit. Il constitue la principale barrière protectrice.
- **L'emballage secondaire :** regroupe un nombre variable d'emballages primaires en fonction de son type et de sa taille. Par exemple, une pochette en plastique peut contenir des bonbons ou des biscuits emballés individuellement.
- **L'emballage tertiaire :** également appelé emballage de transport, est composé d'un ensemble d'emballages secondaires qui facilitent le commerce national et international, tels que des palettes et des sangles.
- **L'emballage quaternaire :** facilite la manipulation des emballages tertiaires et se présente généralement sous la forme d'un grand conteneur métallique pouvant contenir de nombreuses palettes lors du transport par bateau ou par train. Si nécessaire, les conditions à l'intérieur du conteneur, telles que la température, l'humidité, la composition de l'atmosphère et la lumière, doivent être contrôlées.

I.4. Facteurs influençant le choix de l'emballage alimentaire adéquat

Dans leur étude, Lyijynen et *al*, 2003, ont examiné les facteurs qui influencent le choix des emballages alimentaires.

- **La lumière :**

L'emballage alimentaire doit permettre la transmission contrôlée de la lumière afin de mettre en valeur le contenu du produit.

- **La température :**

Il est impératif de choisir un emballage adapté à la température spécifique requise par chaque aliment, afin de préserver ses propriétés intrinsèques, garantir son intégrité lors du stockage, assurer la conservation optimale de sa qualité sensorielle et de sa sécurité alimentaire. L'emballage pour les aliments congelés doit rester flexible et ne pas se fissurer à des températures de stockage (Robertson G.L, 2013 ; Lee, D.S, 2008).

- **L'humidité :**

La gestion de l'humidité, qu'elle soit due à la perte ou à l'absorption, joue un rôle prépondérant dans la détermination de la durée de conservation des aliments. À l'intérieur de l'emballage, se forme un microclimat qui est conditionné par la pression de vapeur d'humidité présente dans l'aliment à la température de stockage, ainsi que par la perméabilité du matériau d'emballage utilisé. Donc il est indispensable de procéder à un contrôle de cette humidité.

- **Les microorganismes :**

Les emballages qui sont pliés, agrafés ou fermés par torsion ne bénéficient pas d'une véritable étanchéité et présentent un risque de contamination par des microorganismes. Les principales sources de contamination microbienne des aliments résident dans des facteurs tels que la présence d'air, d'eau, des thermosoudures inadéquates, ainsi que les déchirures ou les plis du matériau d'emballage.

Dans d'autres procédés, les basses températures de stockage, les faibles teneurs en humidité ou l'utilisation de conservateurs limitent la croissance microbienne et le rôle de l'emballage est moins critique. (Robertson, G.L, 2013).

- **Propriétés mécaniques :**

La capacité d'un emballage à préserver l'intégrité des aliments face aux dommages mécaniques est déterminée par sa résistance à la traction, qui survient lors de l'empilement des véhicules, à l'abrasion due aux frottements lors de la manipulation et du transport, à la perforation ou à la rupture provoquées par des impacts, ainsi qu'aux vibrations lors du transport.

La résistance des matériaux d'emballage peut être évaluée en mesurant l'allongement (déformation) qui résulte d'une force appliquée (contrainte) partir d'un diagramme contrainte déformation ci-dessous (figure 13):

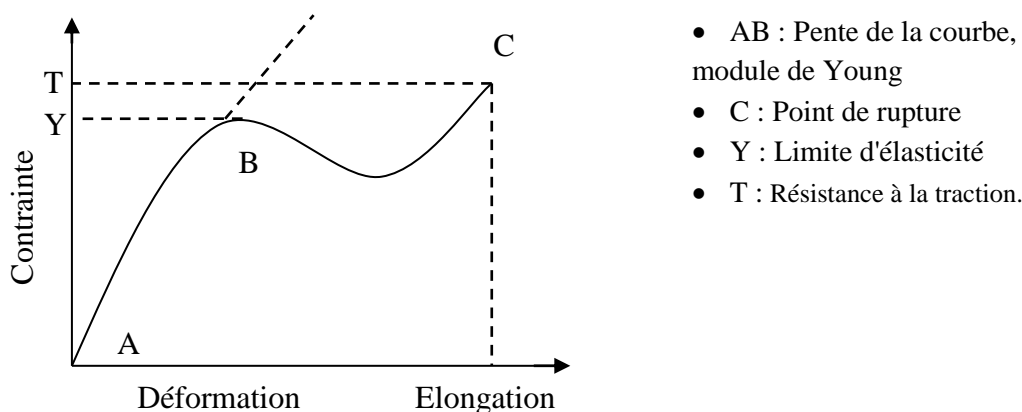


Figure 13 : Courbe de contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible (Briston, J.H., 1980).

I.5. Interaction (aliment/emballage)

Toute forme d'interaction entre un matériau d'emballage et le contenu alimentaire qu'il enveloppe est fortement indésirable, et ce, pour deux raisons fondamentales. Tout d'abord, de telles interactions pourraient entraîner des effets toxiques indésirables pour le consommateur, compromettant ainsi sa sécurité alimentaire. De plus, ces interactions peuvent également réduire la durée de conservation souhaitée ainsi que la qualité sensorielle de l'aliment, affectant ainsi sa fraîcheur, son goût et son apparence.

Les matériaux des emballages plastiques sont principalement des films souples contenant des polymères résiduels et des additifs pour les plastiques, y compris les agents de nucléation, les stabilisants, les plastifiants, les agents antibuée (Lee, D.S, 2008).

Certains types de matériaux d'emballage contiennent également des composés volatils qui peuvent être absorbés et provoquer l'altération des aliments. Ceux-ci peuvent provenir du procédé de fabrication (solvants utilisés) (Lee, D.S, 2008).

II. L'emballage actif

Avant même que la notion d'emballage soit développée, les Égyptiens utilisaient de la cire d'abeille pour préserver les aliments en quelques sortes il est considéré comme un emballage actif.

L'emballage actif a vu le jour au début des années 1970 au Japon. Apparue aux États-Unis au début des années 80 une utilisation importante par le marché militaire. Un peu plus tard, la société « Mark & Spencer », a grandement contribué au lancement de leurs utilisations en Europe, en proposant dans ses rayons à Londres, un produit innovant : du poisson frais fumé sous emballage contenant un emballage actif nommé absorbeur d'oxygène. Dans le domaine des emballages actifs, les brevets déposés concernent dans un premier temps la composition des éléments actifs puis la conception d'emballage dans son intégralité (Gontard, 2000).

De nos jours, l'emballage actif est largement utilisé dans de nombreux secteurs tels que l'alimentaire, la pharmacie, la cosmétique, l'agriculture et l'industrie électronique. Les tendances actuelles dans le domaine de l'emballage actif visent à améliorer la durée de conservation, à réduire le gaspillage alimentaire et à minimiser l'impact environnemental.

II.1. Concept et spécificités de l'emballage actif

II.1.1. Concept de l'emballage actif

L'emballage actif est un emballage destiné à prolonger la durée de conservation ou à maintenir ou améliorer l'état de denrées alimentaires emballées; ils sont conçus de façon à comprendre délibérément des constituants qui libèrent ou absorbent des substances dans les denrées alimentaires emballées ou dans l'environnement des denrées alimentaires. (Réglementation Européenne 450/2009).

L'emballage actif est l'un des concepts innovants d'emballage alimentaire qui ont été introduits en réponse aux changements continus des demandes actuelles des consommateurs et des tendances du marché (Quintavalla, S et Vicini, L. 2002).

Si nous résumons toutes les différentes notions en relation avec nos deux mots « emballage » et « actif » en une phrase: c'est un contenant capable d'agir sur son environnement et/ou son contenu, en réponse ou non à une influence de son environnement, afin de réaliser ses fonctions principales (Gimenez et Aoussat, 2011).

II.1.2. Spécificités de l'emballage actif

L'emballage peut être actif en raison de sa capacité à sélectionner, libérer progressivement, adsorber ou transformer des composés ou des gaz (Figure 14). Par exemple, il peut fournir une perméation sélective à l'oxygène, au dioxyde de carbone ou même à différents composés aromatiques.

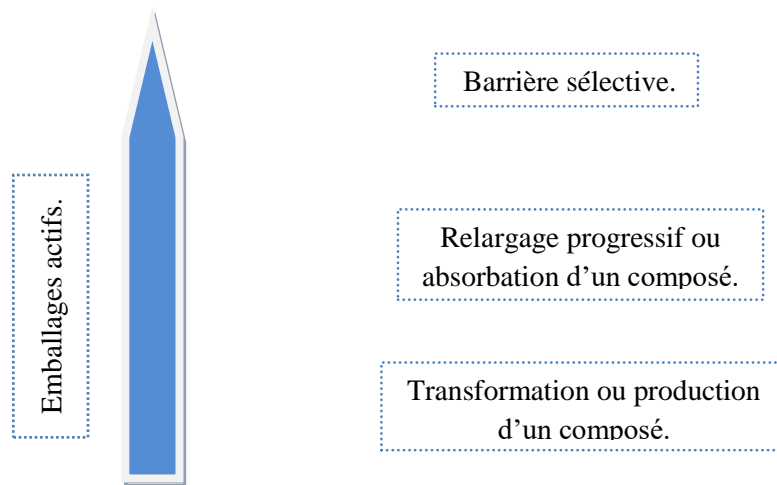


Figure 14 : Principales caractéristiques d'un emballage actif (Gontard, 2000).

II.2. Différentes catégories

Les emballages actifs peuvent être classés en trois grandes catégories selon leur fonctionnalité (figure 15). Voici les trois catégories :

- Les emballages actifs qui portent sur l'aliment pour en améliorer et en préserver la qualité tout au long de la chaîne de distribution.
- Les emballages actifs qui réagissent aux conditions de conservation ou aux caractéristiques de l'aliment pour en informer le consommateur en temps réel.
- Les emballages actifs qui perturbent l'aliment pour en faciliter la consommation.

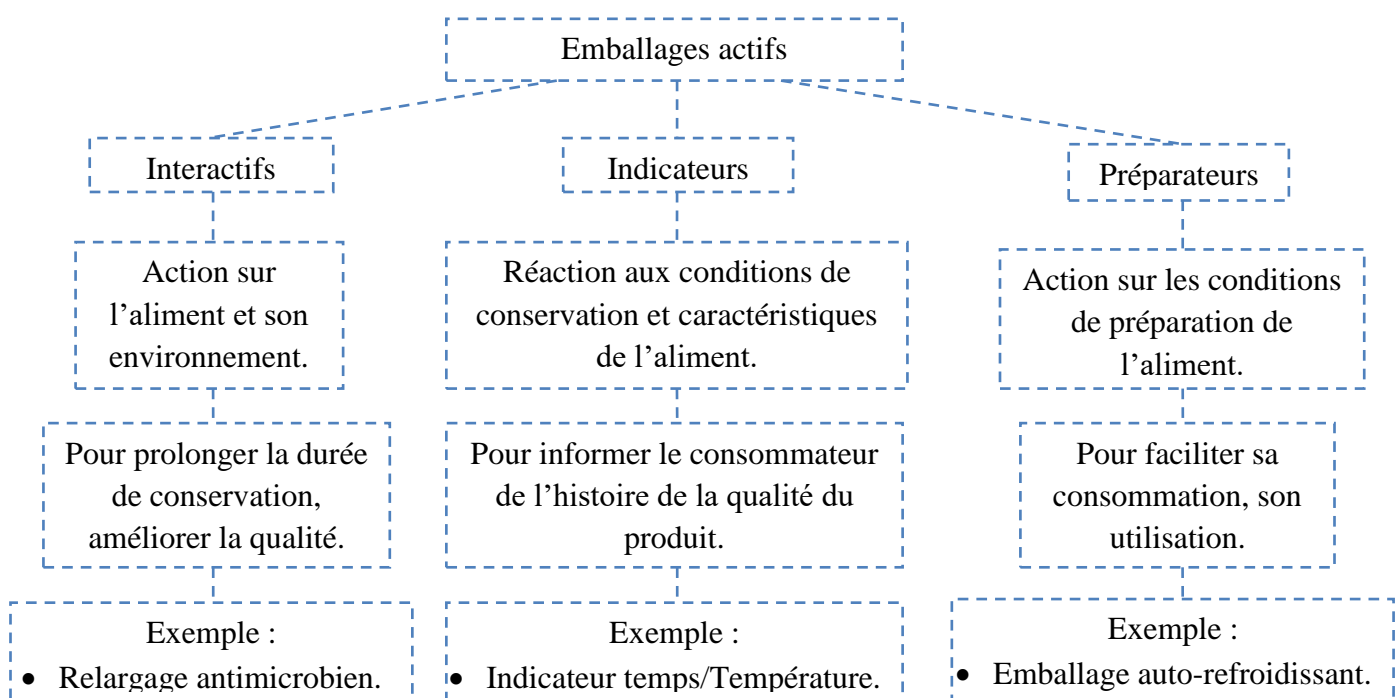


Figure 15 : Les trois grandes catégories d'emballages actifs (Gontard, 2000).

Les Interactifs

Les emballages interactifs sont le fruit d'une ingénierie ingénieuse, conçus pour influencer les propriétés des aliments et agissant de manière ciblée et contrôlée.

Leur objectif principal consiste à maintenir la qualité du produit en créant ou en préservant des conditions optimales pour sa conservation. Ces emballages sont qualifiés de remparts visant à contrer tous les processus de détérioration des aliments tels que le BE, l'oxydation des lipides, ainsi que le développement des micro-organismes, et bien d'autres.

II.3. Emballage actif antimicrobien

III.3.1. Concept des emballages actifs antimicrobiens

Les emballages alimentaires dotés de propriétés antimicrobiennes agissent afin de minimiser, freiner ou différer la croissance des microorganismes potentiellement présents dans les produits emballés ou les matériaux d'emballage associés. Ces derniers représentent une avancée novatrice face aux préoccupations liées à l'origine des denrées alimentaires, offrant ainsi la possibilité d'inhiber la prolifération des microorganismes tout en préservant la qualité, la fraîcheur et la sécurité des produits.

Si un antimicrobien peut être libéré de l'emballage pendant une période prolongée, l'activité peut également être étendue à la phase de stockage, de transport et de la distribution alimentaire (Quintavalla, S. et Vicini, L. 2002).

Actuellement, les emballages dotés de propriétés antimicrobiennes se diversifient dans leur conception, se manifestant sous diverses formes, telles que des sachets contenant des agents antimicrobiens volatils, des films polymères intégrant directement des substances antimicrobiennes, ainsi que des adsorptions d'agents antimicrobiens à la surface du polymère.

III.3.2. Systèmes d'emballage antimicrobien

Les agents antimicrobiens peuvent être initialement incorporés dans les matériaux d'emballage et migrer dans les aliments par une diffusion et une répartition.

La plupart des systèmes d'emballage alimentaire représentent soit un système Emballage / Aliment, soit un système Emballage / Espace libre / Aliment (Figure 16)

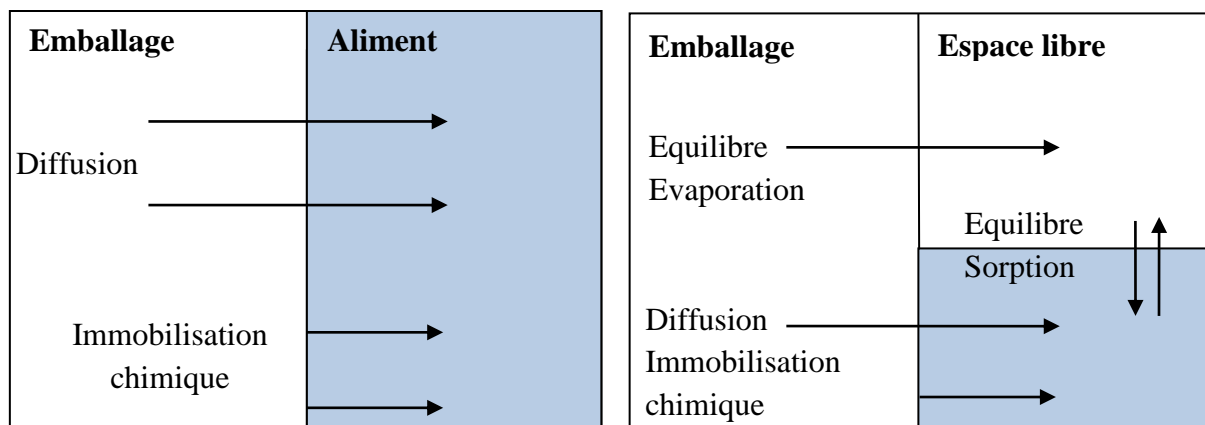


Figure 16 : Systèmes d'emballages alimentaires et comportement des substances actives (Han, J.H. 2000)



Partie II : Partie pratique



Matériel et méthodes

L'objectif principal de cette étude vise à évaluer les propriétés antimicrobiennes du chitosane, de l'HE de thym ainsi que leur combinaison. En parallèle, l'objectif secondaire consiste à évaluer l'efficacité de l'incorporation de l'HE de thym dans un emballage alimentaire destiné à améliorer le conditionnement du poulet.

Cette étude a été réalisée, au sein des deux laboratoires de Microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques, de l'*Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU*, le 1^{er} laboratoire est affilié au département des sciences alimentaires tandis que le 2^{ème} est rattaché au département des sciences biologiques.

De plus, des travaux complémentaires ont été menés au sein du laboratoire de microbiologie du *CHU NEDIR MOUHAMMED*. Ces choix ont permis de bénéficier d'un environnement scientifique propice à la réalisation de cette recherche.

I. Matériel

I.1. Matériel non biologique

I.1.1. Acide acétique

L'acide acétique utilisé est commercialisé par le groupe d'entreprises *VWR International SAS*. Ses caractéristiques, consignées dans la fiche technique présentée en annexe 1.

I.1.2. Diméthylsulfoxyde (DMSO)

Le DMSO est un produit commercialisé par l'entreprise *SIGMA-ALDRICH*. Ses caractéristiques, rapportées dans la fiche technique (Annexe 2).

I.1.3. Cuisses de poulet

Le choix méticuleux de la matrice alimentaire constitue un pilier essentiel de cette recherche, en prenant en compte une série de critères scientifiques bien définis. Dans cette étude, la sélection de la viande de poulet s'appuie sur des facteurs spécifiques :

- La viande de poulet se caractérise par sa composition et sa teneur élevée en eau, la rendant particulièrement sujette à l'altération.
- La faible teneur en graisse de la viande de poulet en fait un aliment idéal pour les consommateurs. Ce critère est primordial si l'on considère l'impact négatif de la matière grasse réduisant l'effet des substances antimicrobiennes retenues par les lipides.
- La disponibilité abondante et l'accessibilité de la viande de poulet sur le marché algérien a été un élément déterminant dans ce choix.

Dans cette étude, les cuisses de poulet utilisées ont été acquises auprès d'un abattoir industriel local réputé pour son strict respect des normes HACCP, le processus d'abattage est présenté en annexe 3. Cette mesure vise à garantir la qualité et la salubrité des produits alimentaires utilisés dans la recherche.

Dans un souci de préservation de la fraîcheur des échantillons, les cuisses de volaille ont été transportées rapidement au laboratoire dès leur acquisition dans un sac isothermique. Par la suite, elles ont été soigneusement conservées à une température de $5 \pm 1^\circ\text{C}$ dans un réfrigérateur.

- Tout matériel employé dans le cadre de cette étude a été méthodiquement répertoriés dans l'annexe 4.

I.2. Matériel biologique

I.2.1. Micro-organismes testés

Dans le cadre de cette étude, quatre souches microbiennes de référence ont été choisies afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des deux substances ainsi que leur combinaison. Il s'agit de deux souches bactériennes : *Eschérichia coli* ATCC 25922 (bactérie à Gram négatif), *Staphylococcus aureus* ATCC 23922 (bactérie à Gram positif) et de deux souches fongiques : *Aspergillus niger* ATCC 16404 (moisissure) et *Candida albicans* 71453 (levure).

Ces souches (Annexe 12) ont été choisies pour leur pathogénicité, de leur résistance aux antibiotiques, ainsi que de leur implication dans les cas de toxi-infections alimentaires. Elles ont été obtenues auprès du laboratoire de microbiologie du département de biologie de l'*Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU*. Quant à *Candida albicans* 71453, elle a été procurée au sein du laboratoire de parasitologie au *CHU Nedir Mouhamed*.

I.2.2. Extraits biologiques étudiés

a. Chitosane

Les échantillons de chitosane testés ont été fournis par l'équipe du Professeur *KADOUCHE Slimane*, au sein du département de chimie de la faculté des sciences de l'*Université Mouloud Mammeri de TIZI OUZOU*. Le chitosane fourni a été obtenu par extraction de la chitine à partir des exosquelettes de crevettes, puis par désacétylation de l'extrait brute comme illustré dans la figure 17.



Figure 17 : Chitosane extrait des exosquelettes de crevettes recueilli localement
(a) : Exosquelettes de crevettes ; (b) : chitosane.

b. Huile essentielle de thym

L'huile essentielle de thym utilisée a été acquise auprès de l'entreprise *BIOPPAM Industrie* (figure 18). Ses caractéristiques, sont les suivantes :

- Espèce : *Thymus Algeriensis*.
- Chémotype : thymol.
- Présence de P-Cymène / γ -Terpinène / E- β -Caryophyllène.
- Famille : Lamiaceae.
- Organe de production : parties aériennes.
- Obtention à partir de plantes spontanées.



Figure 18 : l'HE de Thym d'Algérie.

I.2.3. Disques témoins positifs

Deux disques ont été rigoureusement sélectionnés pour leurs propriétés antimicrobiennes. Le 1^{er} disque (ATB), contenant de la Gentamicine (CN 10), a été utilisé pour l'antibiogramme. Le 2^{ème} disque (antifongique), renfermant du Ketoconazole (KET 50), a été employé pour l'antifongigramme.

Le choix de ces disques est justifié par leurs capacités à inhiber spécifiquement la croissance de certains micro-organismes. Ces disques ont été utilisés dans le cadre des méthodes d'évaluation de la sensibilité des agents antimicrobiens.

- Les composants des milieux de cultures employés dans le cadre de cette étude ont été méthodiquement répertoriés dans l'annexe 6.

II. Méthodes

II.1. Vérification des souches de référence

Afin de vérifier la pureté des souches utilisées nous avons effectué des examens microscopiques et macroscopiques en faisant un état frais, une coloration simple et une coloration de Gram à partir des deux boîtes de Petri.

II.1.1. Etude macroscopique (Observation macroscopique)

Cette observation repose sur des critères morphologiques tels que l'aspect des colonies.

II.1.2. Examen microscopique

a. Etat frais

- **Principe**

Observer les bactéries vivantes. Ceci permet de :

- Mettre en évidence leur mobilité.
- Mettre en évidence leur mode de groupement.
- Faire une approche de leur morphologie.

- **Mode opératoire**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever une fraction de culture en grattant une colonie isolée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et l'incorporer à la goutte d'eau.
- Recouvrir d'une lamelle sans enfermer de bulles d'air et sans faire déborder la suspension.
- Observer à l'objectif (G10 x 40).

- **Critère d'acceptation**

Observation de la mobilité : une bactérie est mobile si à l'état frais on observe un déplacement dans le sens inverse du courant de la suspension.

Observation de forme de la bactérie : il existe 02 formes différentes de bactéries cocci ou bacille.

b. Coloration simple

En plus d'observer la mobilité et la forme, on effectue une coloration des bactéries afin de mieux les observer (structure / arrangement).

- **Mode opératoire**

- Déposer une goutte de bleu de méthylène au centre de la lame.
- Gratter une colonie isolée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et mettre en suspension la goutte du BM.
- Recouvrir d'une lamelle sans enfermer de bulles d'air et sans faire déborder la suspension.
- Observer à l'objectif (G10 x 40).

c. Coloration de Gram

En plus de la morphologie, du mode de regroupement et de la coloration des cellules bactériennes, la coloration de Gram, permet de différencier entre les deux types de bactéries (Gram + et Gram -) selon la capacité des différentes structures de la paroi bactérienne à retenir ou non la coloration violette du violet de gentiane.

La technique de la coloration de Gram est réalisée selon les étapes suivantes :

• Préparation des frottis

- Déposer sur une lame une goutte d'eau physiologique stérile.
- Prélever stérilement une fraction de culture et l'incorporer à la goutte d'eau pour obtenir une suspension homogène.
- Sécher et fixer le frottis à la chaleur au-dessus de la flamme du bec bunsen.

• Coloration

- Recouvrir la lame de violet de Gentiane. Laisser agir 1 minute et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Recouvrir la lame d'une solution de Lugol. Laisser agir 1 minute et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Décolorer la lame à l'aide d'Ethanol à 96° pendant 5 à 10 s et rincer aussitôt à la pissette d'eau déminéralisée.
- Recouvrir la lame de la fuchsine diluée à 1/10. Laisser agir 30 s et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Sécher et fixer à la chaleur au-dessus de la flamme du bec bunsen et déposer une goutte d'huile de vaseline ensuite observer à l'immersion, objectif x 100.

La coloration permet de séparer les bactéries en 02 groupes :

- Une coloration en « rose » indique des bactéries « Gram négatives ».
- Une coloration en « violet » indique des bactéries « Gram positives ».

II.1.3. Repiquage

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur des milieux de cultures sélectif favorable à leur croissance pendant 24 h à l'obscurité à 37 °C.

• Mode opératoire

- Dans des conditions stériles, prélever une colonie isolée et représentative de la souche à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- Etaler en stries sur une nouvelle boîte de milieu de culture sélectif pour chacune des souches.
- Cultiver à 37 °C (température ambiante).

Si les nouvelles cultures obtenues sont représentatives de celle reçues initialement, il est possible de poursuivre la culture et le repiquage des souches à partir de ces boîtes fraîchement obtenues.

Dans le but de la purification des différentes souches, une stratégie est mise en œuvre pour maintenir la souche dans un état de vigueur en effectuant une opération de repiquage à intervalles réguliers de 72 h.

II.2. Préparation des suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens

II.2.1. Préparation des suspensions microbiennes

a. Préparation de la suspension bactérienne et de levure

Pour mener à bien cette étape, une standardisation est essentielle pour obtenir des résultats fiables :

- Les souches conservées à 4 °C sontensemencées sur des milieux de culture sélectifs appropriés pour chacune des bactéries (gélose Hektoen pour *E. coli*, gélose Chapman pour *S. aureus*) et sur le milieu de culture Sabouraud pour la levure.
- Elles sont ensuite incubées à une température de 37 °C pendant 18 heures pour les bactéries et à une température de 25 °C pendant 48h pour la levure.
- Une à deux colonies bien isolées sont prélevées dans des tubes de 9 ml d'eau physiologique stérile (annexe 5).
- Après agitation de la suspension au vortex, on procède à la standardisation à l'aide d'un spectrophotomètre en faisant en sorte d'avoir une absorbance situé entre 0,08 et 0.1 pour les bactéries et 0.04 pour les levure (en ajoutant une colonie ou en diluant avec de l'eau physiologique stérile).
- L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 625 nm.

Nous considérons que les absorbances allant de 0,08 à 0.1 pour les bactéries et de 0.04 pour la levure et la moisissure correspondent à une concentration de 10^7 UFC/ml.

b. Préparation de la solution sporale

Les spores des jeunes cultures (cultures de 3 jours) sont récoltées en utilisant une méthode scientifique. Pour cela, 14 ml d'eau physiologique stérile sont versés dans une boîte de Petri préalablement incubée. Ensuite, la solution est filtrée à l'aide de 2 compresses stériles dans un flacon stérile destiné aux ECBU. La suspension obtenue est transférée dans un tube Falcon pour être centrifugée à 6000 tours par minute pendant 30 minutes (Touaibia, 2015).

Cette étape permet d'obtenir une répartition uniforme des spores dans l'eau physiologique. En outre, afin de standardiser la concentration des spores à 10^7 spores/ml, la densité optique (DO) de la suspension fongique est évaluée. Cela est réalisé en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

Il a été établi que lorsque la densité optique atteint 0,04, la concentration des spores dans la suspension est de 10^7 spores/ml (Nabet, 2009).

II.2.2. Préparation des solutions des agents antimicrobiens

Extraction du chitosane

- Collecte de déchets de crevettes de l'unité de conditionnement des fruits marins, située au niveau du port d'AZEFFOUN. Ces crevettes ont été pêchées au large de la même ville.
- Nettoyage, séchage et broyage des carapaces.
- Déminéralisation des carapaces dans l'acide chlorhydrique (HCl) 2N sous agitation pendant 24 heures, avec un rapport de 1g de carapaces dans 10 ml de solution (PC).
- Déprotéinisation avec une solution d'hydroxyde de Sodium (NaOH) 1N à 80°C pendant 3 heures (pas toute la quantité), avec un rapport de 1 g de carapaces dans 10 ml (PC).
- Blanchiment avec de l'eau oxygénée (H_2O_2) 30V, pendant 30 minutes avec un rapport de 1g de masse résultante dans 10 ml de solution (PC).
- Suivi de la cinétique de désacétylation chimique de la chitine dans un milieu alcalin (température ambiante et concentration en NaOH de 35% au lieu de 45% qui se fait habituellement) et effectuer en parallèle des désacétylation à 120 (± 3 °C) avec la variation du temps de la désacétylation (30min; 1h30min; 2h30min; 3h30min et 5h).
- Après chacune des 4 étapes (déminéralisation, déprotéinisation, blanchiment et désacétylation), l'échantillon subit plusieurs lavages jusqu'à stabilisation du pH.

a. Préparation des solutions du chitosane

La solution du chitosane est obtenue en pesant 2 g du chitosane qui est ensuite introduit dans 1 litre d'acide acétique, qui constitue le volume nécessaire pour que le chitosane atteigne la saturation maximale en termes de solubilité dépendante du degré de désacétylation (Poirier, 2000).

Différentes préparations ont été réalisées pour les solutions de chitosane, à la fois fortement désacétylé et faiblement désacétylé :

- **Solution 1**

Une quantité précise de 2 mg de chitosane fortement désacétylé a été soigneusement pesée à l'aide d'une balance de précision. Cette quantité a été introduite dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %. Par la suite, une agitation modérée a été appliquée pour obtenir une dispersion homogène du chitosane dans la solution d'acide acétique.

- **Solution 2**

De manière similaire, une quantité précise de 1 mg de chitosane fortement désacétylé a été pesée avec précision. Cette quantité a été introduite dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1%, suivi d'une agitation modérée afin de permettre une dispersion homogène du chitosane dans la solution d'acide acétique.

- **Solution 3**

Pour la préparation du chitosane faiblement désacétylé, une quantité précise de 2 mg a été minutieusement pesée à l'aide d'une balance de précision. Cette quantité a ensuite été introduite dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %. Une agitation modérée a été appliquée pour assurer une dispersion homogène du chitosane dans la solution d'acide acétique.

- **Solution 4**

Enfin, une quantité précise de 1 mg de chitosane faiblement désacétylé a été soigneusement pesée à l'aide d'une balance de précision. Cette quantité a été ajoutée à un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %. Une agitation modérée a été réalisée pour garantir une dispersion homogène du chitosane dans la solution d'acide acétique.

b. Préparation des solutions de l'HE de thym

Dans des conditions stériles, nous avons procédé à une dilution décimale de l'HE de thym dans du DMSO. Tout d'abord, le DMSO a été autoclavé pour garantir sa stérilité. Ensuite, nous avons préparé trois dilutions comme suit :

- **Dilution 1**

- Dans un tube en verre stérile, ajouter avec précision 1 ml d'HE de thym.
- À l'aide d'une pipette graduée de 10 ml, mesurez avec précision 9 ml de DMSO et l'ajouter au tube contenant l'HE de thym.
- Mélanger soigneusement le contenu du tube pour garantir une dispersion homogène de l'HE de thym dans le DMSO.
- Stocker la solution diluée dans des conditions appropriées, en évitant l'exposition directe à la lumière, à température ambiante.

- **Dilution 2**

- Prélever 1 ml de la solution diluée précédente (solution 1).
- Puis l'ajouter à 9 ml de DMSO dans un autre tube stérile.
- S'assurer de bien mélanger pour obtenir une solution uniforme.

- **Dilution 3**

- Prélever 1 ml de la solution diluée précédente (solution 2).
- Ensuite l'ajoute à 9 ml de DMSO dans un autre tube stérile.
- Effectuer un mélange minutieux pour garantir une dispersion homogène des composants.

c. Préparation de la combinaison du chitosane et HE de thym

Une combinaison d'agents antimicrobiens a été mise en œuvre, impliquant le chitosane et l'HE de thym. Cette dernière a été réalisée en combinant avec précision 100 µl de la **solution 4** du chitosane avec 100 µl de la **Dilution 1** de l'HE de thym.

En combinant ces deux solutions avec une grande précision, on a cherché à tirer parti des propriétés antimicrobiennes individuelles du chitosane et de l'HE de thym, dans l'espoir de potentialiser leur action synergique.

II.3. Évaluation de l'effet antimicrobien du chitosane, de l'HE de thym et de leur combinaison

✚ La méthode de l'antibiogramme (méthodes des disques)

Les effets antimicrobiens du chitosane et de l'HE de thym, ainsi que leur combinaison, ont été examinés vis-à-vis de quatre souches microbiennes (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *A. niger*). Cette évaluation a été réalisée en utilisant la méthode de l'antibiogramme standard par la technique de diffusion sur gélose MH, communément connue sous le nom de méthode des disques. Selon les recommandations du comité Français de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie (CA-SFM, 2009), les disques d'antibiotique sont remplacés par des disques de 6 mm de diamètre, obtenus par découpage d'un papier blanc épais (0,4 mm) qui seront ensuite préalablement stérilisés.

Selon la méthode décrite par Falleh et ses collaborateurs (2008), La gélose *MH*, coulée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, estensemencée par dépôt de 100 μ l de la suspension bactérienne standardisé, on procède a un étalage du volume d'ensemencement a la surface de la gélose à l'aide d'un écouvillon, on obtient ainsi un tapis bactérien après incubation.

Les disques sont déposés dans des boîtes de Petri et imprégnés individuellement de 10 μ l des solutions de chitosane et de l'HE de thym, ainsi que leur combinaison.

Cette méthode est applicable à plusieurs espèces microbiennes. L'action antimicrobienne se manifeste par la formation de ZI autour du disque préalablement imprégné de l'agent antimicrobien (figure 19).

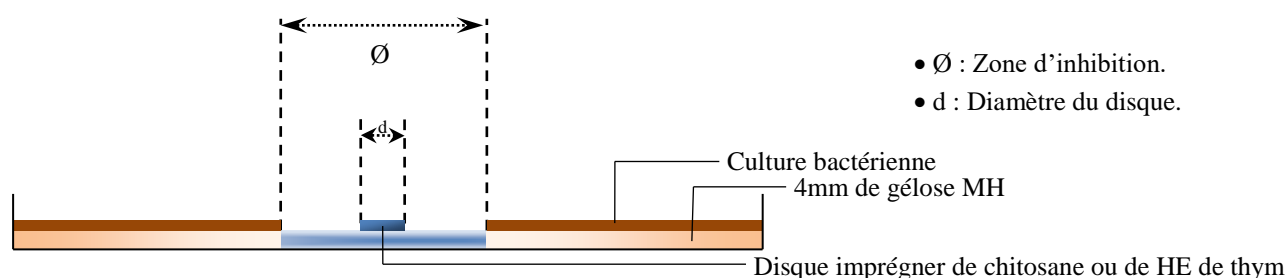


Figure 19 : Représentation schématique de la méthode de l'antibiogramme.

✚ Technique de micro atmosphère :

La suspension bactérienne standardisée d'*E. coli* a été uniformément inoculée sur la surface du milieu gélosé dans deux boîtes de Pétri à l'aide d'un écouvillon.

Dans l'une des boîtes de Pétri, un disque imprégné de 10 μL de l'HE de thym pure a été déposé, tandis que dans la seconde boîte, un autre disque imprégné de 10 μL de l'HE de thym diluée à 1/10 a été déposé sur les couvercles interne, en veillant à ce qu'ils ne touchent pas le milieu gélosé. À côté de ces disques, un disque contenant un ATB spécifique (CN 10) a été placé pour servir de témoin positif, permettant ainsi de vérifier l'inefficacité volatile de ce dernier.

De même, un disque imbibé de 10 μL de DMSO a été disposé à côté du disque précédent en tant que témoin négatif.

Par la suite, les boîtes de Pétri ont été hermétiquement fermées et incubées à 37°C pendant 24 heures dans un incubateur, favorisant ainsi la croissance bactérienne.

II.4. Étude statistique

L'ANOVA a été réalisée pour déterminer les différences significatives produites après traitement aux deux agents antimicrobiens sur les quatre souches microbiennes en comparaison avec témoins. La méthode utilisée via le logiciel Stat box est décrite dans l'annexe 09. Les valeurs de $P \leq 0,05$ sont interprétées comme dénotant des différences statistiquement significatives.

II.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

II.5.1. Détermination des CMI

Nous avons entrepris la détermination de la (CMI) selon le protocole établi par le comité français de l'antibiogramme, en utilisant un milieu solide. Le principe fondamental de cette méthode implique la préparation de dilutions (annexe 08) spécifiques des agents antimicrobiens à tester, selon les modalités dans les figures 20 et 21 :

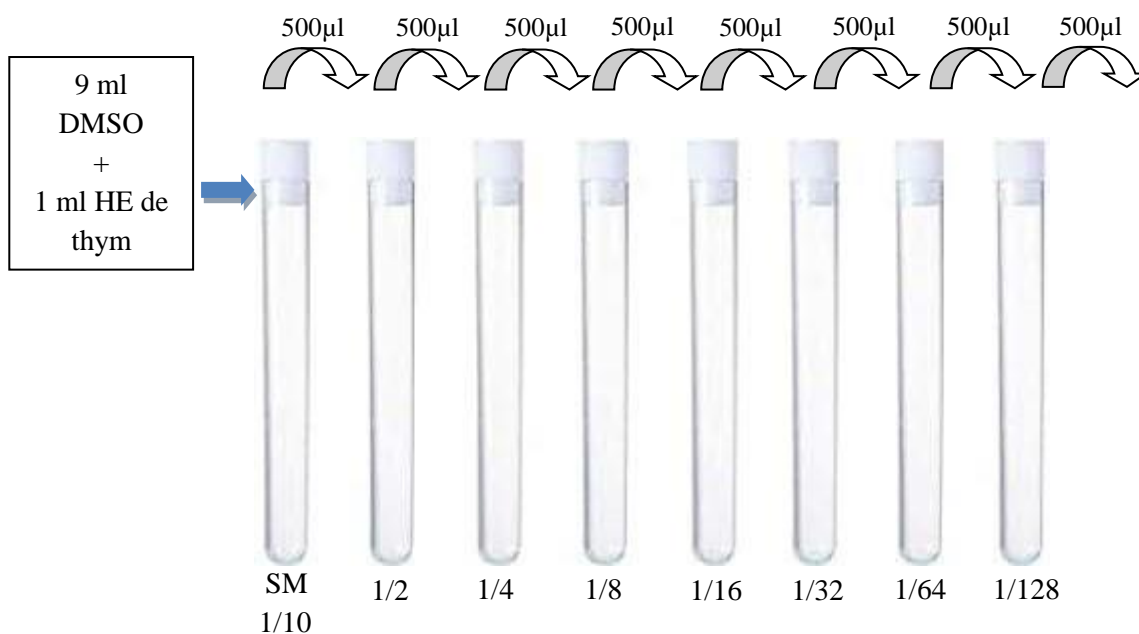


Figure 20 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de thym effectuées pour la détermination des CMI.

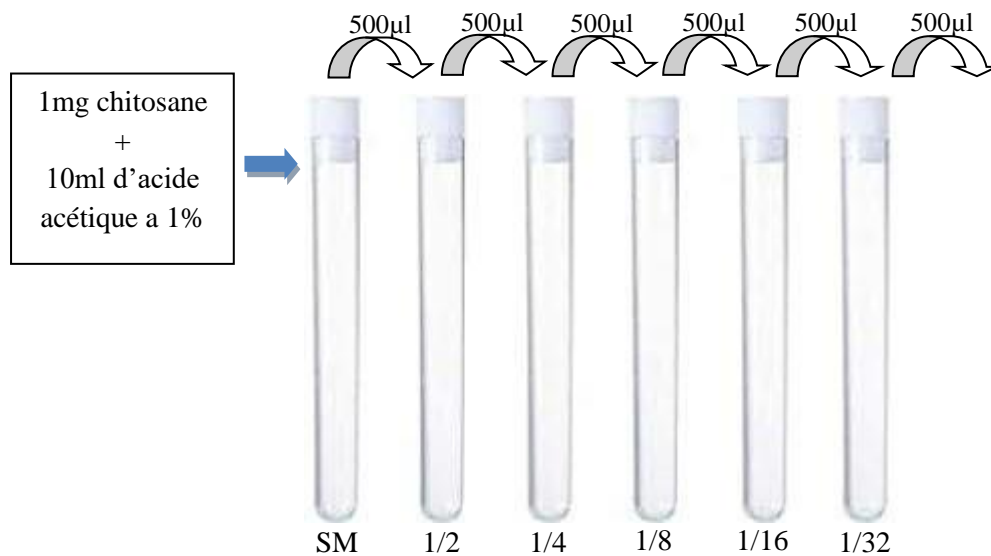


Figure 21 : Schéma représentant les dilutions du chitosane effectuées pour la détermination des CMI.

Ensuite réaliser l'inoculation de la gélose (MH) dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 14 cm, par le biais de l'écouvillonnage, permettant ainsi la formation d'un tapis bactérien après une période d'incubation. Des disques sont placés dans les boîtes de Pétri et imprégnés individuellement avec différentes dilutions d'agents antimicrobiens, à raison de 10 µl par disque.

En diluant différentes concentrations de l'agent antimicrobien, on peut définir la valeur la plus faible à laquelle on n'observe pas de croissance de microorganisme et donc une inhibition de la croissance.

La première série de boîtes est inoculée avec deux souches bactériennes puis incubées à 37 °C pendant 24 h, tandis que la seconde série de boîtes est inoculée avec les deux souches de levure et moisissure puis incubée à 25 °C pendant 48 h.

II5.2. Détermination des CMBs

Après la détermination de la CMI, les boîtes contenant les concentrations en substance d'agent antimicrobien strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB (Khobzaoui, 2014).

Pour se faire, les boîtes qui ne présentent pas de croissance vont être transférés en faisant un grattage dans d'autres boîtes de Pétri contenant de la gélose (MH ou bien Sabouraud).

Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries et 22-30 °C pendant 48 h pour la levure et la moisissure. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de la CMB renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Prescott et *al.*, 1995).

II.6. Composition chimique de l'HE de *T. algeriensis*

Afin de connaître la composition de l'HE de thym utilisée dans notre étude, nous avons opté pour une HPLC. Cette méthode analytique avancée nous permettra de confirmer les composés présents dans notre HE de thym et d'obtenir une compréhension détaillée de leur profil chimique, renforçant ainsi la rigueur et la précision de notre étude.

II.6.1. Principe :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique (annexe 07). Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

II.6.2. Conditions chromatographiques : (Protocole de : Imloul et Bouridah, 2021).

- Nom de l'appareil : Shimadzu LC 20 (Annexe 07).
- Colonne : de type phase inverse (C18).
- La phase mobile : cette phase est constituée de trois éluants : eau/acétonitrile A (90 :10 , v/v) et acétonitrile (B), avec 0,1 % d'acide formique.
- Mode : gradient (03 min, 0% B; 03 à 10 min ,0 à 10 % B ; 10 à 30 min, 10 à 20 % B ; 30 à 35 min, 20 à 25 % B ; 35 à 50 min, 25 à 50 % B ; 50 à 60 min, 50 à 0 % B) suivi de rééquilibrage de la colonne pendant 10 minutes avant le passage suivant.
- Temps d'analyse : 60 min.
- Volume d'injection : de 20 µl (d'HE de thym).
- La longueur d'onde λ : 280 nm.

II.7. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym sur les cuisses de poulet :

II.7.1. Application de l'HE de thym sur les cuisses de poulet « Tests *in-situ* »

Selon l'étude de Nadjat Ardjoum et *al.*, 2023 qui consiste à l'incorporation de l'HE de *Thymus vulgaris* et d'extrait éthanolique de propolis dans des films d'amidon de maïs a montré un effet synergique contre *E. coli* et *Listeria monocytogenes* . Les films composites antimicrobiens développés peuvent être utilisés dans des applications d'emballage alimentaire.

L'étude « *in vitro* » a évalué l'activité de l'HE de thym sur la croissance de la flore initiale de poulet ainsi que sur la souche d'*E coli* qui est une bactérie souvent rencontrée dans les cas de TIAs. Comme suit :

- Sélectionner 9 cuisses de poulet fraîches et non traitées.
- Application homogène de l'HE de thym (Annexe 10).
- Groupes d'échantillons (figure 22):
 - Groupe 1 : Cuisse témoin non emballée.
 - Groupe 2 : Cuisses emballées complètement avec du film plastique.
 - a. Cuisse emballée avec un film plastique seul.
 - b. Cuisse emballée avec un film plastique contenant de l'HE de thym.
 - c. Cuisse contaminée par *E. coli* (Annexe 11), puis emballée avec un film plastique.
 - d. Cuisse contaminée par *E. coli*, puis emballée avec un film plastique contenant de l'HE de thym.
 - Groupe 3 : Cuisses déposées sur des barquettes, puis emballées avec du film plastique.
 - a. Cuisse emballée avec un film plastique seul.
 - b. Cuisses emballées avec un film plastique contenant de l'HE de thym.
 - c. Cuisses contaminées par *E. coli*, puis emballées avec un film plastique.
 - d. Cuisses contaminées par *E. coli*, puis emballées avec un film plastique contenant de l'HE de thym.



Figure 22 : Représentations des 9 échantillons de cuisses de poulet.

- Conditionnement des échantillons

Pour les échantillons du groupe 2, emballer chaque cuisse de poulet complètement avec le film plastique correspondant.

Pour ceux du groupe 3, déposer chaque cuisse de poulet dans une barquette adaptée à sa taille, puis envelopper avec le film plastique correspondant à leur groupe d'échantillons respectif, en veillant à une bonne étanchéité pour éviter toute contamination externe.

- Mesures de contrôle :

Assurer des conditions de stérilité pendant la manipulation des échantillons pour éviter toute contamination croisée et prendre en compte les conditions environnementales telles que la température et l'humidité pour maintenir la qualité des échantillons.

- Conservation des échantillons

Conserver les cuisses de poulet emballées dans des conditions appropriées, dans réfrigérateur à une température contrôlée ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) pour une durée de 96 heures.

II.7.2. Tests microbiologiques pour évaluer l'effet de l'HE de thym

- Après 96 heures, Un prélèvement pour chaque cuisse a été effectué en grattant délicatement la surface à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- Ensuite, ensemencement des prélèvements sur les milieux de culture : les géloses DCA, PCA pour les cuisses de poulet non contaminé et la gélose Hektoen pour les cuisses de poulet contaminé intentionnellement.
- Les prélèvements ont été répartis sur des boîtes de Petri contenant ces milieux en effectuant des stries pour assurer une bonne répartition des microorganismes.
- Les boîtes de Pétri ont ensuite été placées dans un incubateur à une température de 37°C pendant 24 h pour favoriser la croissance bactérienne.
- Après une période d'incubation, il a été convenu de procéder à un comptage les colonies présentes sur chaque échantillon afin d'analyser la contamination bactérienne.



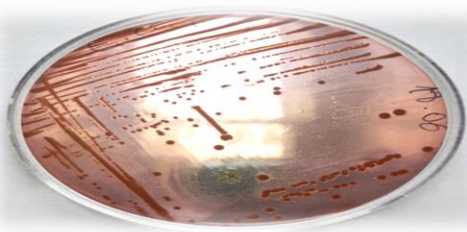

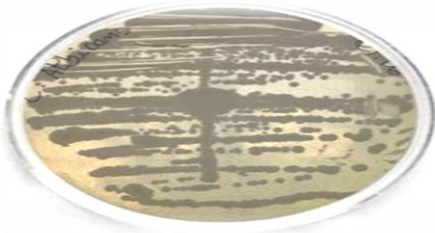

Résultats et discussions

I. Vérification des souches de références

I.1. Observations macroscopiques

Le tableau III clarifie les différentes propriétés macroscopiques des souches étudiées.

Tableau III : Propriétés macroscopiques des différentes souches microbiennes.

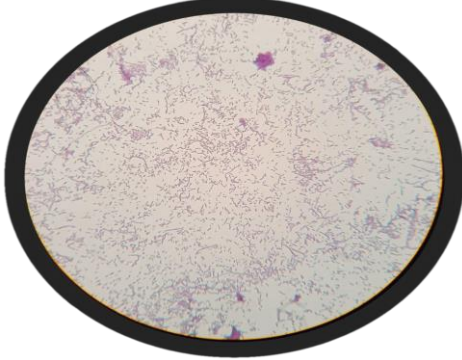
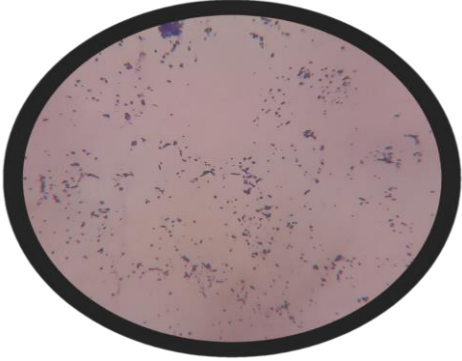
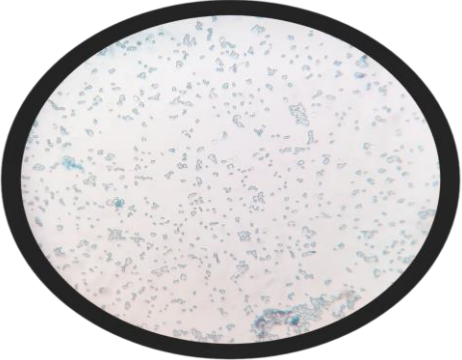
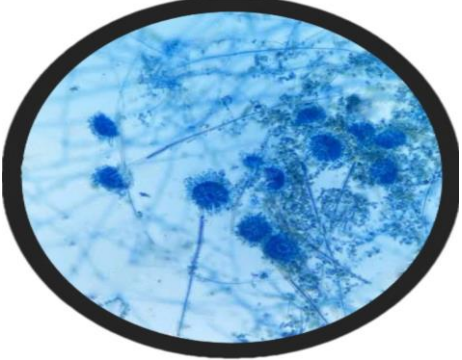
Souches	Apparence	Couleur	Milieu de culture	Aperçu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2 à 4 mm lisses rondes	Rouge	gélose Hektoen	
<i>S. aureus</i> ATCC 23922	1 à 3 mm lisses Rondes	Dorée	Gélose Chapman	
<i>C. albicans</i> 71453	2 à 3 mm Arrondies Ovale	Blanche crémeuse	Gélose Sabouraud	
<i>A. niger</i> ATCC 16404	mycélium	Sombre Noiratre	Gélose Sabouraud	

Les observations macroscopiques ont permis une 1^{ère} confirmation de l'identité des souches microbiennes utilisées, ainsi que leur pureté.

I.2. Observations microscopiques

Le tableau IV clarifie les différentes Propriétés microscopiques des souches étudiées.

Tableau IV : Propriétés microscopiques des différentes souches microbiennes.


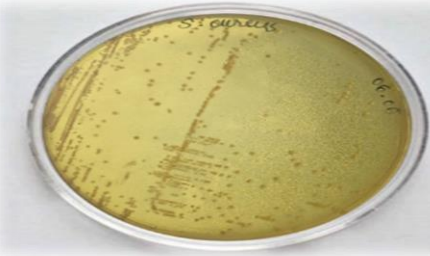
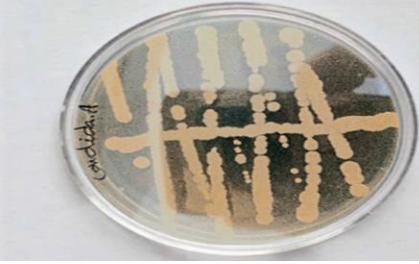

Souches	Apparence	Mobilité	Gram	Aperçu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Coco-bacille	Mobile.	Négatif.	
<i>S. aureus</i> ATCC 23922	Coque en amas.	Immuable.	Positif.	
<i>C. albicans</i> 71453	Blastoconidie	Immuable.		
<i>A. niger</i> ATCC 16404	Tête de conidies.	Immuable.		

Les observations microscopiques ont permis une 2^{ème} confirmation d'identité des souches microbiennes utilisées, ainsi de s'assurer de leurs puretés.

- **Repiquage**

Le tableau V montre les repiquages des différentes souches.

Tableau V : Résultats de repiquage des différentes souches microbiennes.

Souches microbienne	Milieu de culture	Aperçu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gélose Hektoen	
<i>S. aureus</i> ATCC 23922	Gélose Chapman	
<i>C. albicans</i> 71453	Gélose Sabouraud	
<i>A. niger</i> ATCC 16404	Gélose Sabouraud	

Les résultats de repiquage des différentes souches microbiennes ont été satisfaisants, montrant une réussite remarquable dans la purification et le maintien de leur vitalité. Les quatre souches ont été repiquées avec succès dans des conditions de culture appropriées, et ont présenté des taux de survie supérieurs à 95% lors du transfert dans de nouveaux milieux de culture. Ces résultats prometteurs nous permettront de mener à bien le reste de nos recherches.

II. Suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens

II.1. Standardisation des suspensions microbiennes

Les résultats obtenus pour la standardisation des quatre souches microbiennes, sont cohérents avec l'hypothèse selon laquelle une absorbance comprise entre 0,08 et 0,1 correspond à une concentration de 10^7 UFC/ml pour les bactéries et à 0,04 pour la levure et la moisissure.

II.2. Sélection des solutions d'agents antimicrobiens

- **Sélection des solutions de chitosane**

Pour la **solution 1**, où une quantité précise de 2 mg de chitosane fortement désacétylé a été introduite dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %, il convient de noter que la non-solubilité du chitosane dans l'acide acétique a empêché la réalisation de tests ultérieurs.

De même, la **solution 3**, impliquant une quantité précise de 2 mg de chitosane faiblement désacétylé dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %, a également rencontré des difficultés en raison de la non-solubilité du chitosane dans l'acide acétique. Par conséquent, cette solution n'a pas été testée.

En ce qui concerne la **solution 2**, où une quantité précise de 1 mg de chitosane fortement désacétylé a été ajoutée à un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %, les tests réalisés n'ont révélé aucun effet antimicrobien significatif. Malgré la solubilisation réussie du chitosane, les résultats obtenus indiquent l'absence d'une activité antimicrobienne notable dans le cadre de cette solution.

Cependant, la **solution 4**, qui consistait en une quantité précise de 1 mg de chitosane faiblement désacétylé dans un volume de 10 ml d'acide acétique à 1 %, a présenté un effet notable. Des résultats prometteurs ont été observés, démontrant une activité antimicrobienne significative.

- **Sélection des solutions de l'HE de thym**

Nous avons opté pour la **dilution 1** de l'HE de thym, cette décision a été prise afin d'atténuer l'activité antimicrobienne intense de l'HE de thym pure, qui aurait pu masquer les résultats et limiter notre capacité à évaluer correctement son efficacité.

En choisissant cette approche, nous avons obtenu des résultats plus différenciés et précis, permettant une meilleure compréhension de l'effet spécifique de l'HE de thym sur les micro-organismes ciblés.

III. Présentation des résultats (antibiogrammes / antifongogrammes)

Pour évaluer les résultats, la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (ZIs) autour des disques a été utilisée, en incluant le diamètre du disque (Tableau VIII).

Si les complexes doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention doit également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour causer la dissociation, la déshydratation ou l'isomérisation de ces complexes (Yrjöen, 2004).

Nous avons évalué l'aptitude du DMSO et de l'acide acétique à 1% en tant que solvants. Les résultats obtenus ont révélé que ces solvants sont appropriés, n'entravant en aucune manière la croissance normale des souches microbiennes (figures 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 29).

Les antibiogrammes et antifongogrammes ont indubitablement démontré leur valeur en tant qu'outils de choix pour l'évaluation de la sensibilité des microorganismes à l'ATB et à l'antifongique testés, à savoir la Gentamicine (CN 10) et le Ketoconazole (KET 50) respectivement, ainsi qu'au chitosane et à l'HE de thym.

Les ZIs consignées autour du disque d'ATB et antifongique ont conférés une précieuse capacité de prédiction quant à la réactivité de chaque souche vis-à-vis de ces traitements spécifiques.

La sélection de l'ATB et l'antifongique soumis aux tests a été orchestrée selon leur fréquence d'usage dans les milieux hospitaliers, garantissant ainsi la pertinence clinique et l'applicabilité des résultats obtenus. Les illustrations, affichées dans les figures 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 29 ont mis en évidence de manière visuelle l'efficacité de ses derniers, à l'encontre des microorganismes étudiés.

III.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne du chitosane

Au sein de cette section, notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne du chitosane vis-à-vis des différentes souches microbienne.

III.1.1. Antibiogrammes

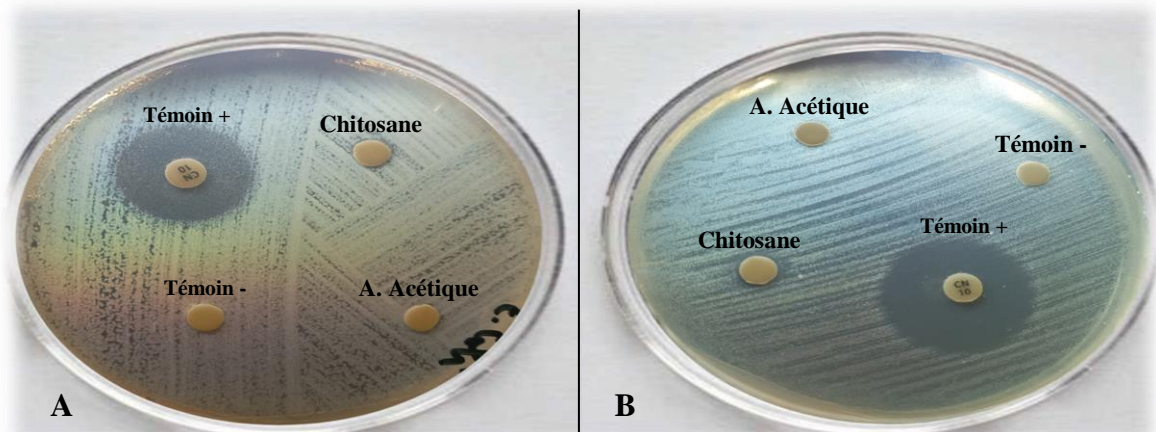


Figure 23 : Résultats des tests d'antibiogrammes du chitosane sur deux souches bactériennes (A) : *E. coli* ; (B) : *S. aureus*.

Nos résultats de l'activité antibactérienne du chitosane corroborent avec ceux de plusieurs travaux de recherche déjà effectués. On cite parmi eux, les travaux de (Coma et *al.*, 2003), qui porte sur une étude de l'activité antimicrobienne des polymères de chitosane sur des contaminants liées aux produits laitiers.

(Darmadji et Izumimoto, 1994) ont évalué la bioactivité du chitosane en milieu liquide et ont reporté qu'une concentration de 0.01 % en chitosane est suffisante pour inhiber la croissance de certaines bactéries dites d'altération telles que *E. coli* et *S. aureus*.

III.1.2. Antifongigrammes

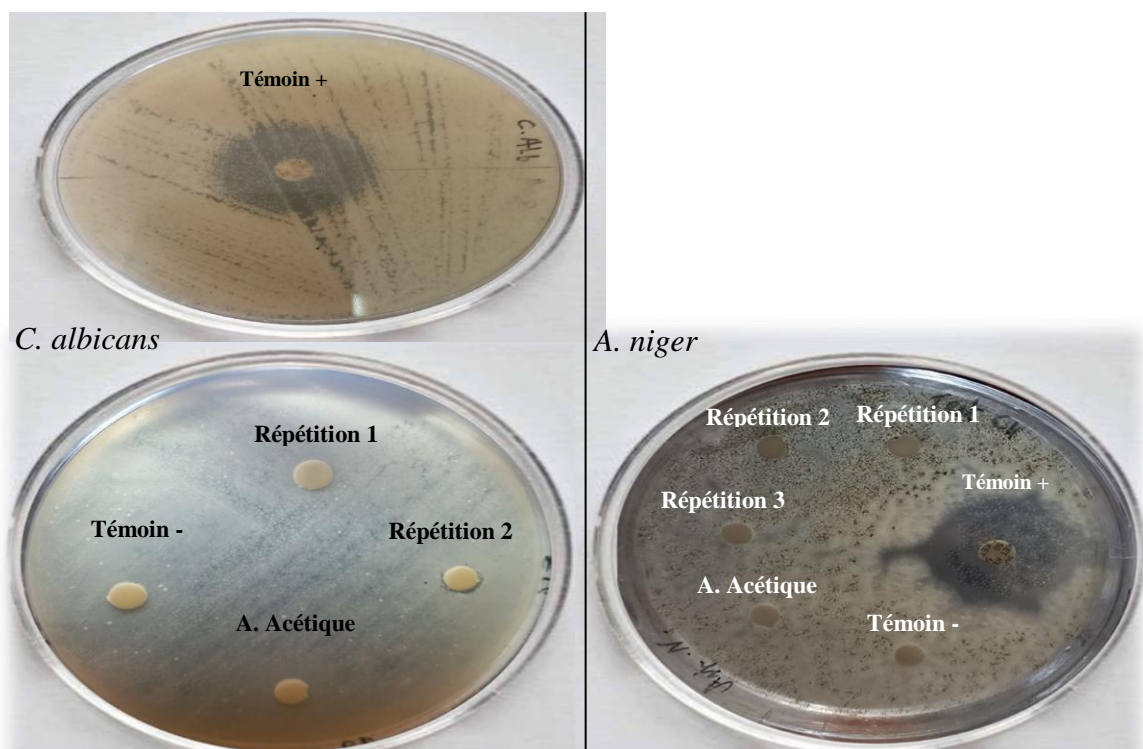


Figure 24 : Résultats des tests d'antifongigrammes du chitosane.

III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym

Au sein de cette section, notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de thym vis-à-vis des différentes souches microbiennes.

III.2.1. Antibiogrammes

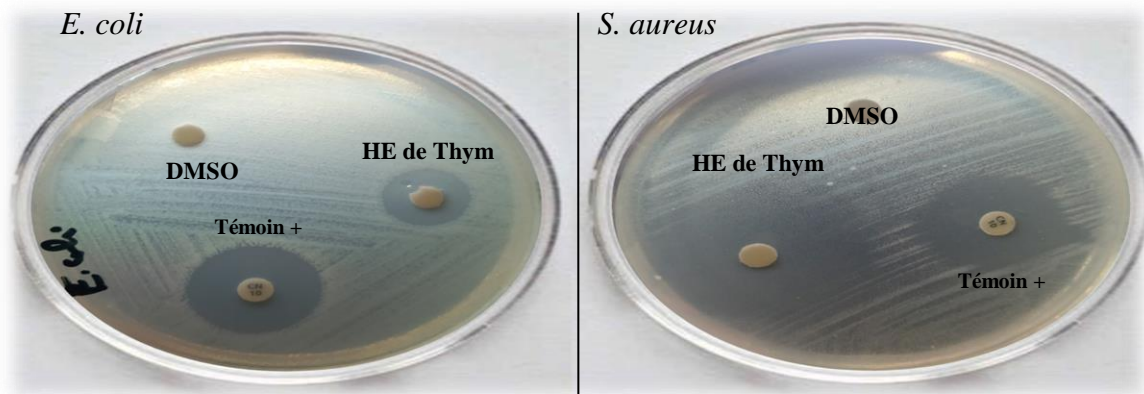


Figure 25 : Résultats des tests antibiogrammes de l'HE de thym pour les deux souches microbiennes (*E. coli*, *S. aureus*).

Dans la littérature scientifique, il est largement reconnu que les bactéries Gram + démontrent généralement une sensibilité plus élevée aux HEs de plantes que les bactéries à Gram -. Comme le montre la figure 25, *E. coli* a présenté des ZIs inférieures que *S. aureus*.

La nature chimique des principes actifs des HEs, montrent une affinité vis à vis des molécules constituant la paroi bactérienne (Chao et al. 2000). Selon leurs travaux, les bactéries à Gram - présentent une structure caractérisée par une couche de PG située entre la membrane plasmique et une couche externe constituée de LPS et de protéines. Cette organisation structurale peut entraver la pénétration des HEs à travers la paroi cellulaire, agissant comme un mécanisme de protection pour préserver la couche de PGs de la dénaturation et prévenir la multiplication bactérienne. La paroi des bactéries Gram -, qui présente une abondance de LPS, forme une barrière imperméable aux substances hydrophobes qui pourraient pénétrer dans le cytoplasme et entraver la multiplication cellulaire.

Les HEs et les extraits de plantes possèdent plusieurs modes d'action sur différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases (Caillet et Lacroix, 2007) :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'HE, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire par conséquent, la libération de constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, ce qui entrave la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structuraux essentiels.

- Destruction du matériel génétique de la bactérie, entraînant ultimement la mort cellulaire.

Des études ont confirmé que la majorité des HEs attaquent en même temps la paroi et la membrane cellulaire puis, la cellule se vide de ses constituants et meurt (Zhiri, 2006).

✚ Technique de micro atmosphère :

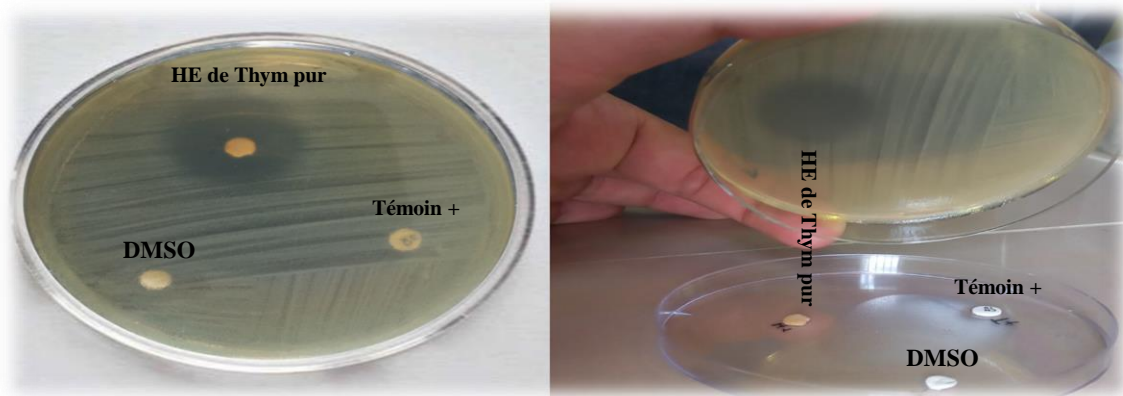


Figure 26 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym pure sur *E. coli*.

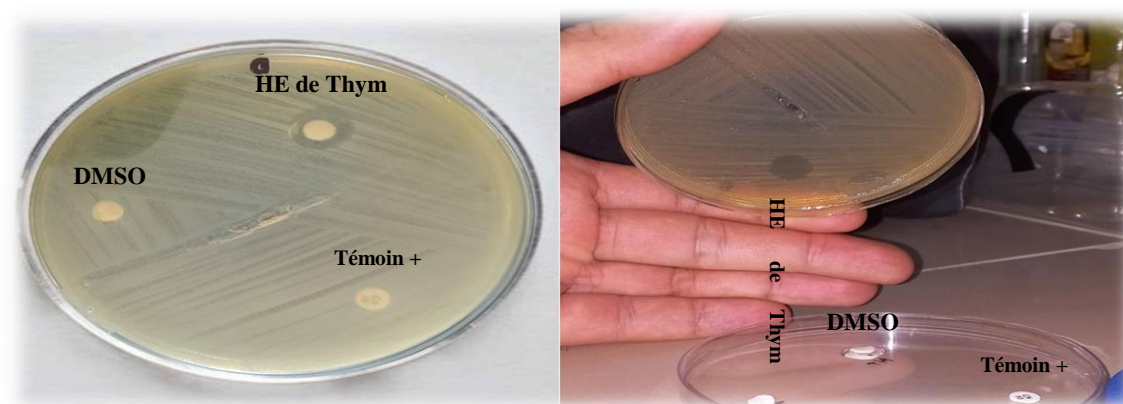


Figure 27 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym (solution 1) sur *E. coli*.

Dans la technique de micro atmosphère d'antibiogramme, les résultats démontrent de manière satisfaisante que l'HE de thym possède un effet volatile notable sur *E. coli*. Les disques imbibés de l'HE de thym ont été déposés sur le couvercle de la boîte de Pétri, au-dessus de la gélose inoculée avec la souche bactérienne. Lorsque l'HE de thym pure a été appliquée, une ZI importante de 27 mm a été enregistrée autour du point d'application comme le montre la figure 26. En revanche, lorsque l'HE de thym a été diluée à 1/10, une ZI de 12 mm a été observée (figure 27), confirmant l'activité antimicrobienne volatile de l'HE de thym même à des concentrations moindres.

1.1. Antifongigrammes

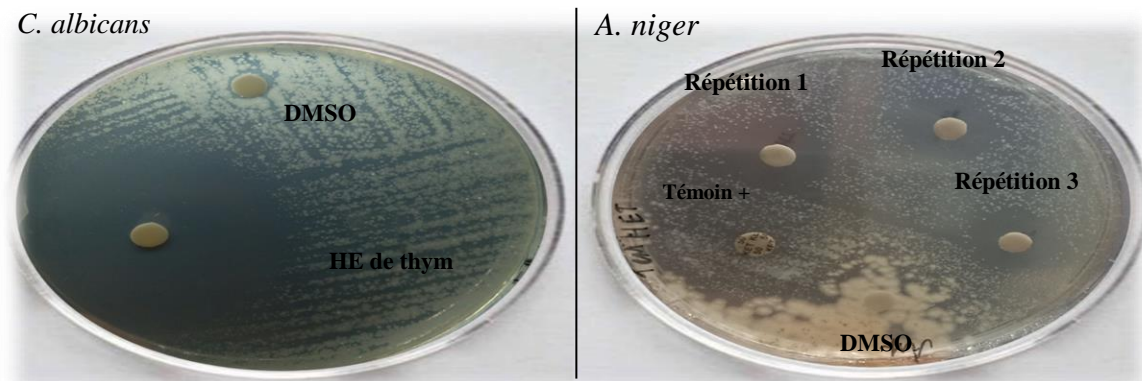


Figure 28 : Résultats des tests antifongigrammes de l'HE de thym sur une levure (*C. albicans*) et une moisissure (*A. niger*).

III.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la combinaison du chitosane et HE de thym

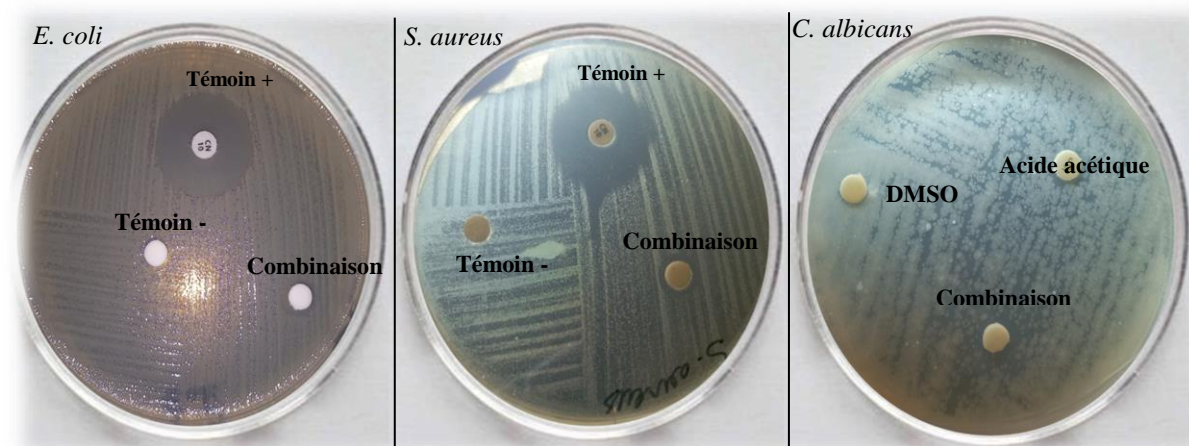


Figure 29 : Tests antibiogrammes et antifongigrammes de la combinaison des deux molécules bioactives.

Ce phénomène est appelé antagonisme, où la combinaison de l'HE de thym avec le chitosane a montré un effet inhibiteur moindre par rapport à l'HE de thym utilisée seule. Il suggère que la présence du chitosane peut avoir altéré la libération ou la diffusion des composés actifs de l'HE de thym, réduisant ainsi son efficacité inhibitrice (figure 29).

Ce résultat souligne l'importance d'étudier attentivement les interactions entre les agents antimicrobiens pour optimiser leurs effets synergiques et leur application potentielle dans la lutte contre les infections bactériennes.

IV. Présentation des ZIs des agents antimicrobiens

Le tableau ci-dessous (tableau VII) résume les ZIs obtenues à partir de trois à quatre répétitions distinctes pour chaque agent antimicrobien étudié, notamment les disques témoins (- ; +), le chitosane, l'HE de thym et leurs combinaisons.

Tableau VII : Récapitulatif des différentes ZIs sur les 4 souches microbiennes.

Souches bactérienne	Zone d'inhibition disque Témoin (mm)			Zone d'inhibition (mm)								Zone d'inhibition HET + DMSO (mm)				ZIs de la combinaison (mm)	
	ATB	Témoin + AB			Acide acétique 1%			Chitosane				DMSO	HET dilué				
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T4		T	T1	T2		T3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Gentamicine CN10	25	25	25	6	6	6	9	9	10	12	6	17	24	23	25	10
<i>S. aureus</i> ATCC 23922		25	25	25	6	6	6	10	8	8	11	6	40	25	28	23	10
<i>C. albicans</i> 71453	Ketoconazole KET 50	25	25	25	6	6	6	9	11	10	11	6	35	30	20	16	9
<i>A. niger</i> ATCC 16404		30	30	30	6	6	6	6	6	6	6	6	18	16	15	14	8

• Antibiogrammes

Les résultats des tests d'antibiogramme du chitosane (figure 23) ont révélé un effet inhibiteur avec des ZIs moyennes de 10 mm pour *E. coli* et 9 mm pour *S. aureus*. Les résultats que nous avons obtenus concordent avec ceux de Rabea *et al.* (2003) et Sogias *et al.* (2010).

Selon Rabea *et al.* (2003), l'action antimicrobienne du chitosane est à la fois antifongique, antibactérienne et algicique, elle est produite de différentes manières. Il a d'abord un effet inhibiteur sur certaines enzymes.

Les différentes ZIs les plus élevées ont été observées pour l'HE de *T. algeriensis* diluée à 1/10 avec des diamètres de 17 mm pour *E. coli*, 40 mm pour *S. aureus* (Tableau VII).

Après avoir mesuré les diamètres des ZIs, on détermine le degré de sensibilité des souches par rapport au l'HE de *T. algeriensis*. Ce diamètre diffère d'une souche à l'autre ; cela veut dire que la sensibilité ou la résistance dépendent de la souche bactérienne elle-même. Selon Ponce (2003), les bactéries sont réparties comme suit :

- On remarque que pour l'agent antimicrobien qui est l'HE de *T. algeriensis*, que la souche *E. coli* est très sensible car le diamètre de l'halo dépasse 15 mm.

- Toutes les souches sont extrêmement sensibles, sauf la souche d'*E. coli* qui est très sensible, vue son diamètre d'inhibition qui est de 17 mm.
- Toutes les souches sont extrêmement sensibles pour l'HE de *T. algeriensis* pure.

En comparant les ZIs dans le Tableau VIII avec celles trouvées par M. Bandjabeur Salah (2019) pour *S. aureus* (62 mm) et *E. coli* (28 mm), nos résultats présentent des similitudes notables malgré des conditions différentes. Dans notre étude, nous avons utilisé l'HE de *T. algeriensis* dilué à un 1/10, tandis que M. Bandjabeur Salah a utilisé l'HE de *T. algeriensis* pur, ce qui explique les ZIs importantes observées dans ses travaux.

Les valeurs des ZIs que nous avons obtenues se situent dans des proximités significatives par rapport aux résultats de M. Bandjabeur Salah, ce qui suggère que l'HE de *T. algeriensis* présente une activité antimicrobienne prometteuse. Cela indique également que la dilution de l'HE peut influencer l'efficacité des ZIs.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui ont noté que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram négatif en particulier à celle de *T. algeriensis*.

En fait, Ait-Ouazzou et al. (2011) ont trouvé que la bactérie *S. aureus* (Gram positif) présentait une sensibilité très élevée contre l'HE de *T. algeriensis* (ZI=51 mm ; CMI <0.5µl/ml) par rapport à *E. coli* (17.8 mm ; 1 µl/ml). Tandis que, Chemat et al. (2013) ont observé une sensibilité élevée des bactéries *E. coli* (46 mm) et *S. aureus* (60 mm).

Contrairement, dans une étude précédente, T.Dob et al. (2006) ont trouvé que la bactérie *S. aureus* et *E. coli* étaient les plus résistantes à cette huile. De même, Jayari et al. (2017) ont trouvé que *S. aureus* (12 mm) était la plus résistante par rapport à *E. coli* (28 mm).

L'histogramme ci-dessous (figure 30) présente les ZIs pour deux souches bactériennes en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens.

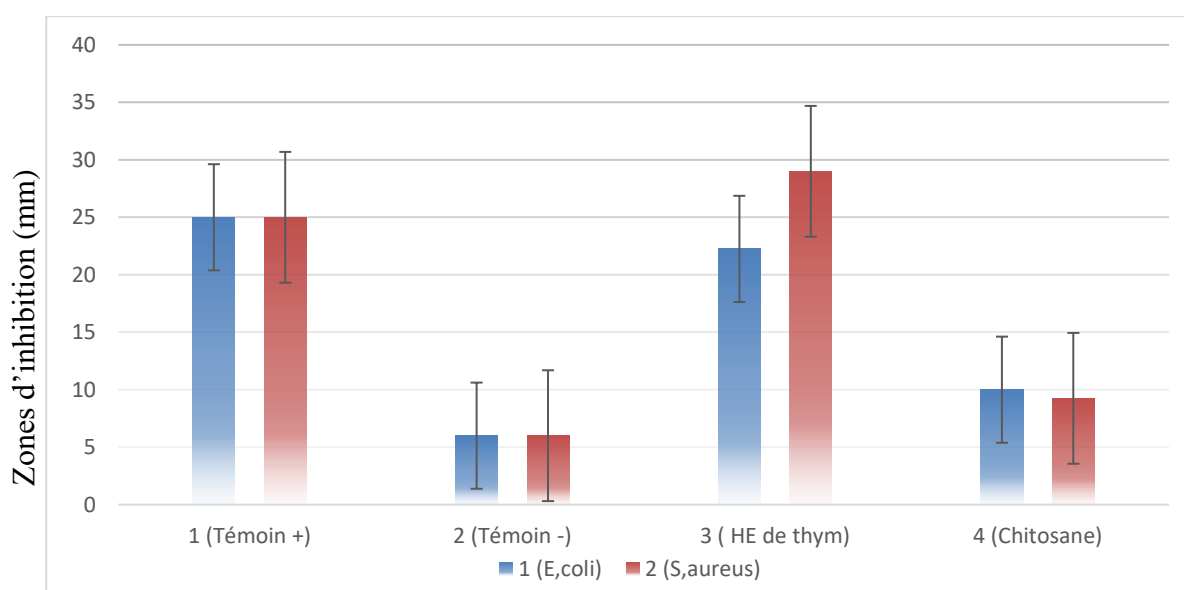


Figure 30 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches bactériennes en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens.

En ce qui concerne le disque témoin +, une similarité marquée est observée dans les ZIs pour les deux souches bactériennes étudiées.

Pour les disques -, il est notable qu'aucune ZI n'a été observée en présence de ces disques, ce qui suggère témoins l'absence d'effet inhibiteur envers les deux souches bactériennes.

En ce qui concerne le chitosane, il est à noter que la ZI pour la souche *S. aureus* affiche une légère diminution par rapport à celle d'*E. coli*, indiquant une réactivité différentielle des deux souches bactériennes à ce dernier.

En revanche, en ce qui concerne l'HE de thym, la ZI pour la souche *S. aureus* est supérieure à celle d'*E. coli*, ce qui suggère une variabilité dans la réaction antimicrobienne des deux souches face à cet agent.

Ces résultats illustrent les réponses distinctes des souches bactériennes aux agents antimicrobiens testés, mettant en évidence des nuances dans leurs sensibilités respectives et offrant un aperçu des interactions spécifiques entre les souches et les agents testés.

Les résultats de l'analyse statistique utilisant l'ANOVA ont mis en évidence une valeur de probabilité de 0,1239, pour un seuil de signification fixé à $P \leq 0,05$. Étant donné que cette valeur de probabilité ($P > 0,05$), nous en tirons la conclusion qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives.

- **Antifongigrammes**

Quant à l'antifongigramme du chitosane sur *C. albicans*, révélant une ZI moyenne de 10.25 mm (figure 24). Cependant, lors des tests sur *A. niger*, le chitosane n'a présenté aucune ZI, indiquant une absence d'effet inhibiteur sur cette souche fongique (figure 24). Ces résultats fournissent des informations supplémentaires sur l'activité antimicrobienne spécifique du chitosane vis-à-vis de différentes espèces pathogènes, ce qui pourrait avoir des implications importantes pour son utilisation potentielle en tant qu'agent antifongique.

Concernant l'antifongigramme de l'HE de thym (figure 28), les ZIs observés sont particulièrement intéressantes. Avec 35 mm pour *C. albicans* et 18 mm pour *A. niger*, il est clair que l'HE de *T. algeriensis* présente une forte activité antifongique (Tableau VII).

Ces résultats soutiennent les propriétés antimicrobiennes conventionnellement associées aux HEs de la famille des thymus. Cela peut être attribué à la présence de composés bioactifs tels que le thymol connu pour son action antifongique.

Cette HE de *T. algeriensis* a été testée par T.Dob et al. (2006) pour son activité antimicrobienne deux champignons et deux levures. Cette huile a montrée un effet inhibiteur *in vitro* contre toutes les levures et tous les champignons filamenteux testés (CMI = 0,5 et 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Abdulhmid A. Giweli et *al.* (2013) ont enquêté sur l'efficacité antimicrobienne de l'HE de *T. algeriensis* à l'égard d'une sélection de huit espèces fongiques. Les résultats ont mis en évidence la propriété antifongique de l'HE de *T. algeriensis*, suggérant ainsi une pertinence potentielle et bénéfique pour des applications pratiques.

Selon N. Zouari et *al.* (2011) l'HE de *T. algeriensis* a été testée pour son activité antimicrobienne contre deux souches fongiques. L'HE de *T. algeriensis* a exercée une forte activité antifongique.

Les résultats de notre étude sont en cohérence avec les constatations des divers auteurs antérieurs qui ont unanimement mis en évidence l'activité antifongique significative de l'HE de *T. algeriensis*. Cette convergence de données entre nos recherches et la littérature scientifique corrobore sans équivoque l'idée selon laquelle cette HE possède une action antimicrobienne notable contre les souches fongiques pathogènes.

La présence du thymol comme composant principale peut expliquer la forte activité antimicrobienne des HEs de *T. algeriensis*. De ce fait, Cosentino et *al.* (1999) ont rapporté que les propriétés antimicrobiennes des HEs de thym sont principalement liées à leur teneur élevée en phénol. Les mêmes auteurs ont également noté que parmi les composés uniques testés, le thymol se révélait être le plus efficace contre plusieurs souches et bactéries d'origine alimentaire.

De plus, Ultee et *al.* (2002) ont démontré que le p-cymène avait une activité antibactérienne très faible, mais qu'il pouvait induire un gonflement de la membrane bactérienne. Par ce mécanisme, le p-cymène facilite probablement le transport de l' α -pinène et β -pinène dans la cellule. Le p-cymène n'affecte pas la perméabilité de la membrane mais peut diminuer l'enthalpie et la température de fusion de la membrane, ces propriétés renforcent la notion que ce composé peut agir comme une impureté de substitution dans la membrane (Cristani et *al.*, 2007).

Le thymol entraîne des altérations structurelles et fonctionnelles de la membrane cytoplasmique pouvant endommager les membranes externe et interne, il peut également interagir avec les protéines membranaires et les cibles intracellulaires (Sikkema et *al.*, 1995 ; Di Pasqua et *al.*, 2010). L'interaction du thymol avec la membrane affecte la perméabilité de la membrane et entraîne la libération d'ions K^+ et d'ATP (Lambert et *al.*, 2001, Walsh et *al.*, 2003 ; Xu et *al.*, 2008).

Dans certains cas, le thymol peut induire la libération de lipopolysaccharides, mais n'affecte pas les cations chélateurs (Helander et *al.*, 1998). Le thymol s'intègre dans les groupes de tête polaires de la bicouche lipidique, induisant des altérations de la membrane cellulaire à faible teneur en thymol, la membrane peut adapter son profil lipidique pour maintenir sa fonction et sa structure (Turina et *al.*, 2006).

Les interactions du thymol avec les protéines se produisent sur différents sites de la cellule et peuvent affecter diverses fonctions cellulaires (Sikemma et *al.*, 1995).

L'histogramme suivant (figure 31) expose les ZIs pour deux souches fongiques en relation avec les disques témoins et les agents antimicrobiens.

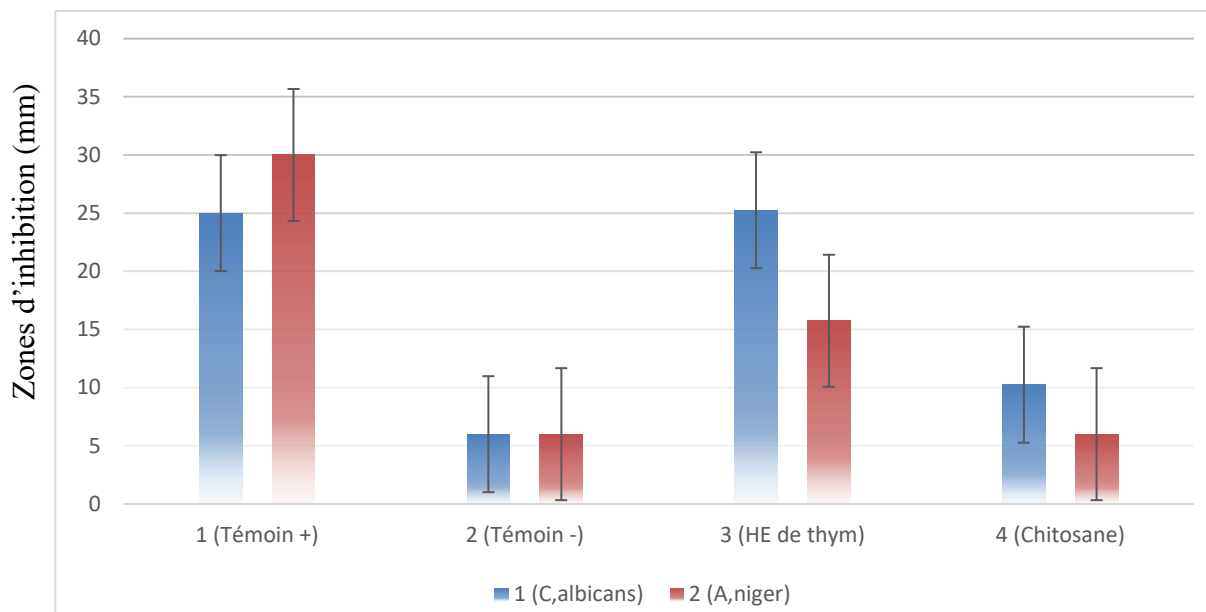


Figure 31 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches fongiques en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens.

En ce qui concerne le disque témoin +, une concordance évidente se dégage dans les ZIs pour les deux souches fongiques examinées.

Quant au disque témoin -, il est notable qu'aucune ZI n'a été observée en présence de ces disques, ce qui suggère l'absence d'effet inhibiteur envers les deux souches fongique.

En ce qui concerne le chitosane, il est pertinent de noter que la ZI pour la souche *A. niger* présente une réduction en comparaison à celle de *C. albicans*, dénotant une réaction différentielle des deux souches fongiques envers cet agent antimicrobien.

De même, en ce qui concerne l'HE de thym, la ZI pour la souche *C. albicans* surpasse celle d'*A. niger*, mettant en avant une variation dans la réactivité antimicrobienne des deux souches face à cet agent.

Ces conclusions mettent en évidence les réponses distinctes des souches fongiques face aux agents antimicrobiens évalués, soulignant les variations de sensibilité et offrant un aperçu des dynamiques particulières entre les souches et les agents examinés.

Les résultats de l'analyse statistique utilisant l'ANOVA ont mis en évidence une valeur de probabilité de 0,0033, pour un seuil de signification fixé à $P \leq 0,05$. Étant donné que cette valeur de probabilité ($0,001 < P \leq 0,01$), nous en tirons la conclusion que les différences sont hautement significatives.

V. Détermination des CMI / CMBs

V.1. Détermination des CMI

Les CMI ont été déterminées uniquement pour le chitosane et l'HE de thym séparément, puisque c'est à l'état individuel que chacun d'eux a montré un effet antimicrobien important qu'à l'état combiné.

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité des souches au chitosane (figure 32, 33, 34 et 36) et à l'HE de thym (figure 32, 33, 35 et 37). Les valeurs des CMI varient d'un microorganisme à un autre.

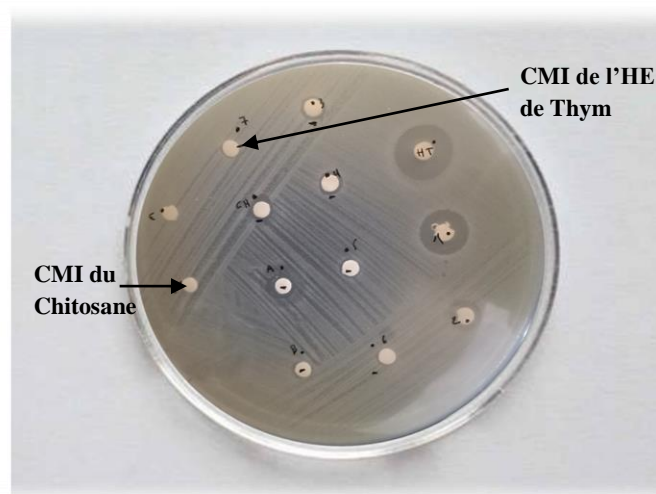


Figure 32 : Résultats des dilutions des 2 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur *E. coli*.

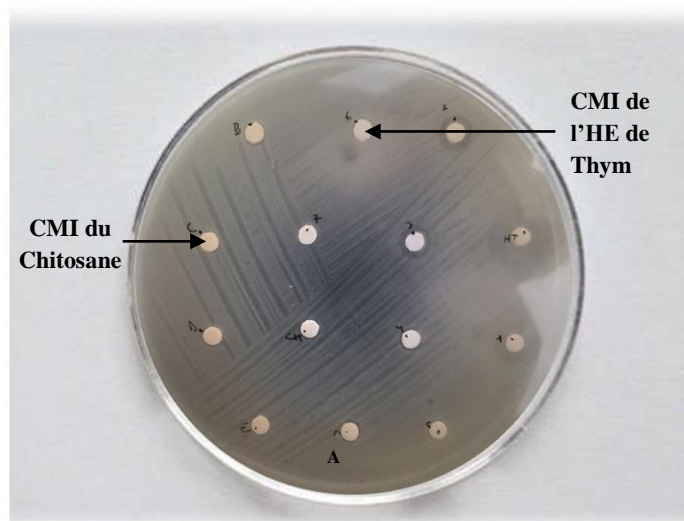


Figure 33 : Résultats des différentes dilutions des 2 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur *S. aureus*.

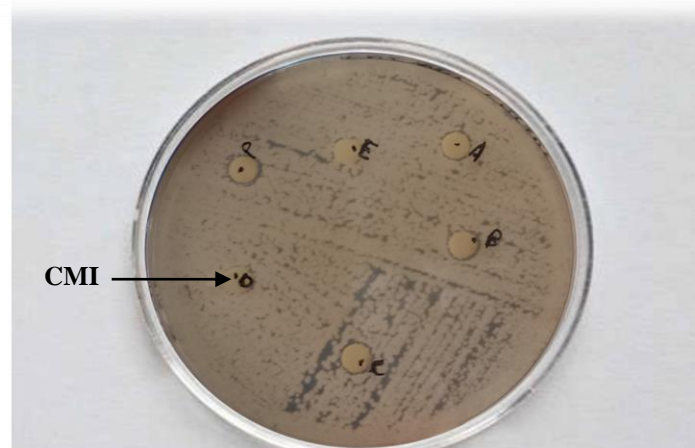


Figure 34 : Résultats des différentes dilutions du chitosane afin de fixer sa CMI sur *C. albicans*.

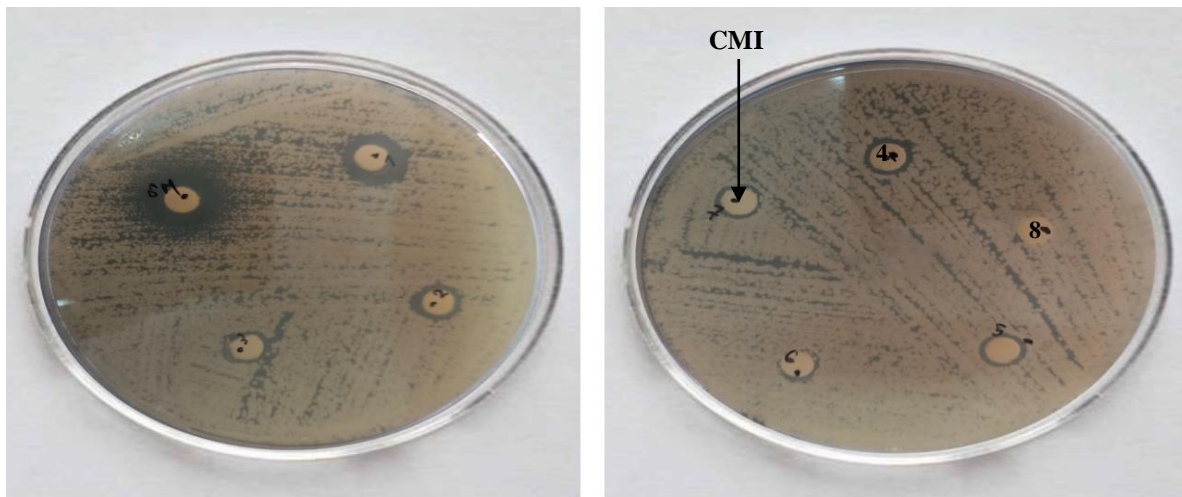


Figure 35 : Résultats des différentes dilutions de l'HE de thym afin de fixer sa CMI sur *C. albicans*.

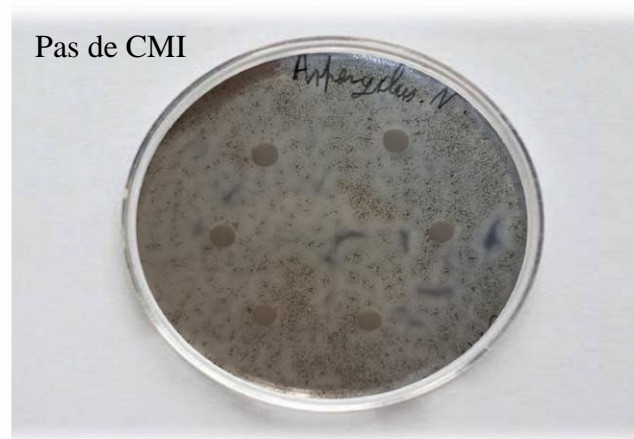


Figure 36 : Résultats des différentes dilutions du chitosane afin de fixer sa CMI sur *A. niger*.

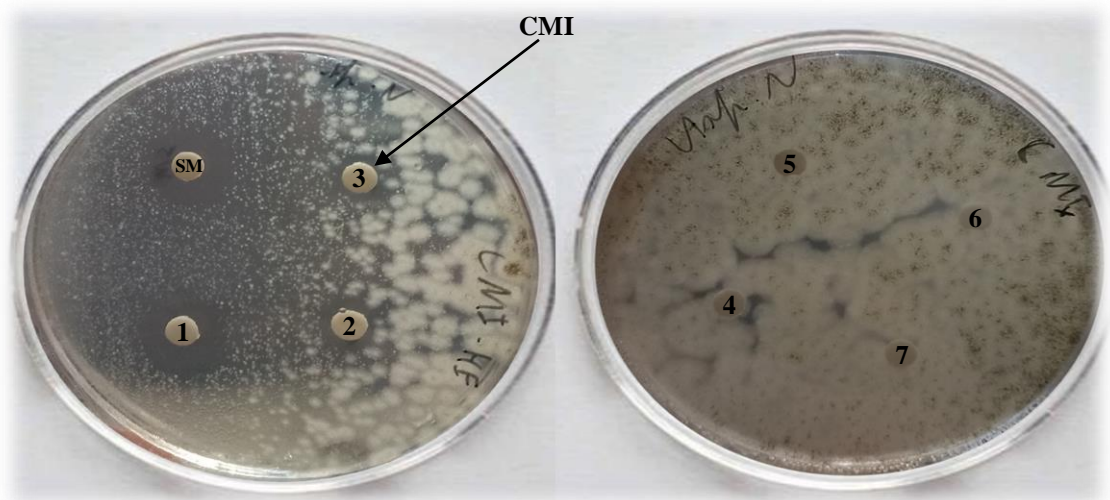


Figure 37 : Résultats des différentes dilutions de l'HE de thym afin de fixer sa CMI sur *A. niger*.

Le tableau VIII présente un aperçu global des ZIs résultant des différentes dilutions du chitosane et de l'HE de thym. Cette compilation vise à établir les CMI pour les quatre souches microbiennes ciblées.

Tableau VIII : Diamètres des ZIs des différentes dilutions des agents antimicrobiens sur les 4 souches microbiennes.

Souches Dilutions	Zones d'inhibitions (mm)							
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>		<i>A. niger</i>	
	Chitosane	HE de thym	Chitosane	HE de thym	Chitosane	HE de thym	Chitosane	HE de thym
Solution Mère	12	25	11	23	11	16	6	14
Dilution à 1/2	11	17	9	15	10	14	6	12
Dilution à 1/4	9	14	8	13	9	13	6	10
Dilution à 1/8	8	12	7	12	8	12	6	9
Dilution à 1/16	7	10	6	10	7	10	6	6
Dilution à 1/32	6	9	6	8	6	9	6	6
Dilution à 1/64		8		7		8		6
Dilution à 1/128		7		6		7		6

Les cases marquées en vert, correspondant aux ZIs des dilutions spécifiques, signalent les valeurs seuils des CMI pour le chitosane et l'HE de thym. Ces résultats ciblés révèlent les concentrations à partir desquelles une inhibition significative de la croissance microbienne a été atteinte, délimitant ainsi l'efficacité antimicrobienne de ces composés vis-à-vis des souches examinées.

Le tableau XI qui suit discrimine avec précision les dilutions révélatrices de CMI, tout en mettant en évidence le calcul méthodique des CMI pour le chitosane et l'HE de thym à l'égard des quatre souches microbiennes évaluées.

Tableau XI : Sélection des dilutions où les CMI sont observées.

Les microorganismes	Chitosane		HE de thym	
	Dilutions représentant CMI	CMI	Dilutions représentant CMI	CMI
<i>E. coli</i>	Dilution d	0.006 mg/ml	Dilution 7	0.74 mg/ml
<i>S. aureus</i>	Dilution c	0.013 mg/ml	Dilution 6	1.48 mg/ml
<i>C. albicans</i>	Dilution d	0.006 mg/ml	Dilution 7	0.74 mg/ml
<i>A. Niger</i>	Pas de CMI		Dilution 3	11.88mg/ml

- Chitosane :

Pour *E. coli*, la ZI la plus restreinte observée, représentant la CMI, est observée à la dilution d (1/16), présentant une concentration effective de 0,006 mg/ml.

Concernant la souche *S. aureus*, la CMI est atteinte à la dilution c (1/8), avec une concentration mesurée de 0,013 mg/ml.

Il est à noter que la CMI déterminée pour la souche *C. albicans* coïncide avec celle de *S. aureus*, soit à la dilution d (1/16), avec également une concentration correspondante de 0,006 mg/ml.

Cependant, en ce qui concerne la souche *A. niger*, la détermination de la CMI n'a pas pu être réalisée, étant donné que le chitosane ne présente pas d'activité inhibitrice envers cette moisissure.

- HE de thym :

Pour *E. coli*, la plus petite zone d'inhibition observée, correspondant à la CMI, est identifiée à la dilution 7 (1/128) avec une concentration de 0,74 mg/ml.

La CMI pour la souche *S. aureus* est observée à la dilution 6 (1/64) avec une concentration de 1,48 mg/ml.

La CMI pour la souche *C. albicans* coïncide avec celle d'*E. coli*, étant à la dilution 7 (1/128) avec une concentration identique de 0,74 mg/ml.

Quant à la souche *A. niger*, la CMI est observée à la dilution 4 (1/8) avec une concentration équivalente à 11,88 mg/ml.

En procédant à une comparaison des CMI relevées dans cette étude avec les valeurs obtenues dans les travaux de Dob.T et *al.* (2006), Abdulhmid A. Giweli et *al.* (2013), ainsi que Righi.N et *al.* (2020), tous ayant étudié les effets antimicrobiens de l'HE de *T. algeriensis*, on observe des variations significatives entre ces résultats. En effet, certaines des valeurs de CMI relevées dans cette étude se sont révélées inférieures à celles obtenues par les auteurs précédents, tandis que la majorité des valeurs se sont avérées supérieures à celles relevées dans leurs recherches respectives.

Effectivement, les travaux d'Abdulhmid A. Giweli et *al.* (2013) ont fourni un intervalle de valeurs pour la CMI compris entre 0,001 et 0,05 mg/ml. En ce qui concerne l'activité antifongique, les CMI ont varié de 0,0005 à 0,025 mg/ml.

De manière similaire, les travaux de T.Dob et *al.* (2006) ont démontré une CMI de 0,5 µL/mL pour les bactéries testées, ainsi que des valeurs de CMI de 0,5 et 1,0 µL/mL pour toutes les levures et champignons filamenteux évalués.

D'autre part, les recherches menées par Nadjat Righi et *al.* (2020) ont révélé des valeurs de CMI variant de 2,34 mg/ml à 9,37 mg/ml, cette dernière étant associée à la souche d'*E. coli*, qui a montré une résistance accrue.

Ces différences observées dans les valeurs de CMI pourraient être étroitement liées aux variations des taux de thymol, un composé phénolique présent dans l'HE de *T. algeriensis*. En effet, les différentes HEs de *T. algeriensis* utilisées dans les études précédentes ont montré des pourcentages distincts de thymol. Par exemple, T.Dob et *al.* (2006) ont utilisé une HE de *T. algeriensis* contenant 29,2 % de thymol, tandis qu'Abdulhmid A. Giweli et *al.* (2013) ont utilisé une huile contenant 38,5 % de thymol.

Ces variations dans la concentration de thymol pourraient influencer l'activité antimicrobienne de l'HE de *T. algeriensis*, car le thymol est connu pour ses propriétés antimicrobiennes potentielles. Une teneur plus élevée en thymol pourrait renforcer l'activité antifongique et antibactérienne de l'HE, tandis qu'une teneur plus faible pourrait entraîner une réduction de son effet inhibiteur sur les microorganismes cibles.

L'analyse de l'HE de *T. algeriensis* utilisée dans notre étude révèle la présence dominante de thymol, cependant, le pourcentage exact de ce composé n'a pas été spécifié (Figure 18). Cette constatation indique que cette HE est probablement riche en thymol, ce qui suggère un potentiel antimicrobien prometteur. Le thymol est reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes bien établies, et sa concentration élevée dans l'HE de *T. algeriensis* peut expliquer en partie l'effet antimicrobien observé dans notre étude.

V.2 Détermination de la CMBs et CMFs

V.2.1. CMBs

Les résultats obtenus sont consignés dans la Figure 38.

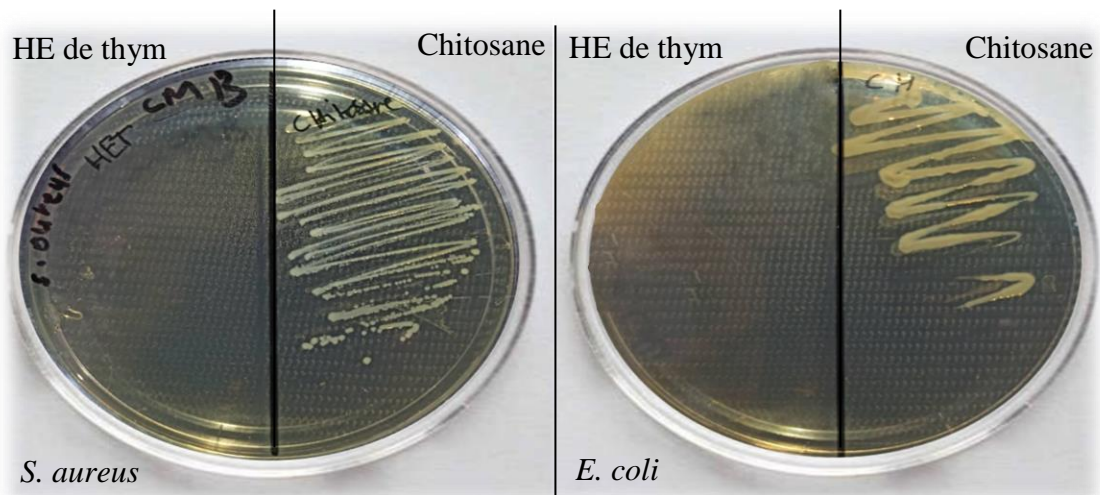


Figure 38 : Détermination de la CMB des 2 agents antimicrobiens sur *E. coli* et *S. aureus*.

Les conclusions tirées des données illustrées dans la Figure 38 démontrent que le chitosane démontre une propriété bactériostatique sur les deux souches bactériennes. En contraste, l'HE de *T. algeriensis* exerce une action bactéricide envers toutes les souches bactériennes évaluées, notamment *E. coli* et *S. aureus*.

V.2.2. CMFs

Les résultats obtenus sont consignés dans les Figures 39 et 40.

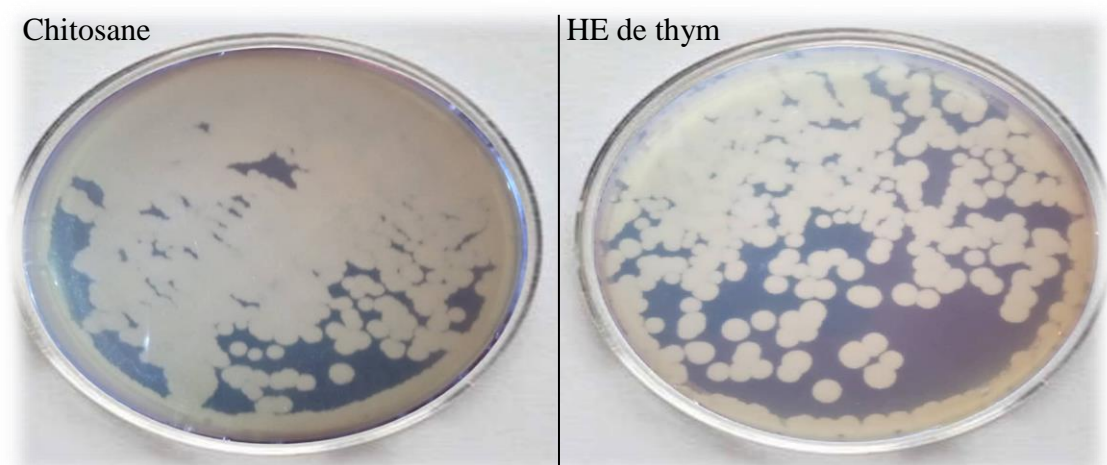


Figure 39 : Détermination de la CMF des 2 agents antimicrobiens sur *C. albicans*.

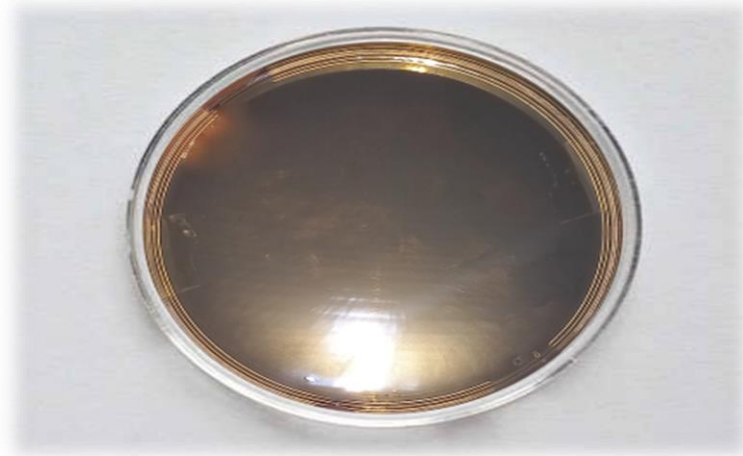


Figure 40 : Détermination de la CMF de HE de thym sur *A. niger*.

En ce qui concerne les souches fongiques, tant le chitosane que l'HE de thym exhibent une propriété fongistatique envers *C. albicans* (Figure 39), induisant un arrêt du développement fongique. Par contre, chez *A.niger*, le chitosane ne présente aucun effet observable, rendant ainsi la détermination de sa CMB inenvisageable. D'autre part, l'HE de thym démontre une action fongicide, engendrant la destruction totale du champignon (Figure 38).

VI. Résultats de l'HPLC

Le chromatogramme HPLC-UV des composés phénolique de *T .algeriensis* est présenté dans l'annexe 7.

Le composé majoritaire serait probablement l'acide rosmarinique qui a été signalé par plusieurs auteurs comme composé prédominant dans les espèces de thymus. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Ziani et *al.* (2018) sur le *T. algeriensis*.

Les autres composés identifiés ont été déjà rapportés par Boutaoui et *al.* (2018) pour le *T. algeriensis* Tunisien comme l'acide gallique, la catéchine, la rutine et la naringénine.

La présence d'acide caféique et rosmarinique, de lutéoline et d'apigénine, a été observée précédemment dans d'autres *Thymus spp* (Kulišić et *al.*, 2006 ; Özgen et *al.* 2011; Gökbulut, 2015).

IV. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym sur les cuisses de poulet

Afin de prévenir la détérioration ou la prolifération des microorganismes sur la viande, des recherches constantes sont entreprises dans ce domaine. Les viandes fraîches ont toujours été conservées à une température d'environ $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Cependant, cette méthode de conservation se révèle insuffisante, car son efficacité est limitée dans le temps, ce qui est considéré comme économiquement défavorable et en décalage avec la disponibilité de l'aliment. Par conséquent, des efforts sont déployés pour développer des approches plus avancées et efficaces en matière de préservation alimentaire.

Dans le cadre de cette étude, nous avons procédé à l'utilisation de l'HE de *T. algeriensis* afin d'évaluer son efficacité sur une matrice alimentaire spécifique, en l'occurrence la viande de poulet.

Selon le protocole prescrit dans la partie matériel et méthodes, nous avons entrepris l'évaluation de l'HE de *T. algeriensis* sur la viande de poulet fraîche. Cette étude a été réalisée en utilisant deux méthodes spécifiques. La première méthode consistait à envelopper intégralement la viande de poulet avec un film alimentaire traité à base de l'HE de *T. algeriensis*. La seconde méthode consistait à placer la viande dans des barquettes enveloppées avec le film préalablement imprégné de l'HE de *T. algeriensis*. Les deux approches ont été mises en œuvre en utilisant à la fois des échantillons de viande de poulet intentionnellement contaminés et des échantillons de viande de poulet exempts de contamination.

IV.1. Résultats des effets de l'HE de thym sur les propriétés sensorielles

L'analyse approfondie des résultats révèle des distinctions significatives entre les divers groupes de cuisses de poulet, comme exposé dans les Figures 41, 42, 43, 44 et 45.



Figure 41 : Cuisse de poulet témoin non emballée (groupe 1).

Au sein du Groupe 1 (figure 41), la cuisse témoin non emballée présente des altérations substantielles, marquées par une coloration et une odeur manifestement indésirables, suggérant un début de détérioration microbiologique.

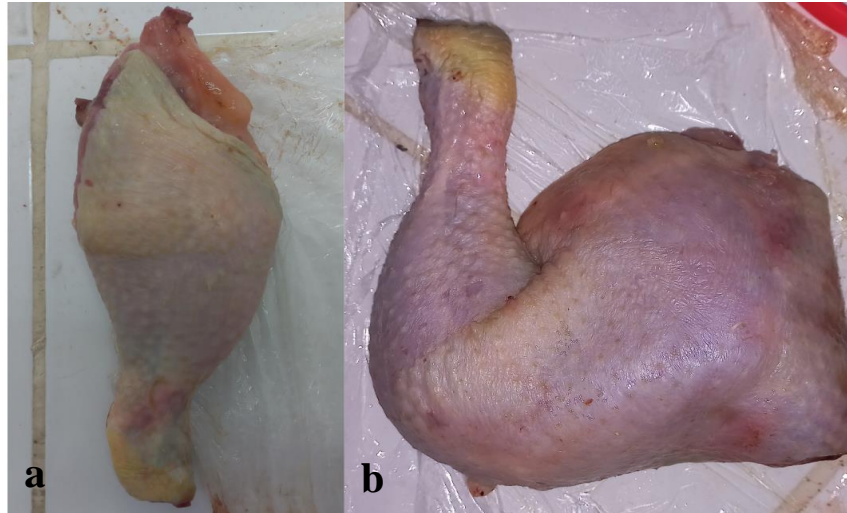


Figure 42 : Analyse comparative entre cuisse emballée avec film plastique seul (a) et cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym (b).

Dans le Groupe 2 (figure 42), la comparaison entre la cuisse a (emballée avec du film plastique seul) et la cuisse b (emballée avec du film plastique contenant de l'HE de thym) révèle des variations significatives. La cuisse a affichée une coloration verdâtre apparente à la surface malgré son enveloppement, accompagnée d'une légère odeur désagréable. En contraste, la cuisse b conserve son intégrité visuelle, exempte de coloration verdâtre, et se distingue par une odeur dominante de thym.

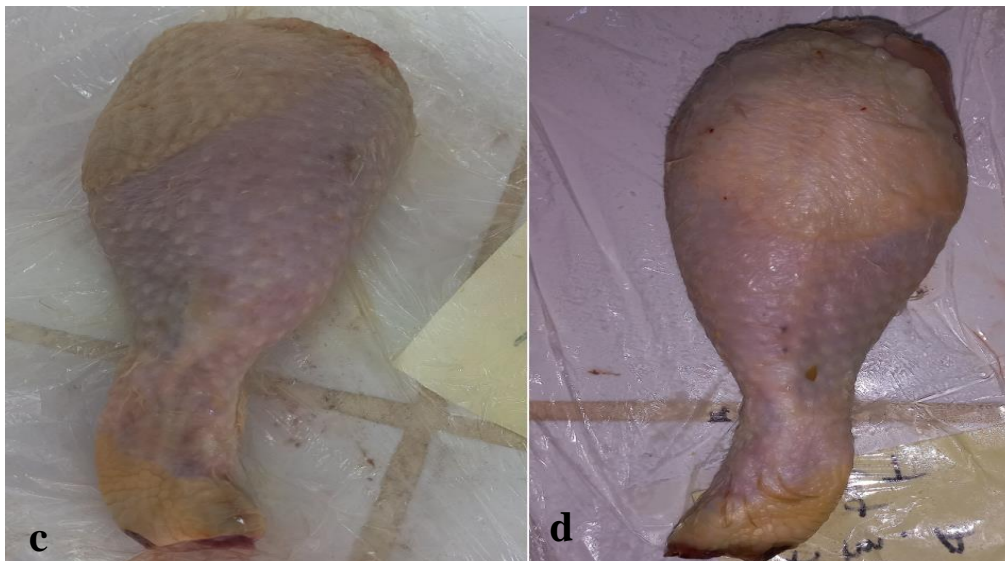


Figure 43 : Confrontation entre (c) : cuisse contaminée par *E. coli* emballées avec film plastique, et (d) cuisse contaminée par *E. coli* emballées avec film plastique contenant de l'HE.

Comparant la cuisse c (contaminée par *E. coli* puis emballée avec un film plastique) et la cuisse d (contaminée par *E. coli* puis emballée avec un film plastique contenant de HE de thym), des divergences notables émergent. La cuisse c présente un changement apparent de couleur à la surface, attribuable à la contamination par *E. coli*, accompagné d'une émanation olfactive indésirable. En revanche, la cuisse d se distingue par l'absence de coloration suspecte et d'odeur indésirable (figure 43), laissant place à une sensation olfactive distincte de thym.

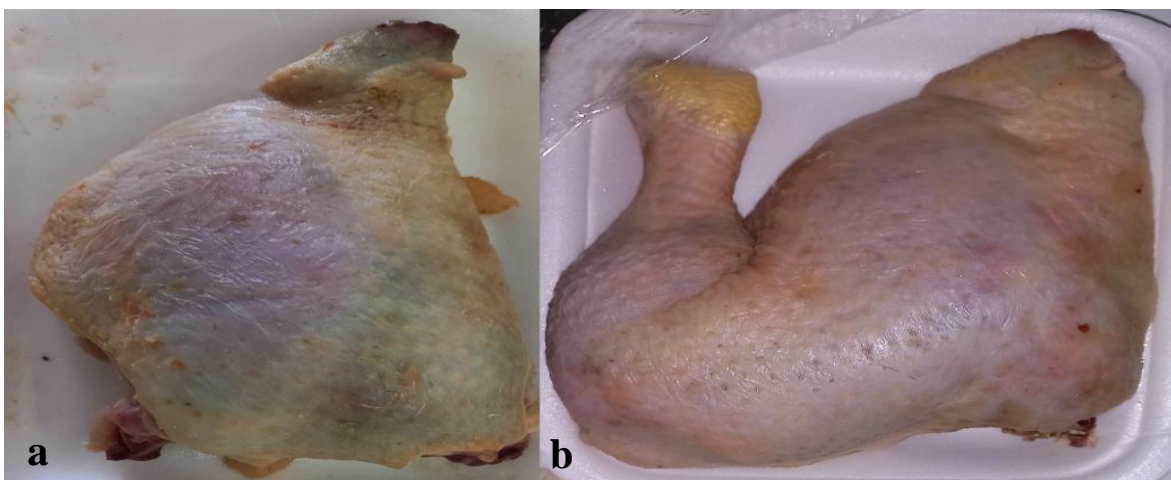


Figure 44 : Étude comparative entre (a) cuisse emballée avec film plastique seul et (b) cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym.

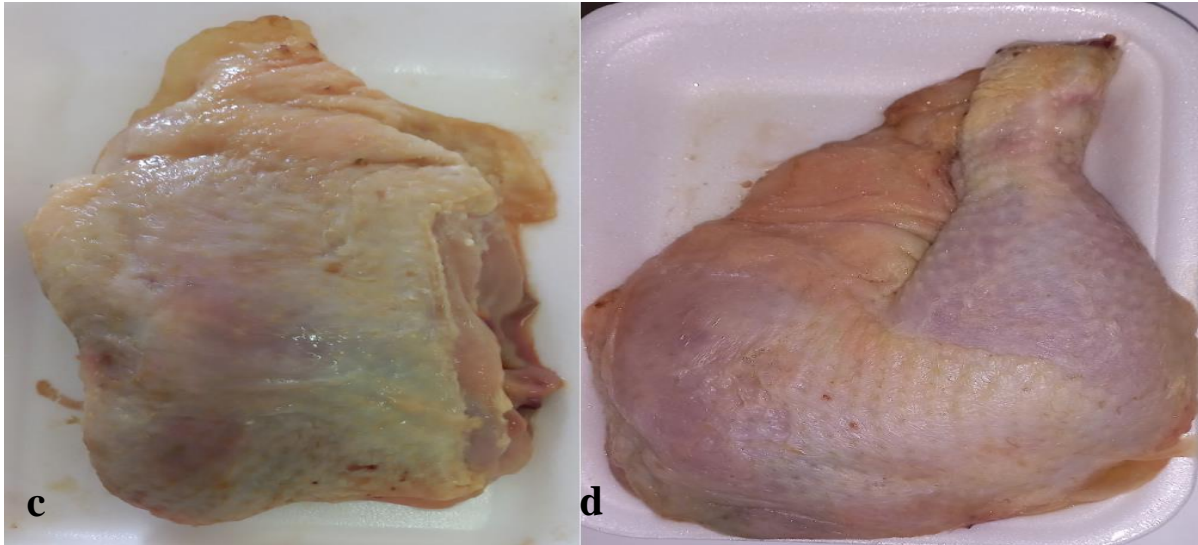


Figure 45 : Comparaison entre (c) cuisse contaminée par *E. coli*, puis emballée avec film plastique, et (d) cuisse contaminée par *E. coli*, puis emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym.

Dans le groupe 3 (figure 44 et 45), des similitudes avec le groupe 2 sont observées. La cuisse a et la cuisse b (emballée avec du film plastique contenant de l'HE de thym) révèlent des caractéristiques comparables en termes de coloration verdâtre persistante et d'odeur légèrement désagréable.

En parallèle, les cuisses c et d, exposées respectivement à la contamination par *E. coli*, puis emballées avec et sans l'HE de thym, illustrent des distinctions similaires à celles constatées dans le groupe 2.

En synthèse, ces observations révèlent de manière convaincante le potentiel marqué de l'HE de thym en tant qu'agent prophylactique visant à entraver de manière substantielle la prolifération microbienne. L'observation de la préservation remarquable des caractéristiques sensorielles positives, conjuguée à l'amélioration des attributs olfactifs et gustatifs lors de l'exposition à l'HE de thym, suggère clairement son utilité potentielle dans le cadre de la préservation des produits alimentaires. Ces constatations évoquent ainsi une perspective prometteuse pour l'intégration stratégique de l'HE de *T. algeriensis* en tant qu'agent bioconservateur dans les pratiques de conservation alimentaire, en offrant une solution envisageable pour prolonger la durée de conservation tout en préservant la qualité organoleptique.

IV.2. Résultats des tests microbiologiques des effets de l'HE de thym sur les cuisses de poulet

Initialement, l'ensemencement des boîtes de culture avec une base de gélose DCA a été effectué. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas présenté des résultats satisfaisants. En réponse à cette situation, une transition vers l'ensemencement sur gélose PCA a été entreprise, et cela s'est avéré fructueux, offrant des résultats précurseurs plus prometteurs pour notre étude.

L'ensemencement des boîtes de culture utilisant une base de gélose PCA a été exécuté sur les échantillons de viande de poulet exempts de contamination bactérienne. Parallèlement, les spécimens de viande de poulet, intentionnellement contaminés par la souche bactérienne *E. coli* ATCC 25922, ont été ensemencés sur des géloses HEKTOEN. Ces démarches sont explicitées visuellement dans les figures 46, 47, 48, 49 et 50.

Les boîtes de culture qui ont été ensemencées se sont révélées trop denses pour dénombrement précis. Par conséquent, notre analyse a dû se concentrer sur la détection qualitative de la présence ou de l'absence de colonies bactériennes dans les boîtes de Petri. Ces résultats ont néanmoins démontré des indications prometteuses quant à l'efficacité de nos méthodes.

- **Témoins**

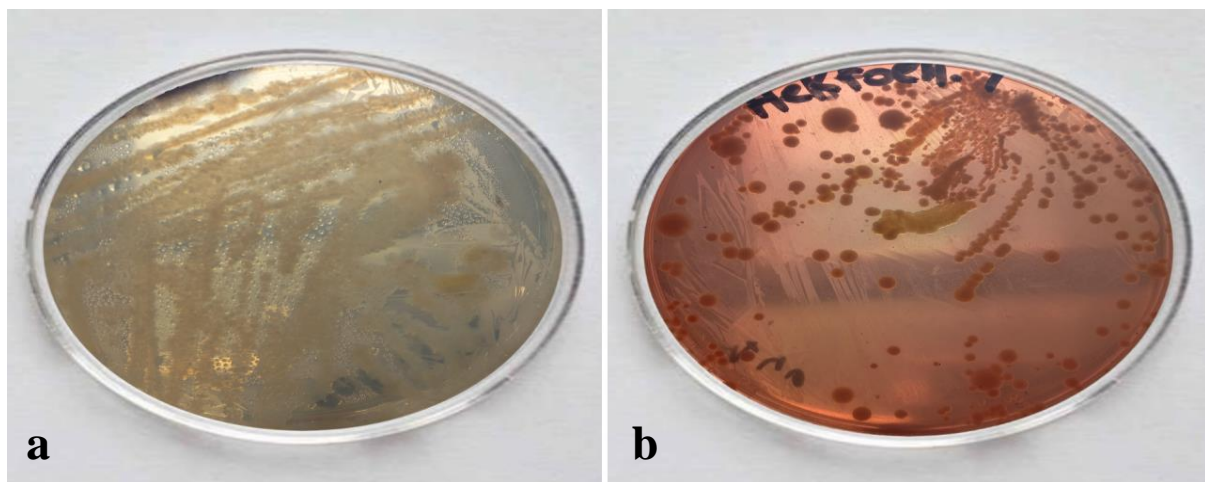


Figure 46 : Profil microbiologique de cuisse de poulet témoin : (a) milieu PCA ; (b) milieu Hektoen.

- **Emballage barquette + film plastique**

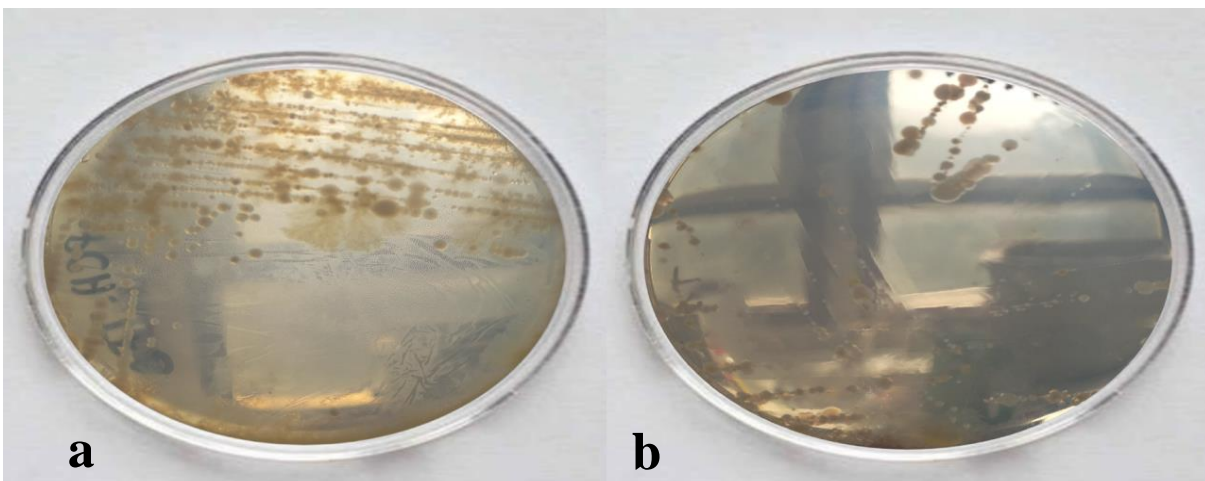


Figure 47 : Impact de (a) l'emballage plastique et (b) de l'HE de thym sur la qualité microbiologique des cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA).

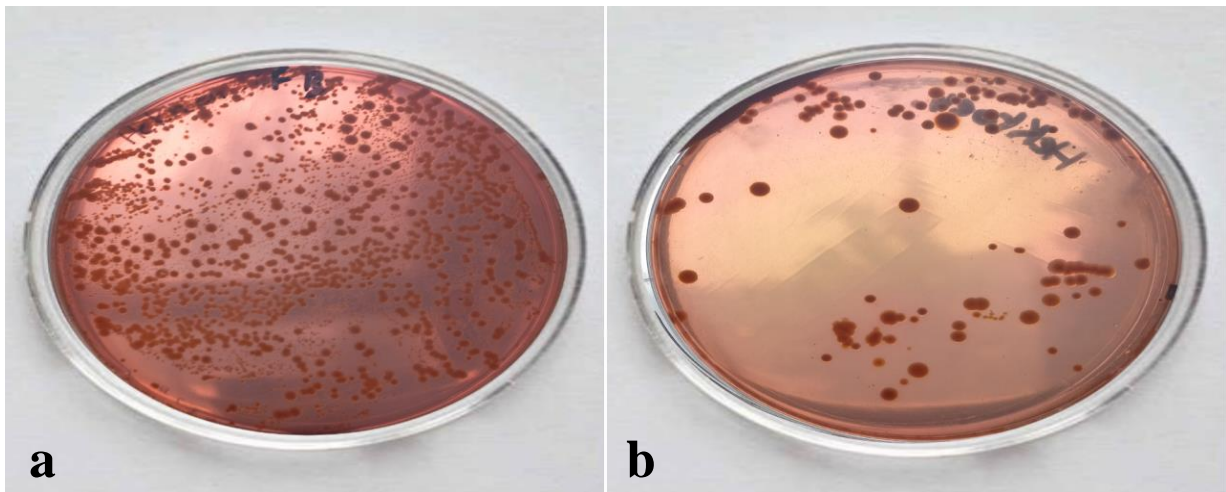


Figure 48 : Résultats d'emballage des cuisses de poulet contaminer intentionnellement par *E. coli* : comparaison (a) film plastique ; (b) emballage à l'HE de thym (milieu Hektoen).

- Emballer complètement avec film plastique sans barquette :

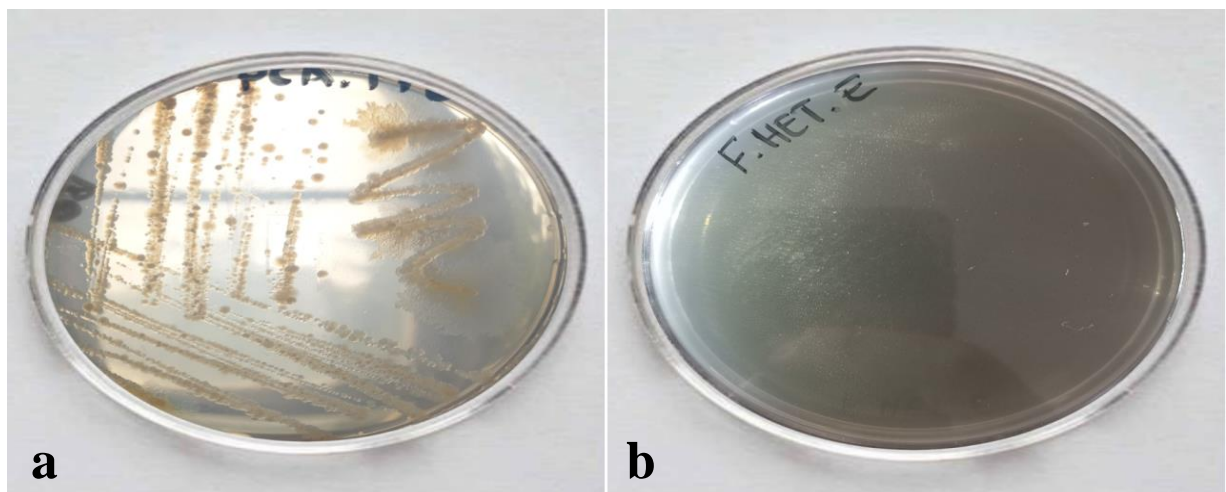


Figure 49 : Comparaison de (a) l'emballage plastique simple et de (b) l'emballage à l'HE de thym pour la conservation microbienne des cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA).

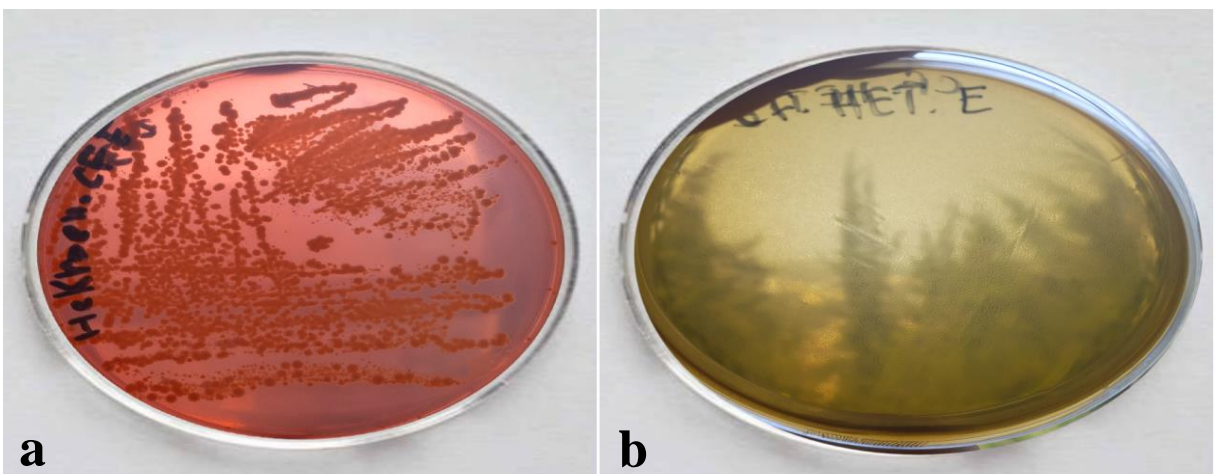


Figure 50 : Résultats d'emballage des cuisses de poulet contaminer intentionnellement par *E. coli* : comparaison (a) film plastique ; (b) emballage à l'HE de thym (milieu Hektoen).

IV.2.1. Echantillon témoin non emballé

Un échantillon (N°1) a été sélectionné pour servir de groupe témoin pour les deux méthodologies susmentionnées. Par la suite, 2 boîtes de Petri ont étéensemencées (PCA ; Hektoen) en vue de cultiver des colonies bactériennes, comme représenté dans la figure 46.

Une prolifération de colonies bactériennes a été constatée dans les 2 boîtes de culture, analogue à l'observation réalisée sur l'échantillon témoin.

IV.2.2. Méthode d'emballage (barquette + film plastique)

a. Echantillons non contaminées (PCA)

Le 2^{ème} échantillon de cuisse de poulet a été placé dans une barquette, puis enveloppé avec un film alimentaire non traité avec l'HE de *T. algeriensis*. Par la suite, on a procédé à un ensemencement du prélèvement sur PCA. Nous observons une présence notable de colonies bactériennes. Ces résultats révèlent l'impact de l'absence de traitement à base d'HE *T. algeriensis* sur la prolifération bactérienne.

Le 3^{ème} échantillon de cuisse de poulet a été disposé dans une barquette, puis enveloppé avec un film alimentaire ayant été traité avec l'HE de *T. algeriensis*. Conséquemment, cet échantillon a été soumis à un ensemencement, une réduction de la charge bactérienne a été observée.

Toutefois, il est à noter que cette réduction n'a pas conduit à l'élimination complète de la charge microbienne. Ces observations mettent en évidence le caractère modérateur de l'effet volatil de l'HE de *T. algeriensis* sur la prolifération bactérienne, du fait de son absence de contact direct avec la matrice de viande (Figure 47).

b. Echantillons contaminées (Hektoen)

Le 4^{ème} échantillon de cuisse de poulet a été intentionnellement contaminé avec la souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922. Cet échantillon, a été mis dans une barquette enveloppé avec un film alimentaire non traité par d'HE de *T. algeriensis*, a ensuite étéensemencé. Observation de présence d'une charge importante de colonies bactériennes sur la boîte de Petri.

Le 5^{ème} échantillon de cuisse de poulet a été volontairement contaminé avec la souche bactérienne *E. coli* ATCC 25922. Postérieurement à cette étape, l'échantillon a été disposé dans une barquette et enveloppé de film alimentaire imprégné d'HE de *T. algeriensis*. Par la suite, une phase d'ensemencement a été réalisée. Il est à noter qu'une observation minutieuse de la boîte de culture a révélé une réduction notable des colonies bactériennes, marquant ainsi un impact de l'application de l'HE de *T. algeriensis* sur le dénombrement des micro-organismes et confirmant ainsi son effet volatil inhibiteur (Figure 48).

IV.2.3. Emballage complet de l'échantillon avec un film plastique (sans barquette)

a. Echantillons non contaminées (PCA)

Lors de l'ensemencement d'un échantillon (N°6) de cuisse de poulet enrobé avec un film alimentaire non traité, nous avons observé une prolifération de colonies bactériennes.

Le 7^{ème} échantillon de cuisse de poulet, enrobé avec un film alimentaire traité à base d'HE de *T. algeriensis*, a étéensemencé, et nous avons observé l'absence totale de colonies bactériennes.

Ces résultats indiquent clairement que l'HE de *T. algeriensis* a exercé une action inhibitrice sur toute croissance microbienne, démontrant ainsi son efficacité en tant qu'agent antimicrobien potentiel pour la préservation de la viande de poulet (Figure 49).

c. Echantillons contaminées (Hektoen)

Dans le cadre de cette étude, un échantillon (N°8) de cuisse de poulet a été intentionnellement contaminé avec la souche bactérienne *E. coli ATCC 25922*. Cet échantillon, enrobé avec un film alimentaire non traité à base d'HE de *T. algeriensis*, a ensuite étéensemencé.

Nous avons procédé à l'analyse microbiologique de l'échantillon et constaté une présence considérable de colonies bactériennes.

Le 9^{ème} échantillon de viande, volontairement contaminé avec la souche bactérienne *E. coli ATCC 25922*, a été enrobé avec un film alimentaire traité à base d'HE de *T. algeriensis*. Après l'ensemencement, nous avons procédé à l'observation de la boîte de Petri contenant l'échantillon. À notre grande satisfaction, aucun signe de croissance microbienne n'a été constaté.

Ces résultats démontrent clairement l'efficacité inhibitrice de l'HE de *T. algeriensis* vis-à-vis de la souche bactérienne *E. coli ATCC 25922*, ce qui souligne son potentiel en tant qu'agent antimicrobien prometteur pour la préservation de la viande et la lutte contre la contamination bactérienne (Figure 50).

Ces deux stratégies mises en œuvre se sont révélées efficaces dans la maîtrise de la prolifération bactérienne. Néanmoins, il est important de noter que la méthode d'enrobage s'est avérée plus efficace que la méthode utilisant des barquettes, comme en témoignent les résultats. Dans la méthode d'enrobage, l'HE de *T. algeriensis* a été en contact direct avec la viande de poulet, tandis que dans la méthode des barquettes, son action s'est manifestée sous forme d'effet volatil sur les souches bactériennes.

La conservation des aliments avec les produits naturels était utilisée depuis l'antiquité. On conservait les viandes dans de l'huile et les épices pour empêcher son oxydation et son altération (Djenane et al., 2009).

Les extraits et les HEs sont soumis à des essais au sein de diverses matrices alimentaires. Dans l'ensemble, des résultats extrêmement prometteurs ont été observés spécifiquement en ce qui concerne les viandes et leurs dérivés.

Les tests *in vitro* de ces HEs donnent souvent des résultats satisfaisant mais son application sur la matrice alimentaire demande des concentrations supérieures pour assurer leur effet antimicrobien. Les produits carnés riches en graisse diminuent l'effet antimicrobien car les molécules lipidiques isolent ou fixent les molécules d'HEs (Burt, 2004).

La viande étant un produit facilement périssable intéresse beaucoup de scientifique. DJENANE *et al.* (2012) ont testé l'extrait brut des feuilles d'olivier sur la viande de dinde fraîche, il a obtenu des résultats prometteurs pour l'industrie de la viande de dinde fraîche car la durée de vie de cette denrée alimentaire a été prolongé de quelques jours. L'extrait brut des feuilles d'olivier n'a pas changé les qualités sensorielles de la viande.

Le thym, une plante connue en Algérie et utilisée dans le domaine culinaire. Les résultats obtenus après l'application de son HE sur des souches pathogènes : *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *C. albicans* étaient remarquables (Yakhlef *et al.*, 2011).

La composition et la concentration des HEs dans les aliments ont une influence significative sur leur activité antibactérienne, comme souligné par Oussalah *et al.* (2007). Leur étude a impliqué l'emballage de morceaux de viande rouge contaminés par des bactéries (*Pseudomonas spp* ou *E. coli*) avec des films bioactifs à base de thym ou de piment. Les résultats ont démontré l'efficacité de l'HE de *T. algeriensis* dans cette application.

Les membranes de l'HE de thym ont inhibé la croissance des coliformes thermotolérants (45 °C), *E. coli* et *Staphylococcus* dans la viande sur des plateaux sous réfrigération (température de 4,5 °C). Par conséquent, les membranes de fibres ont montré des caractéristiques prometteuses pour le développement d'emballages actifs pour les produits carnés (Eduarda C P *et al.*, 2023).

Généralement, les bactéries deviennent plus sensibles aux HEs à des pH faibles. L'hydrophobicité d'une huile essentielle augmente avec l'augmentation de l'acidité ce qui lui permet de se dissoudre plus facilement dans les lipides de la paroi cellulaire des microorganismes (Rasooli, 2007).

Selon Michiel *et al.* (2007), à pH bas les molécules de thymol et carvacrol, qui constituent les composés majeurs de l'HE de thym, sont sous forme indissociée et hydrophobe ce qui conduit à une meilleure association avec le côté hydrophobe des protéines donc, une bonne accumulation dans la phase lipidique de la membrane des cellules qui est le siège de beaucoup d'interactions métaboliques.

Dans le cadre de cette étude, une évaluation "*in vitro*" de l'HE de *T. algeriensis*, pure et diluée, a été entreprise, conduisant à des résultats probants contre des agents pathogènes tels que *S. aureus* ATCC 23922, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* 71453 et *A. niger* ATCC 16404.

La seconde phase de cette investigation, impliquant des essais "in situ" sur la viande de poulet, a révélé que l'HE de *T. algeriensis* a la capacité d'inhiber la croissance des microorganismes indésirables, spécifiquement la FPAT. Cette action inhibitrice a en conséquence prolongé la durée de conservation de la viande de poulet.

Toutes les recherches sur les HEs sont un but commun qui est de remplacer les antimicrobiens de synthèse et les conservateurs chimiques.



Conclusion

Cette étude avait pour objectif de déterminer les effets antimicrobiens du chitosane et de l'huile essentielle de *T. algeriensis*, ainsi que leur application potentielle dans les matériaux d'emballage pour influencer la qualité microbiologique du poulet. Les résultats ont révélé que l'HE de *T. algeriensis* possède une remarquable activité antimicrobienne, avec des zones d'inhibition significativement étendues pour les souches bactériennes et fongiques testées, y compris à des dilutions substantielles. En revanche, le chitosane montre des résultats moins probants contre *A. niger ATCC 16404*, suggérant des spécificités d'action.

L'application de l'HE de *T. algeriensis* et d'un film alimentaire sur les échantillons de cuisses de poulet témoigne d'une conservation efficace, en particulier contre la souche bactérienne *E. coli ATCC 25922*. Ces observations suggèrent l'efficacité de l'HE de *T. algeriensis* comme agent conservateur alternatif.

Cette étude contribue substantiellement à notre compréhension des propriétés antimicrobiennes des substances naturelles étudiées dans le contexte alimentaire. Elle ouvre des perspectives prometteuses pour l'utilisation de l'HE de *T. algeriensis* en tant qu'élément actif dans les emballages alimentaires, comme alternative aux conservateurs classiques. Cependant, il est essentiel de reconnaître que des limitations liées aux contraintes de ressources ont influencé cette recherche, soulignant la nécessité de recherches ultérieures plus approfondies.

À l'avenir, l'exploration de la matrice de chitosane comme matériau d'emballage actif antimicrobien constitue une opportunité intéressante pour la recherche. Malgré les défis rencontrés, cette étude ouvre la voie à des investigations ultérieures pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'antagonisme observé entre le chitosane et l'HE de *T. algeriensis*. En outre, l'application de l'HE de thym comme composant interactif dans les emballages alimentaires nécessite une exploration plus approfondie pour optimiser ses performances et garantir son innocuité.

Toutefois, il faut déterminer les interactions éventuelles entre ces agents antimicrobiens et la flore intestinale du consommateur.

Enfin, cette étude offre une perspective innovante dans le domaine des emballages alimentaires antimicrobiens et renforce l'importance croissante de l'utilisation de substances naturelles pour assurer la sécurité et la qualité des produits alimentaires.



Références bibliographique

« A »

- **Abdulmid A. Giweli ,Ana M. Džamić ,Marina D. Soković ,Mihailo S. Ristic & Petar D. Marin,** (2013). Composition chimique, activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Thymus algeriensis* poussant à l'état sauvage en Libye. *Journal d'Europe centrale de biologie*.
- **AFNOR** (2010). Liste des actualités : Huiles essentielles : extrait d'une norme fondamentale. <http://www.afnor.org/liste-des-actualités>.
- **Agnihotri S. & Vaidy A.D.B.,** (1996). A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. *Indian J. Exp. Biol.*, 34(7), 712-715.
- **Ait-Ouazzou A., Loràn S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagàna R. and Conchelloa P.** (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:2643–2651.
- **Alekshun, M. N. & Levy, S. B.** (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
- **Aljawish.A.** (2013). Thèse Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. L'université de lorraine.
- **Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah F, Aafi A, Aarab L, EL Ajjouri M, Chaouch A.,** (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. de Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1), 141-148.
- **Andrews, J. M.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Supplement_1), 5-16.
- **Attila E. Pavlath, Dominic W.S. Wong & George H. Robertson.** (2009). chitosan (preparation, structure, and Properties) IN *Concise Polymeric Materials Encyclopedia* edi-in-chief.

« B »

- **Becila A.** (2009). Préventions des altérations et des contaminations des aliments. Post-graduation spécialisée en Alimentation, Nutrition et Santé. Université Mentouri, Constantine.
- **Ben Abdelkader T.** (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces Méditerranéennes d'intérêt pharmacologique, Thèse de l'Ecole Normale supérieure, Kouba-Alger.
- **Benjlali B., Hammouni M., M'Hamedi A. & Richard H.,** (1987) a. Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis. *Sci. Aliments*, 7, 275-299.

- **Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thebault, A., Figueras, A. J.,** (1998) : Experimental Transmission Of *Marteilia Refringens* With Special Consideration Of The Life Cycle, *Diseases of Aquatic Organisms* (34) : 135-144.
- **Blackburn, C. d. W.** (2006). Introduction. *Food Spoilage Microorganisms*.
- **Boutaoui N., Zaiter L., Benayache F., Benayache S., Carradori S., Cesa S., Giusti A. M., Campestre C., Menghini L., Innosa D. and Locatelli M.** (2018). Qualitative and Quantitative phytochemical analysis of different extracts from *Thymus algeriensis* aerial parts. *Molecules*, 23, 463, 1-11.
- **Briston, J.H.,** (1980). Rigid plastics packaging. In: Palling, S.J. (Ed.), *Developments in Food Packaging*, Vol. 1. Applied Science, London, pp. 27_53.
- **Bruneton J.,** (1987). *Elément de phytochimie et de pharmacognosie*. Tec & Doc-Lavoisier, Paris.
- **Bruneton J.,** (1993). *Pharmacognosie photochimie plante médicinales*-.Tec &Doc Lavoisier, Paris.
- **Bruneton J.,** (1999). "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales" Editions Tec & Doc, Ed médicales internationales.
- **Burt S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.

« C »

- **Caillard J.,** (2003). Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. p6.
- **Caillet S., Lacroix M.,** (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut.
- **Caroline C., Rachel A & Marguerite R.,** (2006). Synthèse Et Etude D'hydrogels Thermosensibles Obtenus Par Modification Chimique Contrôlée Du Chitosane. L'actualité chimique N° 294-février.
- **CE Commision Europeene.** (2001). Proposition en matière de lutte contre la résistance microbienne.
- **Chao S.C, Young D.G. et Oberg G.J.** (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential oil Research*, 12,639- 649.
- **Chaussard, G.,** (2002). *Elaboration De Biomatériaux Innovants A Partir De Chitine Et Chitosane Issus De Plumes De Calmar En Vue D'une Application Biomédicale*. Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1.
- **Chemat S., Cherfouh R., Meklati B. Y. & Belanteur K.** (2013). Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 24:1, 5-11.
- **Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H., et Chan, W. Y.,** (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs*, 13(8), 5156-5186. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557018>

- **Cimanga K. et al.**, (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacology*, 79, 213-220.
- **Clevenger J.F.**, (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17, 336-341.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Eighth Informational Supplement. CLSI document M100-S28.
- **Codex Alimentarius.**, (2019). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires comité du codex sur l'étiquetage des denrées alimentaires.
- **Coma V., Deschamps A. and Martial-Gros A.**, (2003). Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer - Antimicrobial Activity Assessment on Dairy Related Contaminants. *Journal of Food Science.* (68) 2788-2792.
- **Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F.** (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- **Crini G.** (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology.* (97) 1061-1085.
- **Crini G. Badot P. M. Guibal E.**, (2007). Chitine et Chitosane, du Biopolymère A L'application, Ouvrage, Presses Universitaires de Franche-Comté, 305p.
- **Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D.** (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:6300–6308.
- **Cuero R.G.**, (1999). Antimicrobial Action Of Exogenous Chitosan. *EXS* (87) : 315-333.

« D »

- **Darmadji P, Izumimoto M.** (1994), Effect Of Chitosan In Meat Preservation. *Meat Science.* 38 : 243-254.
- **Dealvarenga Es, Deoliveira Cp, Bellato Cr.** (2010). An Approach To Understanding The Deacetylation Degree Of Chitosan. *Carbohydr Polym*, 80(4):1155-1160.
- **Desbrières J.** (2002). Chitine et chitosane. Université de Grenoble.
- **Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D., Mauriello G.** (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sub-lethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10:1040-1049.
- **Dion P.** (2000). Microbiologie générale, Notes des cours BIO-19934 et BIO-12286, Université Laval.

- **Djenane D., Yangüela J., Amrouche T. Boubrit S., Bousaad N. et Roncales P.** (2009). Agerien *pistacia lentiscus* and *satureja hortensis* essential oils : Their chemical composition and their perspective effects against *Listeria monocytogenes* 935- ATTC 13932 inoculated in meat. *New challenges in food preservation*. Processing-safety-SUSTAIN ABILITY. 11-13.
- **Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P.** (2012). Extrait de feuilles d'olivier ; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*, 10–18.
- **Dob T, Darhmane D, Benabdelkader T & Chelghoum T.C.,** (2006). Studies on the essential oils and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. *Int. J.Aromatherapy*, 16(2), 95-100.
- **Dubois-Brissonnet F. Briandet R et Bellon-Fontaine M.** (2006). Agents chimiques ou naturels : des outils de maîtrise de la contamination microbiologique des surfaces. *Chemical or natural tools to control*.
- **Dubois-Brissonnet F, Dietrich C, Bellon-fontaine MN** (2006). Resistance of planktonic and adherent-cells of *Salmonella* Typhimurium to natural antimicrobials. *Symposium Salmonella and Salmonellosis*. 10-12 may 2006. Saint-Malo (France). sous presse.

« E »

- **Eduarda Caetano Peixoto, Laura Martins Fonseca, Elessandra da Rosa Zavareze, Eliezer Avila Gandra.** (2023) Antimicrobial active packaging for meat using thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) encapsulated on zein ultrafine fibers membranes, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 51, 2023, 102778.
- **Espinel-Ingroff, A.** (1998). Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of clinical microbiology*, 36(5), 1440-1446.
- **European pharmacopoeia** (2004). In: 5e éd. 2004. p. 217-8.

« F »

- **Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- **Franchomme P. et Pénoël D.,** (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. In : étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- **Franck JF, Koffi RA** (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Protec.*

« G »

- **Gimenez .R et Aoussat. A** (2011)., Approche sémantique et lexicale pour définir le concept " d'emballage actif ". Laboratoire Conception de Produit et Innovation, 151, bd. De l'hôpital 75014 PARIS.
- **Goff, D. A.** (2010). Antimicrobial resistance: significance and impact on public health. In *Antibiotic Policies: Fighting Resistance* (pp. 3-12). Springer, Berlin, Heidelberg.
- **Gökbulut A.** (2015). Validated RP-HPLC Method for Quantification of Phenolic Compounds in Methanol Extracts of Aerial Parts and Roots of *Thymus sipyleus* and Evaluation of Antioxidant Potential. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (10): 1871-1877.
- **Gontard N.**, (2000). Les emballages actifs. Éditions *Tec & Doc Lavoisier*. Édition LONDRES- PARIS-NEW YORK, 2-10 pp.
- **Guiraud J.** (1998). Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques. Edition Dunod, Paris.
- **Guiraud J.P.** (2003). Microbiologie alimentaire .Edition Dunod, paris.

« H »

- **Hallan. Chaib K.**, (2017). Contribution a purification de la chitine a partir des coproduits de crevette rouge: caractérisation des produits et optimisation de procédé, Mémoire De Master En Hydrobiologie Marine Et Continentale, Spécialité : Exploitation Et Protection Des Ressources Marines Vivantes, Université De Mostaganem, p.20.
- **Han, J. H.** (2000). Antimicrobial Food Packaging. *Food Technology*, 54(3), 56.
- **Hassiotis, C. N.** (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 493-501.
- **Helander I. M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J.,Gorris L. G. M., and von Wright A.** (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- **Howell, K.** (2016). Spoilage: yeast spoilage of food and beverages. In: Caballero, B., Finglas, P.M., Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 5. Academic Press, Oxford, pp. 113-117., 113.

« I »

- **Imloul, M and Bouridah, Y.** (2021). Etude de l'extraction de l'huile essentielle d'eucalyptus radié et globulus, caractérisation physico-chimique et chromatographie HPLC.

« J »

- **Jardine A. Sayed S.**, (2017). Valorisation Of Chitinous Biomass For Antimicrobial Applications, Article Published On Researchgat.

- **Jayari A., El Abed N., Jouini A., Saed Abdul-Wahab O. M., Maaroufi A., Ben Hadj Ahmed S.** (2017). Antibacterial activity of *Thymus capitatus* and *Thymus algeriensis* essential oils against four food-borne pathogens inoculated in minced beef meat. *Journal of Food Safety*,38:12409.
- **Jean-Louis.Cuq.** (2007). Microbiologie alimentaire. Professeur à l'Université Montpellier II. Sciences et Technologies du languedoc.
- **Joffin.J.C.,** (2003). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris.
- **Juneja V. K., Thippareddi H., Bari L., Inatsu H., Kawamoto S. & Friedman M.,** (2006). *J. Food Sci* 71.M236.

« K »

- **Kalut, S. A.,** (2008). Enhancement Of Degree Of Deacetylation Of Chitin In Chitosan Production (Pp. 5-31).Pahang, Malaysia: Faculty Of Chemical Engineering And Natural Resources, Universiti Malaysia Pahang.
- **Kaminski W., Tomczak E. and Jaros k.** (2008). Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads. *Desalination.* (218) 281-286.
- **Kangde Yao, Junjie Li, Fanglian Yao, Yuji Yin. Teng, D.** (2012). From chitin to chitosan.In *Chitosan-Based Hydrogels Functions and Applications* eds. CRC Press-Taylor and Francis.
- **Khobzaoui S.,** (2014). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits des noyaux des dattes variété « Ajwa », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Abou Bekr Belkaïd.Tlemcen.
- **Knowles J, Roller S** (2001) Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. *J. Food Protec.,* 64 (10), 1542-1548.
- **Kouache, B.,** (2019).Valorisation des huiles essentielles de Lamiaceae Algériennes (*Origanum* et *Thymus*).Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de doctorat en sciences. Université Hassiba Benbouali de Chlef.
- **Kreyenschmidt. J et Ibald.R.,** (2012). 6 Chapter Modeling Shelf Life Using Microbial Indicators. Shelf life assessment of food, 127p.
- **Kulišić T., Dragović-Uzelac V., & Miloš M.** (2006). Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology.*44(4), 485-492.
- **Kurita, K.,** (2006) : Chitin and Chitosan : Functional Biopolymers From Marine Crustaceans, *Marine Biotechnology* (8) : 203-226.

« L »

- **Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G. J. E. A.** (2001). Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology,* 91: 453-462.

- **Lamiri A., Lhaloui S., Benjlali B. & Berrada M.,** (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor*. *Field Crops Res.*, 71, 9-15.
- **Lechevallier Mw, Cawthon Cd, Lee Rg** (1988). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 649-654.
- **Lee, D.S., Yam, K.L., Piergiovanni, L.,** (2008). Shelf-life of packaged food products. *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 479_542.
- **Lesage M. (2013).**Toxi-infections alimentaires, évolution des modes de vie et production alimentaire. Centre d'étude et de prospectives. pp:2-3-4. Montreuil, paris.
- **Lyijynen, T., Hurme, E., Ahvenainen, R.,** (2003). Optimizing packaging. In: Ahvenainen, R. (Ed.), *Novel Food Packaging Techniques*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 441_458.

« M »

- **Martins, A.** (2020). Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus). <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03230057>
- **Meyer A., Deiana J., Bernard A.** (2008). cours de microbiologie générale. 2ème édition doin. 252-253.
- **Michiel S. J., Missotten, Fremaut D., De Smet S., Dierrick N.** (2007). in vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. Department Biowetenschappen en Lands –chaps architecture. Hog school Gent, Voskenslaan 270, 9000 Ghent, Belgium.
- **Mirsharifi SM, Sami M, Jazaeri M, Rezaei A.** (2023) Production, characterization, and antimicrobial activity of almond gum/polyvinyl alcohol/chitosan composite films containing thyme essential oil nanoemulsion for extending the shelf-life of chicken breast fillets. *Int J Biol Macromol*. F1; doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.12.183. Epub 2022 Dec 20. PMID: 36563800.
- **Muzzarelli Raa.,** (1997) : Chitosan As Dietary Food Additives In : Applications Of Chitin And Chitosan, Goosen MFA, Ed, Lancaster : Technomic Publishing 115.

« N »

- **Nabet N.** (2009). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des substances végétales actives (polyphénols et huiles essentielle) et de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* .Pp :130.Université Abderrahmane MIRA. Bejaia.
- **Nacim zouari., Nahed Fakhfakhe., Sami Zouari., Ali Bougateg., Aida Karray., Mohamed Neffati., MA Ayadi.**(2011). Composition chimique, activités inhibitrices, antioxydantes et antimicrobiennes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I de l'huile essentielle de thymus algeriensis boiss tunisien.et Reut.(Lamiacées).

- **Nadjat Ardjoum, Nacera Chibani, Shiv Shankar, Stephane Salmieri, Hocine Djidjelli, Monique Lacroix.** (2023). Incorporation of *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of propolis improved the antibacterial, barrier and mechanical properties of corn starch-based films, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 224, , Pages 578-583,
- **Nikolić M, et al** (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*.

« O »

- **Olteanu C.E. ; ENESCU D.** (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. *Romanian Biotechnological Letters*. (12) 3217-3233.
- **Onsoyen E. ; Skaugrud O.** (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (49) 395-404.
- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M.,** (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18,414–420.
- **Özgen U., Mavi A., Terzi Z., Kazaz C., Asci A., Kaya Y., Secen H.** (2011). Relationship between chemical structure and antioxidant activity of luteolin and its glycosides isolated from *Thymus sipyleus* subsp *sipyleus* var. *sipyleus*. *Records of Natural Products*, 5:12-21.

« P »

- **Paster N. et al.,** (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on molds and foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11, 33-37.
- **Pellecuer J., Jacob M., Simeon de Buechberg M. & Allegrini J.,** (1980). Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L.). *Acta Hort.*, 96, 35-39.
- **Perry J., Staley J., Lory S ET al.** (2002). *Microbiologie. Cours et question de révision.* Edition Dunod.pp:159-160. Paris.
- **Pibiri M.C.** (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311. Faculté Environnement Naturel, architectural et construit, Institut des Infrastructures, des Ressources et de l'Environnement, Section d'Architecture, Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne.
- **Poirier M.** (2000).Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,NDiméthylacétamide Chlorure de lithium. Université de Laval; pp.
- **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C.E., Roura S.I.** (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36, 679–684.
- **Prabaharan M. and Mano J.F.** (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*. (12) 41-57.

- **Prescott, Harley et Klein** (1995). Microbiologie. *DeBoek-Wesmael.S.A.,1014*. Radhakrishnan V V., Madhusoodnan K.J. et Kuruvilla K.M., (1992) Cinnamon the spicy bark, *Spice India*; 5(4): 12-13.

« Q »

- **Quézel P. et Santa S.**, (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed du centre national de la recherche scientifique.Paris.Tome 2: 806, 784.
- **Quintavalla, S., & Vicini, L.** (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380.

« R »

- **Rabea I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smaghe G. and Steurbaut W.** (2003). Chitosane as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, vol.4, n°6, p.1457-1465.
- **Rasooli I.** (2007): food preservation – a bio-preservative approach, *food global science books* 1(2), p: 111.
- **Ravi Kumar.** (2000). , M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- **Règlement européen** ,(2009) RÈGLEMENT (CE) N° 450/2009 DE LA COMMISSION Concernant les matériaux et objets actifs et intelligents destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires.
- **Rhayour K.H.**, (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed ben Abdellah Faculté des sciences Dhar Mehraz-Fés.
- **Righi N., Boumerfeg S., Fernandes P AR., Deghima A., Baali F., Coelho E., Cardoso SM., Coimbra MA., Baghiani A.** (2020). *Thymus algeriensis* Bioss and Reut: Relation entre la composition des composés phénoliques et l'activité antioxydante et antibactérienne *in vitro/in vivo*.
- **Robertson, G.L.** (2013). *Food Packaging: Principles and Practice*, 3rd edition. CRC Press, Boca Raton.
- **Roussary A.** (2010).Vers une recomposition de la gouvernance de la qualité de l'eau potable en France. De la conformité sanitaire à l'exigence de qualité environnementale. Université Toulouse le Mirail - Toulouse II.
- **Russell, A. D.** (2007). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1535-1542.

« S »

- **Šcetar M., Debeaufort F., Benbettaieb N., Galic K., Kurek, M** (2021). Matériaux et procédés d'emballage pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

- **Schwammle B, Winkelhausen E, Kusmanova S et Steiner W.,** (2001). *Isolation of carvacrol Assimilating Microorganisms. Biotechnol. 39 (4).*
- **Seng J.M.,** (1988) : Chitine, Chitosane Et Dérivés: De Nouvelles Perspectives Pour L'industrie. Biofutur 9, Pp.40-44.
- **Sikkema J., de Bont J. A., Poolman B.** (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59(2):201-22.
- **Smith C.K., Moore C.A, Alahi E.N, Smart, A.T. et Hotchkiss, S.A.,** (2000). Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *ToxicoS*. In : étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse *Appl. Pharmacol.* 168,189-99.
- **Sogias I.A., Khutoryanskiy V.V. and Williams A.C.** (2010). *Macromol. Chem. Phys.* 2010, DOI: 10.1002/ macp.200900385.
- **Sperber, W. H.** (2009). Introduction to the microbiological spoilage of foods and beverages. In *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages* (pp. 1-40). Springer.
- **Sureau N, laurent-maquin D, Bouthors S, Gelle MP** (2006) Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, oxsil 320N. *J. Hosp. Infect.*
- **Touaibia, M.,** (2015). Composition chimique et activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur milieu de laboratoire et sur les fruits du fraisier. *Revue Nature et Technologie*, 7(1), 65-70. <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/39944>.

« U »

- **Ueno H., Mori T. and Fujinaga T.,** (2001) : Topical Formulations And Wound Healing Applications Of Chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews.* (52) 105-115.
- **Ultee A., Bennink M. H. J., Moezelaar R.** (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1561–1568.

« V »

- **Vokou D, Chalkos D, Karamanlidou G, Yiangou G.,** (2002). Activation of soil respiration and shift of the microbial population balance to *Lavandula stoechas* essential oil. *J. of chem. Ecol.* 28(4), 755-768.

« W »

- **Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartolo R.G.** (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94:240–247.
- **Winterowd, J. G., and P. A. Sandford.**(1995). "Chitin and chitosan" IN *Food Polysaccharides and Their Applications.*

- **Wydro P, et al** (2007). Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan - Lipid interactions. *Biomacromolecules*. (8) 2611- 2617.

« X »

- **Xu J., Zhou F., Ji B.P., Pei R.S., Xu N.** (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47:174-179.

« Y »

- **Yakhlef G., Laroui S., Mambaba L., Aberkane M-C. et Ayachi A.** (2011). Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie*, 9, 209-218.
- **Yrjöen T.** (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, p. 76.

« Z »

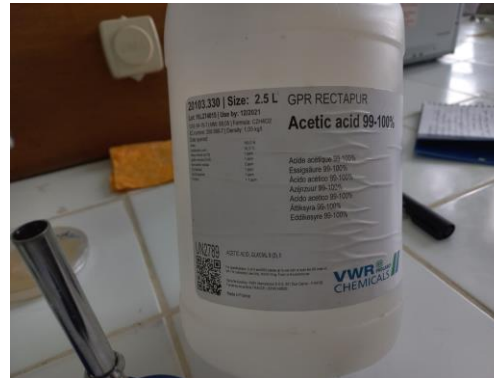
- **Zhiri A.** (2006). Aromatherapie, un peu d'histoire. *Neutra News*, 1-16.
- **Ziani B. E.C., Heleno S. A., Bachari K., Dias M. I., Alves M. J., Barros L., Ferreira C.F.R.I.** (2018). Phenolic compounds characterization by LC-DAD- ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Research International*.



Annexes

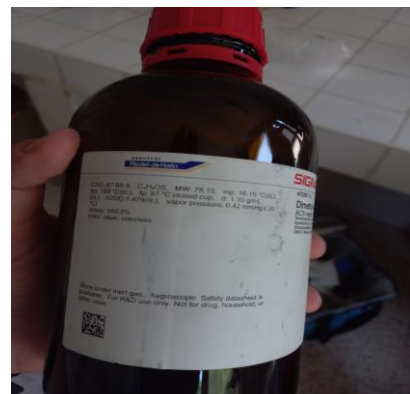
Annexe 01 : Composition de l'acide acétique

- Teneur : 100,0 %.
- Point de solidification : 16,3°C.
- Métaux lourds (sous forme de Pb) : 1 ppm.
- Résidu d'ignition : 1 ppm.
- Résidu non volatil : 2 ppm.
- Chlorure : 1 ppm.
- Sulfate : 1 ppm.
- Fer : < 1 ppm.



Annexe 02 : Composition de DMSO

- CAS : 67-68-5 / C_2H_6OS / MW : 78,13.
- Point de fusion : 16-19 °C (vérifié).
- Point d'ébullition : 189 °C (vérifié).
- Point d'éclair : 87 °C.
- Densité : 1,10 g/mL (vérifié).
- Indice de réfraction $n_{20/D}$: 1,479 (vérifié).
- Pression de vapeur : 0,42 mmHg (20 °C).
- Teneur : $\geq 99,9$ %.
- Apparence : liquide clair, incolore.



Annexe 03 : Processus abattage de poulet

Le processus d'abattage se déroule selon des étapes méthodiquement orchestrées pour garantir l'intégrité de la viande et la conformité aux normes de sécurité alimentaire. Prélude à l'abattage, une période de jeûne de huit heures est instaurée, suivie du rassemblement manuel des poulets dans des caisses en plastique. Durant le transport, une ventilation adéquate est maintenue pour éviter la suffocation des volailles.

L'abattage proprement dit commence par une inspection préalable, incluant la vérification de l'âge, de l'agrément de l'abattoir et de l'état sanitaire, ainsi que la mise en œuvre d'une démarche HACCP. Les volailles sont ensuite déchargées dans un environnement serein pour préserver leur bien-être. Accrochées par les pattes, elles suivent un parcours où l'étourdissement par électroanesthésie par bain d'eau induit un état de tranquillité temporaire.

La saignée, réalisée dans les quinze secondes suivant l'étourdissement, est une étape vitale et exécutée avec célérité. L'échaudage à 52 °C facilite le plumage en préparation de l'étape suivante. Les plumeuses mécaniques éliminent les plumes, puis vient l'éviscération manuelle, retirant minutieusement les organes internes. L'étape de lavage, pour les volailles et les abats, est suivie d'un tri post-mortem visant à séparer les produits destinés à la consommation de ceux destinés à la transformation.

La séquence de ressuage élimine l'humidité tissulaire, favorisant une conservation optimale à une température de 4 °C. La découpe, réalisée manuellement avec expertise, prépare les produits en fonction des demandes clients. Après l'emballage en barquettes, assorti d'une étiquette comprenant des informations cruciales, les produits sont stockés dans des chambres de réfrigération à 4 °C ou des chambres froides négatives à -18 °C à -20 °C pour les congelés.

L'expédition s'effectue dans des véhicules frigorifiques spécialisés, garantissant la préservation de l'innocuité du produit tout au long du parcours jusqu'au consommateur final.

Annexe 04 : Autre matériel

- **Petit matériel :**

- Anse de platine.
- Bec bunsen.
- Blouses.
- Boîtes de Petri.
- Compresses stériles.
- Disques d'antibiotiques.
- Disques stériles de 6 mm de diamètre.
- ECBU.
- Ecouvillons.
- Embouts stériles.
- Gants à usage unique non stériles.
- Sac isothermique.
- Lames et lamelles.
- Micropipettes.
- Parafilm.
- Pipettes pasteurs.
- Poire.
- Portoir.
- Tubes en verre stérile.
- Tubes Eppendorf.
- Tubes Falcon.

- **Grand matériel :**

- Agitateur magnétique.
- Agitateur vortex.
- Autoclave.
- Bain-marie.
- Balance de précision électronique.
- Centrifugeuse.
- Etuve.
- HPLC-DAD-UV.
- Microscope optique.
- Plaque chauffante.
- Spectrophotomètre.

Annexe 05 : Préparation d'eau physiologique stérile

Il s'agit d'une solution liquide isotonique qui partage la même osmolarité que les fluides corporels essentiels, notamment le sang.

Elle est composée de l'eau distillée plus le chlorure de sodium NaCl diluée à 9 % pour un litre d'eau.

Puis autoclaver à 120 °C pendant 20 mn
pH = 7.



Annexe 06 : Les milieux de cultures

• Préparation de gélose MH

Une masse de 38 g de poudre de Muller Hinton a été dissoute dans 1 L d'eau distillée. Le mélange a été soigneusement agité à l'aide d'un agitateur magnétique et chauffé dans un erlenmeyer sur une plaque chauffante à agitation magnétique jusqu'à atteindre le point d'ébullition. Puis autoclave durant 15 minutes à 121,1°C.

Ce milieu préparé est spécifiquement utilisé pour la réalisation des antibiogrammes, qui permettent d'évaluer la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques.

• Préparation de gélose desoxycholate Citrate Agar (DCA)

Sous des conditions stériles, une masse de 17,5 g de DCA a été dissoute dans 250 ml d'ED stérile. Le mélange a été méticuleusement agité tout en étant chauffé dans un Erlenmeyer positionné sur une plaque chauffante jusqu'à ce qu'il atteigne le point d'ébullition. Cette approche rigoureuse permet d'obtenir une dissolution complète du DCA dans l'eau distillée stérile.



• Gélose PCA

- Tryptone.....5 g
- Glucose.....1 g
- Extrait de levure.....2,5 g
- Agar.....15 g

pH = 7,3±0,2

• Milieu Chapman

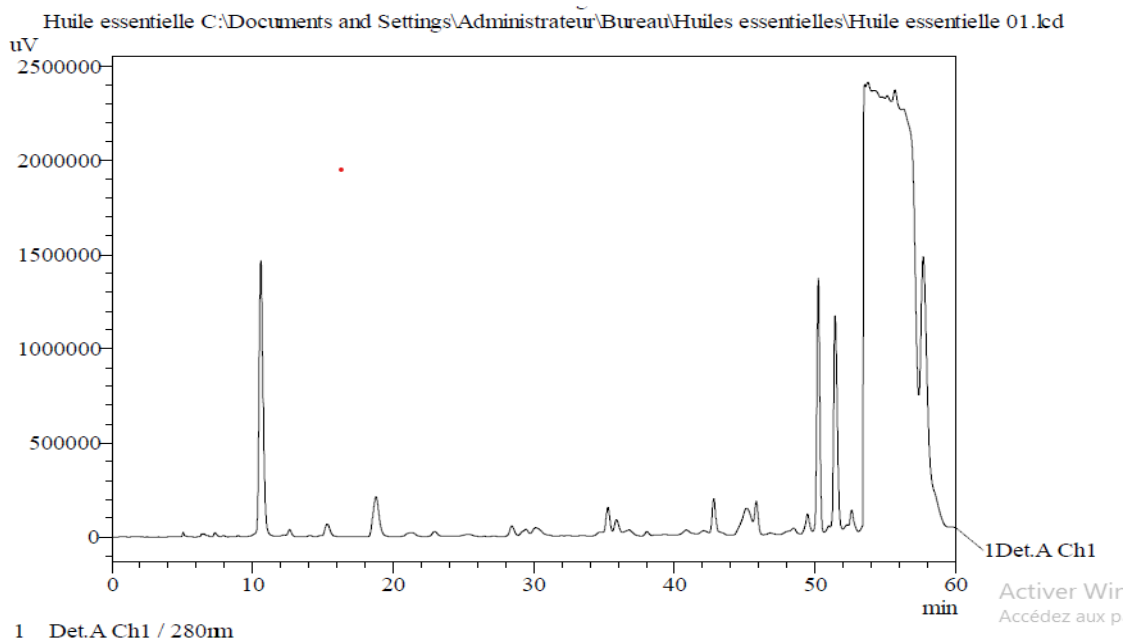
- Extrait de viande.....1 g
- Peptone.....10 g
- Chlorure de sodium.....75 g
- D Mannitol.....10 g
- Rouge de phénol.....25 mg
- Gélose.....15 g
- Eau distillée.....1000 ml

• Milieu Hektoen

- Protéose peptone.....12 g
- Extrait de levure.....3 g
- Chlorure de sodium.....5 g
- Thiosulfinate de sodium.....5 g
- Sels biliaires.....9 g

- Citrate de fer ammoniacal.....1,5 g
- Salicine.....2 g
- Lactose.....12 g
- Saccharose.....12 g Non autoclavable
- Fuchsine acide.....0,1 g pH = 7,5± 0,2
- Bleu de bromothymol.....0,065 g
- Agar.....13 g
- Eau distillée.....1000 ml

Annexe 07 : HPLC (Shimadzu LC 20)



Annexe 08 : Conservation des différentes dilutions du chitosane et de HE de thym



Annexe 09 : Etude statistique (Logiciel Stat BOX)

• ANOVA 1 :

ECARTS-TYPES DES RESIDUS

ECARTS-TYPES FACTEUR 1 =T bact

1 (E C)	2 (S AU)
2,205	4,054

KHI2 = 3.679 PROB=0.05209

ECARTS-TYPES FACTEUR 2 = AB

	1 (T)	2 (CH)	3 (HET)
	0	1,753	5,513

KHI2 = 7.176 PROB=0.00731

ECARTS-TYPES INTER

F1*2=T bact AB

	1 (E C)	2 (S AU)
1 (T)	0	0
2 (CH)	2,217	1,5
3 (HET)	3,594	7,616

KHI2 = 7.543 PROB=0.05546

- ANOVA 2 :

ECARTS-TYPES DES RESIDUS

ECARTS-TYPES FACTEUR 1 = T bact

1 (C.albicans)	2 (A.niger)
4,607	0,892

KHI2 = 20.743

PROB=0.00001

ECARTS-TYPES FACTEUR 2 = AB

1 (T)	2 (CH)	3 (HET)
0	0,627	5,849

KHI2 = 20.276

PROB =0.00002

ECARTS-TYPES INTER F1*2 = T bact AB

	1 (C.albicans)	2 (A.niger)
1 (T)	0	0
2 (CH)	0,957	0
3 (HET)	8,77	1,708

KHI2 = 11.894

PROB =0.00281

ANALYSE DE VARIENCE 2

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2048,958	23	89,085				
VAR.FACTEUR 1	51,042	1	51,042	3,793	0,0645		
VAR.FACTEUR 2	1540,083	2	770,042	57,217	0		
VAR.INTER F1*2	215,583	2	107,792	8,009	0,00333		
VAR.RESIDUELLE 1	242,25	18	13,458			3,669	19,61%

MOYENNES

MOYENNE GENERALE = 18.708

MOYENNES FACTEUR 1 = T bact

1 (C.albicans)	2 (A.niger)
20,167	17,25

MOYENNES FACTEUR 2 = AB

1 (T)	2 (CH)	3 (HET)
27,5	8,125	20,5

MOYENNES INTER F1*2 = T bact AB

	1 (C.albicans)	2 (A.niger)
1 (T)	25	30
2 (CH)	10,25	6
3 (HET)	25,25	15,75

NOMBRE DE
MOYENNES
VALEURS DES
PPAS

	2	3
	3,855	4,678

F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
1.0	T	27,5	A		
3.0	HET	20,5		B	
2.0	CH	8,125			C

INTER F1*2 : T bact-AB

NOMBRE DE
MOYENNES
VALEURS DES
PPAS

2	3	4	5	6
5,452	6,616	7,328	7,842	8,244

F1 F2	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES		
2.0 1.0	A.niger T	30	A		
1.0 3.0	C.albicans HET	25,25	A		
1.0 1.0	C.albicans T	25	A		
2.0 3.0	A.niger HET	15,75		B	
1.0 2.0	C.albicans CH	10,25			C
2.0 2.0	A.niger CH	6			C

Annexe 10 : Application de l'HE de thym sur le film alimentaire

Appliquer de manière homogène à l'aide d'un écouvillon stérile l'HE de thym sur le film plastique utilisé pour emballer certaines des cuisses de poulet. Veiller à ce que l'application soit uniforme sur toute la surface du film plastique



Annexe 11 : Contamination des cuisses poulet :

Dans un environnement exempt de contamination, l'expérimentation débute par la création d'une culture bactérienne d'*E coli* préalablement normalisée à la phase exponentielle de son cycle de croissance. La distribution uniforme de la bactérie sur la surface des cuisses de poulet est accomplie au moyen d'un écouvillon stérile.



Annexe 12 : Souches microbienne

- *Escherichia coli*

Forme	Coco-bacille
Gram	Négatif
Culture	Aérobie
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Coli</i>
Nom courant	Colibacille
Habitat	Constitue la majorité de la flore intestinale aérobie; se retrouver également au niveau des muqueuses l'homme et de l'animal.

- *Staphylococcus aureus*

Forme	Cocci
Gram	Positif
Culture	Aerobic-anaerobic facultatif
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Aureus</i>
Nom courant	<i>Staphylocoque doré</i>
Morphologie	Diplocoques ou amas
Habitat	Peau, muqueuses, fosses nasales et le pharynx en majorité

- *Candida albicans*

Règne : Fungi.
 Division : Ascomycota.
 Classe : Saccharomycetes.
 Ordre : Saccharomycetales.
 Famille : Saccharomycetaceae.
 Genre : *Candida*.
 Espèces : *C. albicans*.

- *Aspergillus niger*

Règne : Fungi.
 Division : Ascomycota.
 Classe : Eurotiomycetes.
 Ordre : Eurotiales.
 Famille : Aspergillaceae.
 Genre : *Aspergillus*.
 Espèces : *Niger*.

Résumé

Thymus algeriensis se profile comme une option prometteuse comme bioconservateur. Le chitosane présente une modérée capacité inhibitrice. L'évaluation de l'efficacité antimicrobienne de l'HE de *T. algeriensis* et le chitosane sur deux souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 23922), ainsi que sur deux souches fongiques (*Candida albicans* 71453 et *Aspergillus niger* AATCC 16404), révèle que toutes les souches se montrent sensibles à l'HE pure, y compris à une dilution de 1/10. En revanche, le chitosane n'a pas pu inhiber *A. niger* ATCC 16404. Les diamètres des zones d'inhibition pour l'HE sont respectivement de 25mm (*E. coli* ATCC 25922), 40mm (*S. aureus* ATCC 25923), 35mm (*C. albicans* 71453) et 18mm (*A. niger* ATCC 1640). En ce qui concerne le chitosane, les diamètres s'établissent à 12mm (*E. coli* ATCC 25922), 11mm (*S. aureus* ATCC 25923) et 11mm (*C. albicans* 71453). Les CMIs relevées pour l'HE se situent entre 0,74mg/ml et 11,88mg/ml, tandis que pour le chitosane, elles varient entre 0,006mg/ml et 0,013mg/ml. L'HE de *T. algeriensis* présente un caractère bactéricide et fongicide envers les souches bactériennes, *A. niger* et une action fongistatique envers *C. albicans*. En revanche, le chitosane agit de manière bactériostatique et fongistatique. L'application conjointe de l'HE de *T. algeriensis* et d'un film alimentaire sur des cuisses de poulet non contaminées et des cuisses contaminées par la souche *E. coli* ATCC 25922, conservées à 5±1°C pendant 96 heures, démontre l'efficacité de ce traitement. À l'issue de la période de conservation, une analyse microbiologique révèle les charges microbiennes respectives des échantillons contaminés et non contaminés. Les résultats attestent de l'efficacité du traitement à l'HE de *T. algeriensis* pour la conservation.

Mots-clés : *Thymus algeriensis*, Huile essentielle, bioconservateur, chitosane, effet antimicrobien, CMIs, film alimentaire, cuisses de poulet, conservation.

Abstract

Thymus algeriensis EO offers a promising alternative as a bioconservator. Chitosan has a medium inhibitory effect. The evaluation of the antimicrobial effect of *T. algeriensis* EO and chitosan on two bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 23922) and on both fungal strains (*Candida albicans* 71453 and *Aspergillus niger* ATCC 16404), reveals that all strains are sensitive to this pure EO and even to dilution 1/10; on the other hand for chitosan *Aspergillus niger* ATCC 16404 was resistant. The diameters of the *T. algeriensis* EO inhibition zones are 25 mm for strain *E.coli* ATCC 25922, 40 mm for *S. aureus* ATCC 25923, 35 mm for *C.albicans* 71453 and 18 mm for *A.niger* ATCC 1640; for chitosan are 12 mm for strain *E.coli* ATCC 25922, 11 mm for *S. aureus* ATCC 25923, 11 mm for *C.albicans* 71453 and no effect on *A.niger* ATCC 16404. The MICs obtained for EO are 0.74mg/ml to 11.88mg/ml, for chitosan are 0.006mg/ml to 0.013mg/ml. *T. algeriensis* EO has a bactericidal effect on bacterial strains and mold on the other hand it has a fungistatic effect on yeast; chitosan has a bacteriostatic and fungistatic effect. The application of *T. algeriensis* EO and food film on uncontaminated chicken thighs and thighs contaminated with *E.coli* strain ATCC 25922 stored at 5 ±1°C for 4 days, demonstrated the effectiveness of this treatment. Indeed, at the end of the conservation, a microbiological analysis was performed which allowed us to observe the microbial loads of each contaminated and uncontaminated sample. Based on these results, treatment with EO of *T. algeriensis* was effective for conservation.

Keywords: *Thymus algeriensis*, Chitosan, Essential oil, antibacterial activity, MICs, chicken legs, preservation.