

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 en Master académique :

Sciences alimentaires

Spécialité: Agro-alimentaire et Contrôle Qualité

Thème

**Étude de effet antimicrobiens des l'huile essentielles
de thym, de romarin et de menthe verte**

Réalisé par: M.MEGANI Omar

Membres du jury:

Présidente: Mme BENMALLEM
REMANE Yakout

M.C.B à l'UMMTO

Promoteur: M.AMROUCHE Tahar

Professeur à l'UMMTO

Co-Promotrice : Mme KACI AMER
Mounira

Ingénieur de laboratoire
de police scientifique à Alger

Examineur: M.BENGANA

M.C.B à l'UMMTO

Année universitaire:2023-2024.

Remerciements

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

Ma 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 pensée set remerciements au Professeur

Mme KACI AMER Mounira, ma Co-promotrice, dont l'expertise m'a été précieuse.

Je présente mes vifs remerciements aux membres du jury, en l'occurrence Docteur BENMALLEM REMANE Yakout, pour avoir accepté de présider le jury, docteur BENGANA, pour avoir examiné mon mémoire.

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

Mes remerciements vont aussi vers le chef par intérim M.AGMOUM Tahar, officiers et ingénieurs de département de sécurité alimentaire et environnement, laboratoire central de Police scientifique, à savoir M.MEFTALI Djilali, MOUFAK Abderhmane, Bachir, et un grand merci pour madame Mounira.

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 Master2.

Dédicace

Je dédie ce travail à: À ma Maman

Pour tout l'amour, les conseils et la tendresse que tu me donnes chaque jour. Tu es la lumière qui guide mes pas, et je te suis éternellement reconnaissant(e).

À mon Papa

Ta force, ton courage et ta sagesse sont une source d'inspiration. Merci pour tous les sacrifices que tu fais pour nous. Je t'admire profondément.

À mon Oncle

Merci pour ta présence et ton soutien inconditionnel. Ta gentillesse illumine nos moments en famille.

À ma Grand-mère

Ta douceur et ton amour sont inestimables. Je chéris chaque instant passé à tes côtés et je suis tellement chanceux(se) de t'avoir dans ma vie.

À ma Tante

Ta générosité et ton sourire réchauffent nos cœurs. Merci d'être cette personne sur qui on peut toujours compter.

À ma Sœur

Tu es ma confidente, mon amie, mon soutien. Je suis tellement fier(ère) de toi et de la personne que tu deviens chaque jour.

À mon Frère

Merci pour ta complicité, pour ces moments où nous partageons des rires et des souvenirs inoubliables. Tu es irremplaçable.

A une âme qui résonne près de mon cœur.

A toute ma famille,

A tous mes amis (es) BOUKHALFA, BOUSSAD, YOUVA HAMRAOUI, YANI,

YAZID, YACINE, JUGURTHA, YOUVA ZAID, MOUNIR, LAZIZ, IDIR, LOUNES, NADIR.

OMAR

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie 1: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Altération microbienne des aliments

1. Concept.....	6
2. Évolution de la flore microbienne dans l'aliment.....	6
3. Les facteurs d'altération des aliments	7
3.1. Facteurs intrinsèques.....	8
3.1.1. pH	8
3.1.2. Activité de l'eau	9
3.1.3. Potentiel d'oxydoréduction	10
3.1.4. Structure physique de l'aliment.....	11
3.1.5. Présence d'agents antimicrobiens naturels.....	11
3.2. Facteurs extrinsèques.....	11
3.2.1. Température	11
3.2.2. Humidité relative (HR)	12
3.2.3. Présence et concentration de gaz.....	12
4. Conséquence de l'altération microbienne	13
4.1. Les conséquences pour la santé liées à la présence de microorganismes.....	13
4.2. Maladies alimentaires	13

Chapitre II: Agents antimicrobiens: Huile essentielle de romarin, Huile essentielle de menthe verte, et Huile essentielle de thym

I. Agents antimicrobiens..... 16

1. Concept des agents antimicrobiens.....	16
2. Types d'agents antimicrobiens.....	16
2.1. Agents naturels	16
2.2. Agents chimiques.....	16
2.3. Agents biologiques	17
2.4. Agents physique	17

3. Spectre d'action des agents antimicrobiens.....	17
4. Combinaison de différents agents antimicrobiens.....	18
5. Détermination des différents paramètres	18
5.1. Sensibilité et résistance des souches microbiennes	18
5.2. Détermination de la CMI des agents antimicrobiens	19
5.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB) et la concentration minimale fongicide (CMF) des agents antimicrobiens.....	19

II. Huiles essentielles.....20

1. Notion de l'huile essentielle	20
2. Province.....	21
3. Agencement chimique des huiles essentiels (Thym, romarin, et menthe verte)	22
4. Processus d'extraction	23
5. Attributs	23
5.1. Caractéristiques	23
5.2. Propriétés	24
6. Domaine d'application.....	25

Chapitre III: Concept d'emballages alimentaires

I. Concept de l'emballage alimentaire.....28

1. Évolution de l'emballage	28
2. Caractérisation des métaux utilisés pour l'emballage	29
3. Différentes variétés et niveaux de l'emballage alimentaire.....	30
3.1. Variétés de l'emballage alimentaire	30
3.2. Niveaux d'emballage alimentaires.....	30
4. Facteurs influençant le choix de l'emballage alimentaire.....	31
5. Interaction aliment emballage.....	32

II. Emballage actif33

1. Concept et spécificités de l'emballage actif	33
1.1. Concept de l'emballage actif.....	33
1.2. Spécificités de l'emballage actif	33
2. Différentes catégories	34
3. Emballage actif antimicrobien.....	35
3.1. Concept des emballages actifs antimicrobiens	35
3.2. Système d'emballage antimicrobien.....	36

Partie2: Partie pratique

Matériels et méthodes

I. Matériels	39
1. Matériels non biologiques	39
1.1. Dimethylsulfoxyde	39
2. Matériels biologiques.....	39
2.1. Micro-organismes testés.....	39
2.2. Extraits biologiques étudiés	40
2.3. Disques témoins positifs	41
2.4. Cuisses de poulet	41
II. Méthodes	42
1. Vérification des souches de référence.....	42
1.1. Etude macroscopique.....	42
1.2. Examen microscopique	42
1.3. Repiquage	45
2. Préparation dessus pensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens.....	45
2.1. Préparation des suspensions microbiennes.....	45
2.2. Préparation des solutions des agents antimicrobiens	46
2.2.1. Préparation des solutions des HE de thym, Menthe verte, et romarin	46
3. Evolution de l'effet antimicrobien des huiles essentielles (thym, Menthe verte, et romarin)	48
4. Etude statistique	50
5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.....	50
5.1. Détermination des CMI.....	51
5.2. Détermination des CMBs	53
6. Composition chimique des huiles essentielles.....	54
5.1. principe de GC/MS	54
5.2. Conditions opératoires pour GC/MS.....	54
7. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile Essentielle de thym sur les cuisses de poulets: Tests in-situ.....	55
7.1. Application de l'HE de thym sur les cuisses de poulets	55
7.2. Tests microbiologiques pour évaluer l'HE de thym.....	57

Résultat et discussions

I. Vérification des souches de références	60
--	----

1. Observations macroscopiques	60
2. Observations microscopiques.....	61
II. Suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens ...	63
1. Standardisation des suspensions microbiennes.....	63
2. Sélection des solutions d'agents antimicrobiens	63
III. Présentation des résultats (antibiogrammes / antifongigrammes)	63
1. Évaluation de l'activité antimicrobienne des 3 HES.....	64
1.1. antibiogramme.....	65
1.2. antifongigramme.....	69
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la combinaison des 3 HES.....	70
IV. Présentation des ZIs des agents antimicrobiens	70
V. Détermination des CMI/CMBs	75
1. Détermination des CMI	75
2. Détermination des CMBs et CMFs	79
2.1. CMBs.....	79
2.2. CMFs.....	80
VI. Résultat de la GC	81
VII. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de thym Sur les cuisses de poulet	86
1. Résultat des effets de l'HE de thym sur les propriétés sensorielles... 86	
2. Résultat des tests microbiologiques des effets de l'HE de thym sur les cuisses de poulet.....	89
2.1. Échantillon témoin non emballé.....	92
2.2. Méthode d'emballage (barquette + film plastique).....	93
2.3. Emballage complet de l'échantillon avec un film plastique	93
Conclusion.....	98
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

GLOSSAIRE

1,8-Cinéole (Eucalyptol) : Composé majeur de l'HE de romarin, doté de propriétés antimicrobiennes, expectorantes, et anti-inflammatoires. Il est aussi utilisé dans les formulations cosmétiques et thérapeutiques.

α -Pinène : Terpène majeur dans l'HE de romarin, aux propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires, particulièrement efficace contre les bactéries Gram+ et certaines souches fongiques.

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.

GLOSSAIRE

Bioconservateur : Une substance naturelle ou synthétique utilisée pour prolonger la durée de conservation des aliments en inhibant la croissance microbienne.

Candida albicans ATCC 10231 : 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.

Camphre : Composé aromatique qui confère à l'HE de romarin des propriétés antimicrobiennes, mais également antifongiques et antivirales.

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.

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

GLOSSAIRE

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.

Menthol : Composé principal de l'HE de menthe verte, connu pour ses propriétés rafraîchissantes et ses effets antimicrobiens et antiviraux. Il peut aussi apaiser les irritations cutanées.

Limonène : Terpène aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, fréquemment utilisé pour ses effets dégraissants et désinfectants.

PC : Protocole conventionnel

P-cymène : Précurseur biologique du carvacrol et thymol. C'est un hydrocarbure aromatique naturel à substitution alkyle.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 : 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.

γ -terpinene : Hydrocarbures isomères qui présentent des différences dans la localisation de leurs doubles liaisons carbone-carbone dans leurs squelettes chimiques.

Liste des abréviations

ATCC: American type culture collection.

aw : Activité de l'eau.

BM : Bleu de méthylène.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMF : Concentration minimale fongicide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

H₂O₂ : Peroxyde d'oxygène.

HE : Huile essentielle.

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

HR : Humidité relative.

KMnOH : Permanganate de potassium.

MM : Masse Moléculaire.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

pH : Potentiel hydrogène.

PPM : Partie par million.

TIA : Toxi-infection alimentaire.

UFC : Unité formant colonie.

UV : Ultra-violet. **ZI** : Zone d'Inhibition.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des facteurs d'altération des aliments	8
Figure 2 : Développement des microorganismes en fonction du pH	9
Figure 3 : Développement des microorganismes en fonction de l'aw	10
Figure 4 : Constante de vitesse dénaturante des protéines en fonction de la température	12
Figure 5 : Les principales interactions aliment / microorganisme / consommateur	14
Figure 6 : <i>Thymus vulgaris</i> (Le Jardin du Pic-Vert, 2023).	21
Figure 7 : <i>Rosmarinus officinalis</i> (Le Jardin du Pic-Vert, 2023)	21
Figure 8 : <i>Mentha spicata</i> (Le Jardin du Pic-Vert, 2023).....	22
Figure 9 : Niveaux d'emballages alimentaires (Scetar Mario et all.,2021).....	3
Figure 10 : Courbe de contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible (Briston, J.H., 1980).....	32
Figure 11 : Principales caractéristiques d'un emballage actif.....	34
Figure 12 : Les trois grandes catégories d'emballages actifs.....	35
Figure 13 : Systèmes d'emballages alimentaires et comportement des substances actives.....	46
Figure 14 : HE de thym.....	40
Figure 15 : HE de HE de menthe verte....	40
Figure 16 : HE de romarin.....	41
Figure 17 : Représentation schématique de la méthode de l'antibiogramme.....	49
Figure 18 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de thym effectuées pour la détermination des CMI's	51
Figure 19 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de menthe verte effectuées pour la détermination des CMI's	52
Figure 20 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de romarin effectuées pour la détermination des CMI's	52
Figure 21 : Représentations des 9 échantillons de cuisses de poulet	57
Figure 22 : Résultats des tests antibiogrammes des l'HEs de thym, de romarin et de menthe verte pour les deux souches microbiennes (<i>E. coli</i>).....	65
Figure 23 : Résultats des tests antibiogrammes des l'HEs de thym, de romarin et de menthe verte pour les deux souches microbiennes (<i>S.aureus</i>).....	65

LISTE DES FIGURES

- Figure 24** : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de menthe verte et de romarin sur E. coli..... 67
- Figure 25** : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym pure sur E. coli..... 67
- Figure 26** : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym 1/10 (solution 1) sur E. coli 68
- Figure 27** : Résultats des tests antifongigrammes des HEs de menthe verte, romarin et thym sur une moisissure (A.niger)..... 69
- Figure 28** : Résultats des tests antifongigrammes des HEs de menthe verte, romarin et thym sur une levure(C.albicans)..... 69
- Figure 29** : Tests antibiogrammes et antifongiframmes de la combinaison des 3 HEs..... 70
- Figure 30** : Représentation graphique des ZIs des 2 souches bactériennes en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens..... 72
- Figure 31** : Représentation graphique des ZIs des 2 souches fongiques en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens..... 74
- Figure 32** : Résultats des différentes dilutions des 3 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur E-coli..... 75
- Figure 33** : Résultats des différentes dilutions des 3 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur S. aureus..... 76
- Figure 34** : Résultats des différentes dilutions de HE de thym afin de fixer leurs CMI sur C.albicans..... 76
- Figure 35** : Résultats des différentes dilutions de HE de thym et HE de menthe verte afin de fixer leurs CMI sur A.niger..... 76
- Figure 36** : Détermination de la CMB des 3 HEs sur E.colie80
- Figure 37** : Détermination de la CMB des 3 HEs antimicrobiens sur S.aureus..... 80
- Figure 38** : Détermination de la CMF de HE de thym sur C.albicans..... 81
- Figure 39** : Détermination de la CMF de HE de menthe verte et de thym sur A.niger..... 81
- Figure 40** : Cuisse de poulet témoin non emballée (groupe 1) 87
- Figure 41** : Analyse comparative entre cuisse emballée avec film plastique seul (a) et cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym (b) 87

LISTE DES FIGURES

- Figure 42** : 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 88
- Figure 43**: Étude comparative entre (a) cuisse emballée avec film plastique seul et (b) cuisse emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym 88
- Figure 44** : 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 89
- Figure 45** : Profil microbiologique de cuisse de poulet témoin : (a) milieu PCA ; (b) milieu Hektoen 90
- Figure 46** : 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) 91
- Figure 47** : 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) 91
- Figure 48** : 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) 92
- Figure 49** : 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) 92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques développements dans le domaine de l'emballage	29
Tableau II : Propriétés macroscopiques des différentes souches microbiennes	60
Tableau III : Propriétés microscopiques des différentes souches microbiennes	61
Tableau IV : Résultats de repiquage des différentes souches microbiennes	62
Tableau V : Récapitulatif des différentes ZIs sur les 4 souches microbiennes	71
Tableau VI : Diamètres des ZIs des différentes dilutions des agents antimicrobiens sur les 4 souches microbiennes	77
Tableau VII : Sélection des dilutions où les CMI sont observées	78
Tableau VIII : Les composés majoritaires de l'HE de menthe verte.....	82
Tableau IX : Les composés majoritaires de l'HE de romarin.....	84
Tableau X : Les composés chimique de l'HE de Thym.....	85



Introduction

INTRODUCTION

Les préoccupations croissantes 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.

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.

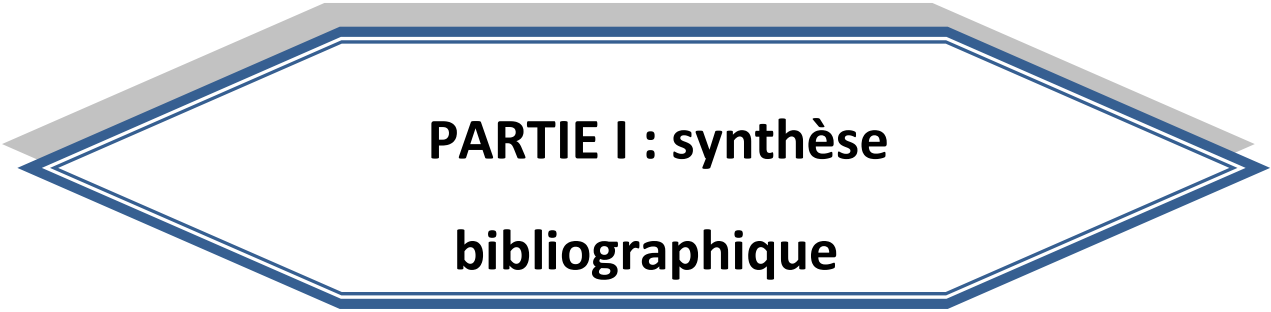
Le domaine de l'agroalimentaire représente un secteur clé de l'économie, liant la production, la distribution et la consommation des denrées alimentaires.

La présente étude est focalisée sur l'évaluation des potentialités antimicrobiennes de trois huiles essentielles naturelles : *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, et *Mentha spicata*. Ces trois substances bioactives ont déjà fait l'objet d'études in vitro, mais peu ou pas d'essais ont été 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 des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, et *Mentha spicata*, et de déterminer l'impact de leur incorporation dans les matériaux d'emballage sur la qualité

INTRODUCTION

microbiologique des produits alimentaires en vue d'explorer leur potentiel en tant qu'alternatives aux agents conservateurs conventionnels. Cette étude consiste à effectuer des essais in vitro et in situ sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que sur des champignons filamenteux (moisissures) et non filamenteux (levures).



**PARTIE I : synthèse
bibliographique**



Chapitre I :

Altération microbienne des aliments

Chapitre I : Altération microbienne des aliments

1. Concept

Une altération microbiologique résulte d'une contamination "innée" à laquelle succède soit l'anéantissement, la persistance ou la propagation des micro-organismes. Les microorganismes sont omniprésents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau, ainsi que sur les êtres vivants, qu'ils soient animaux ou végétaux, y compris les humains (Guiraud et al., 1998). Tous les produits alimentaires, qu'ils soient transformés ou non, sont susceptibles de contamination microbienne. Cette contamination peut engendrer divers degrés de gravité, impactant la qualité du produit et la santé du consommateur. En effet, elle peut altérer le produit, affectant ainsi ses caractéristiques organoleptiques et/ou commerciales, et dans certains cas, provoquer des troubles graves tels que des intoxications ou des toxi-infections alimentaires (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 peuvent les altérer, un exemple classique étant la détérioration du pain par des champignons.

2. Évolution 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. Cependant, leur capacité à exploiter une grande variété de niches écologiques, à utiliser divers substrats et à tolérer des conditions plus extrêmes que les bactéries végétatives en fait des agents d'altération puissants (Blackburn, 2006).

La flore d'altération est constituée de la flore naturelle du produit, influencée par ses conditions environnementales, ainsi que d'une flore issue d'une contamination croisée pendant ou après le traitement, provenant de surfaces, de machines, d'humains ou de l'atmosphère environnante. La flore microbienne n'est pas statique; la flore initiale diffère de celle présente en fin de vie du produit. De plus, seul un petit nombre de microorganismes

PARTIE 1/CHAPITRE 1 : Altération microbienne des aliments

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 par les microorganismes génère une large gamme de produits finaux qui affectent les propriétés sensorielles, chimiques et physiques des aliments. Cela se traduit par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (Howell, 2016).

L'éventail des composés produits par les microorganismes dépend non seulement de leur capacité génétique, mais aussi des caractéristiques intrinsèques du produit et des caractéristiques extrinsèques de manipulation et de l'environnement de stockage. Ces facteurs peuvent modifier considérablement les voies biochimiques empruntées par les microorganismes (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:

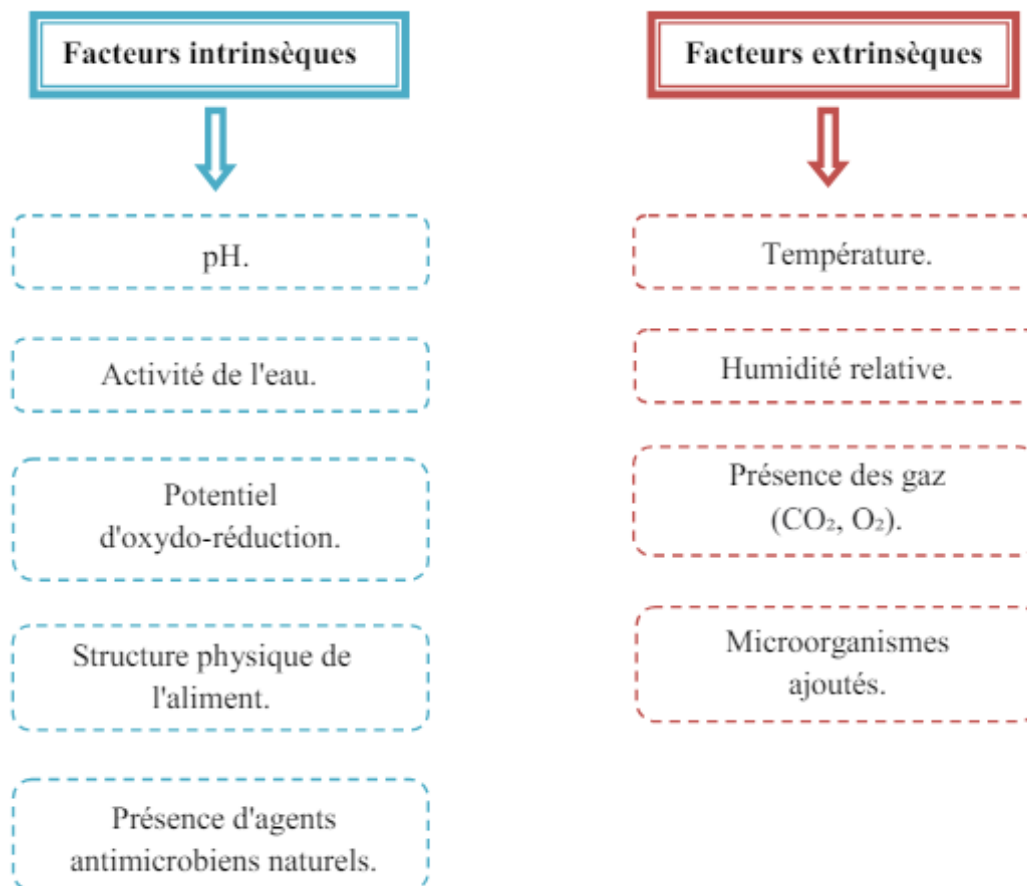


Figure 1 : Classification des facteurs d'altération des aliments.

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).

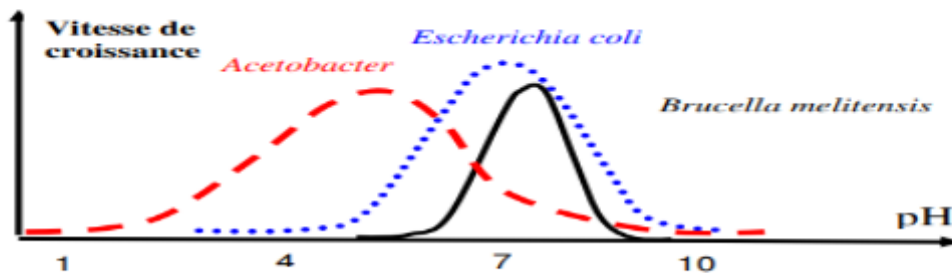


Figure 2 : La vitesse de croissance de quelques microorganismes en fonction du pH (Jean-Louis, 2007).

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

Une altération de la conformation des protéines à un pH spécifique peut entraîner une perte d'activité enzymatique, stoppant ainsi la croissance des microorganismes si cette activité est essentielle à leur survie. Les aliments sont classés en deux groupes selon leur pH (inférieur ou supérieur à 4,5). Les altérations et la prolifération des bactéries pathogènes se produisent principalement dans les aliments dont le pH est 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.

3.1.2. Activité de l'eau (a_w)

La multiplication des microorganismes nécessite la présence d'eau disponible, mesurée par l'activité de l'eau (a_w), définie comme le rapport entre la pression partielle de l'eau dans l'aliment et celle de l'eau pure. L' a_w varie entre 0 et 1.

Divers procédés peuvent réduire l' a_w dans les aliments, notamment la congélation, la déshydratation, le salage et l'ajout de sucre. Une a_w inférieure à 0,65 empêche la multiplication des microorganismes, bien que certains puissent survivre. Une a_w inférieure à

PARTIE 1/CHAPITRE 1 : Altération microbienne des aliments

0,85 empêche la croissance des microorganismes pathogènes, sauf pour certaines moisissures capables de produire des mycotoxines, comme illustré dans la figure 3 (Jean-Louis, 2007).

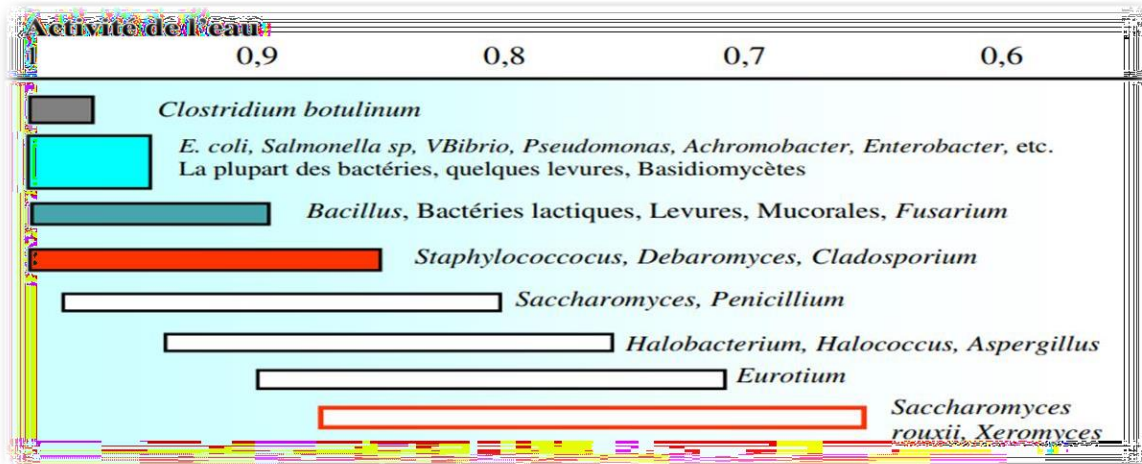


Figure3: Développement des microorganismes en fonction de l'a_w (Jean-Louis, 2007).

3.1.3. Potentiel d'oxydo-réduction

Un faible potentiel d'oxydo-réduction favorise le développement des microorganismes. Par exemple, les produits carnés, tels que les bouillons, contiennent de nombreuses molécules directement accessibles aux microorganismes en raison de leur faible potentiel d'oxydo-réduction (Jean-Louis, 2007). Autrement dit, la présence de substrats réducteurs facilite la croissance microbienne dans ces produits alimentaires.

- Les moisissures et les levures strictement aérobies se développent en surface, formant des voiles plus ou moins épais.
- Les levures fermentantes se multiplient en profondeur, produisant du gaz.
- Les *Clostridium* ne se développent qu'en l'absence d'oxygène (dans la masse, conserves, etc.).
- Les *Pseudomonas* ne se développent qu'en présence d'oxygène (en surface).
- Les *Lactobacillus* microaérophiles ne se développent qu'à faible teneur en oxygène.

3.1.4. Structure physique de l'aliment

La structure physique de l'aliment joue un rôle important dans la prolifération des microorganismes. Le broyage ou le hachage de la nourriture augmente la surface de contact, créant ainsi des points d'entrée pour les germes contaminants, ce qui favorise leur propagation à travers l'aliment. Par exemple, la viande hachée, comme les boulettes de bœuf, est plus susceptible de subir une contamination rapide par rapport à des morceaux entiers, comme un steak. En revanche, la peau des fruits et légumes sert de barrière protectrice, limitant l'accès des microorganismes à la chair de l'aliment.

3.1.5. Présence d'agents antimicrobiens naturels

Certains composés naturels possèdent des propriétés bactériostatiques ou bactéricides. Parmi ceux-ci figurent l'éthanol et plusieurs acides organiques tels que l'acide lactique, acétique, citrique, tartrique et malique. De nombreux aliments contiennent des agents antimicrobiens naturels qui inhibent la croissance des microorganismes. Les épices, en particulier, sont riches en ces substances. La sauge et le romarin sont considérés comme les plus puissants antimicrobiens parmi les épices, tandis que la cannelle, la moutarde et l'origan contiennent également des inhibiteurs chimiques. De plus, l'ail (riche en allicine) et le clou de girofle (contenant de l'eugénol) font partie de ces agents antimicrobiens naturels. La coumarine, une enzyme présente dans certains fruits et légumes, agit également comme un agent antimicrobien (Dion, 2000).

3.2. Facteurs extrinsèques

3.2.1. Température

La température est un facteur clé dans la croissance des microorganismes. L'augmentation de la température accélère les réactions métaboliques, mais une température trop élevée peut provoquer la dénaturation des protéines bactériennes,

réduisant ainsi la croissance (figure 4). Les microorganismes se classent en trois catégories en fonction de leur préférence de température :

- Les thermophiles se multiplient à des températures élevées (45 à 80°C).
- Les mésophiles se développent dans une plage de température allant de 15 à 45°C.
- Les cryophiles, ou psychrophiles, ont une température optimale de croissance proche de 15°C.

Il est essentiel de différencier la thermophilie de la thermorésistance. La thermophilie se réfère à la capacité d'un microorganisme à se développer à haute température, tandis que la thermorésistance désigne sa capacité à survivre à un traitement thermique spécifique (Jean-Louis, 2007).

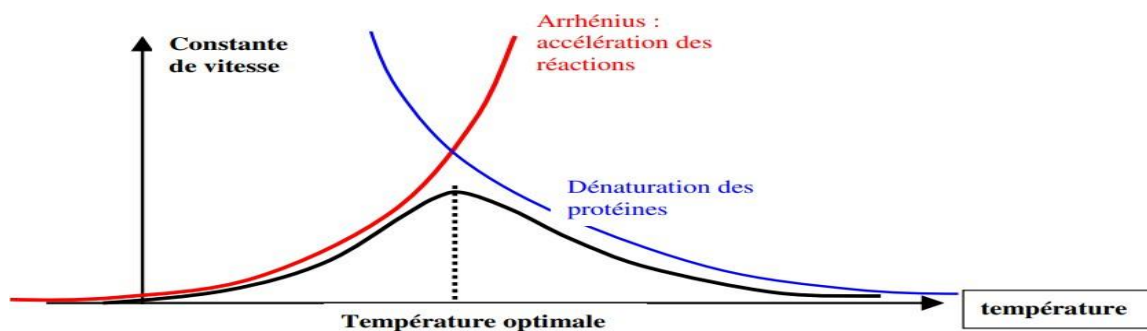


Figure 4 : Constante de vitesse dénaturante des protéines en fonction de la température (Jean-Louis, 2007).

3.2.2. Humidité relative (HR)

L'humidité relative dans l'environnement de stockage influence l'activité de l'eau (a_w) dans les aliments et la croissance des microorganismes en surface. Il est crucial de contrôler cette humidité pour éviter une augmentation de l'activité de l'eau, ce qui favoriserait la prolifération microbienne. Par exemple, si l'activité de l'eau d'un aliment est de 0,6, il est nécessaire de maintenir cette valeur pour éviter que l'humidité de la surface ne favorise la croissance des microorganismes.

3.2.3. Présence et concentration de gaz

PARTIE 1/CHAPITRE 1 : Altération microbienne des aliments

L'utilisation d'une atmosphère contrôlée est une méthode ancienne de conservation. En augmentant la concentration de dioxyde de carbone (jusqu'à 10%) et en réduisant la quantité d'oxygène, on peut prolonger la conservation des fruits et légumes (4ème gamme) en retardant la croissance de certains microorganismes, notamment les moisissures. L'utilisation d'une atmosphère d'azote ou l'emballage sous vide permet également de prévenir la contamination par des microorganismes aérobies.

4. Conséquences de l'altération microbienne

4.1. Les conséquences pour la santé liées à la présence de microorganismes

Une prolifération non contrôlée de microorganismes dans un aliment peut entraîner des problèmes, tant au niveau industriel que sanitaire. Les risques associés varient selon plusieurs facteurs (Roussary, 2010) :

- La nature du microorganisme.
- Le niveau de contamination (dose infectante).
- La nature de l'aliment.
- L'état physiologique du consommateur.

4.2. Maladies alimentaires

Les maladies d'origine alimentaire sont causées par la consommation d'aliments ou de boissons contaminés par des agents pathogènes tels que des bactéries, des virus, des parasites ou des toxines. Les symptômes de ces maladies varient selon l'agent pathogène responsable, mais incluent généralement des nausées, des vomissements, des diarrhées, de la fièvre, des crampes abdominales et des maux de tête.

Les bactéries sont la principale cause de ces infections, avec des agents pathogènes comme *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E. coli*), et *Listeria monocytogenes*. Ces bactéries sont souvent présentes dans des aliments comme la viande crue ou mal cuite, les œufs, les produits laitiers, les fruits de mer, ainsi que les fruits et légumes crus (figure 5).

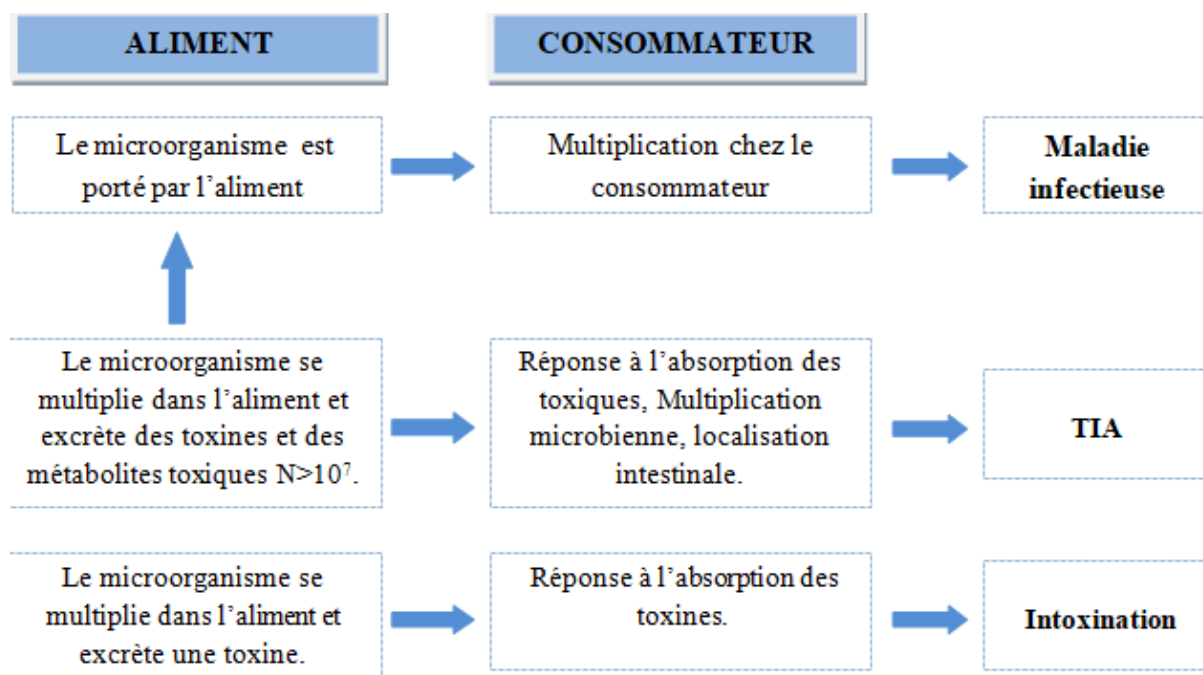


Figure5: Les principales interactions aliment /microorganisme /consommateur (Lesage, 2013).



Chapitre II: Agents antimicrobiens

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

I Agents antimicrobiens

1. Concept des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont des substances capables d'inhiber ou de détruire les micro-organismes tels que les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ils sont utilisés pour traiter les infections chez les humains, les animaux et les plantes. Ces agents peuvent être synthétisés chimiquement ou dérivés de sources naturelles telles que les plantes, les bactéries et les champignons (Russell, 2007). Autrement dit, un agent antimicrobien est une substance qui détruit ou empêche la croissance des micro-organismes, y compris les antibiotiques, les antiviraux, les antifongiques et les antiparasitaires (CE, 2001). Ces substances, en raison de leur affinité pour les cellules des parasites, sont capables de les détruire avec moins de dommages pour l'hôte, permettant ainsi une destruction efficace sans perturber sérieusement l'organisme (Perry et al., 2002).

2. Types d'agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont classés en trois catégories principales en fonction de leur nature : les agents naturels, les agents synthétiques (chimiques) et les agents biologiques (Guiraud, 2003).

2.1. Agents naturels

Les consommateurs des pays industrialisés préfèrent aujourd'hui des produits contenant peu de conservateurs synthétiques tout en conservant une qualité sanitaire irréprochable. Pour répondre à cette demande, les industriels se tournent vers des antimicrobiens dérivés de plantes, d'animaux ou de micro-organismes. Ces agents naturels peuvent également remplacer les désinfectants chimiques pour les traitements de surface. Parmi ces antimicrobiens naturels se trouvent des composés aromatiques d'huiles essentielles, des acides et certains sels.

2.2. Agents chimiques (synthétiques)

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

Les procédures de nettoyage seules ne permettent souvent qu'une élimination partielle des biofilms, nécessitant l'utilisation d'agents chimiques pour désinfecter les surfaces. Bien que des procédés physiques comme les UV et les traitements thermiques soient également utilisés, les agents chimiques demeurent essentiels pour la désinfection des surfaces inertes. Cependant, leur efficacité peut varier selon les applications. Il a été observé que les bactéries organisées en biofilms sont plus résistantes aux agents de désinfection que leurs homologues planctoniques (Leche-Vallier et al., 1988 ; Franck et Koffi, 1990 ; Surdeau et al., 2006).

Les agents antimicrobiens synthétiques sont développés à partir de produits chimiques qui ne se trouvent pas dans la nature. Parmi ces agents, on trouve des substances telles que les alcools, les phénols et les aldéhydes...etc.

2.3. Agents biologiques

Les actions spontanées ou provoquées de certains micro-organismes peuvent stabiliser leur environnement et prévenir des risques pour la santé. Ces propriétés proviennent de la synthèse de métabolites comme des acides ou des composés antimicrobiens, tels que le nitrate, le nitrite, ou encore certains antibiotiques. Ces micro-organismes peuvent également dégrader des substrats exploités par des bactéries pathogènes, réduisant ainsi leur prolifération. Par ailleurs, certains micro-organismes agissent comme prédateurs d'autres micro-organismes, tels que les protozoaires ou les bactériophages (Guiraud, 2003).

2.4. Agents physiques

Les méthodes physiques utilisées contre les micro-organismes sont diverses et souvent efficaces contre une large gamme d'entre eux. Ces méthodes altèrent les acides nucléiques ou les protéines fonctionnelles et structurales, entraînant des effets microbicides (destruction) ou microbiostatiques (inhibition de la croissance). Parmi les agents physiques les plus couramment utilisés, on retrouve la chaleur, le froid et les radiations, qui sont efficaces contre la majorité des micro-organismes (Guiraud, 2003).

3. Spectre d'action des agents antimicrobiens

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

Le spectre d'action d'un agent antimicrobien fait référence à l'étendue des micro-organismes qu'il est capable de tuer ou d'inhiber. Certains agents ont un spectre d'action étroit et ne sont efficaces que contre un nombre limité de micro-organismes, tandis que d'autres, à spectre large, peuvent cibler un grand nombre d'entre eux. Par exemple, les antibiotiques à spectre étroit ne sont efficaces que contre certaines bactéries spécifiques, tandis que ceux à spectre large peuvent agir contre une grande variété de bactéries (Alekhshun et Levy, 2007).

4. Combinaison de différents agents antimicrobiens

Il est fréquent d'associer plusieurs agents antimicrobiens pour traiter des infections causées par des souches résistantes à un seul agent. Selon Pibiri (2005), les combinaisons d'agents antimicrobiens peuvent générer quatre types d'interactions :

- **Indifférence** : l'activité d'un agent antimicrobien reste inchangée en présence d'autres agents.
- **Addition** : l'effet de la combinaison est équivalent à la somme des effets individuels de chaque agent, pris à la même concentration.
- **Synergie** : l'effet combiné est nettement supérieur à la somme des effets de chaque agent utilisé séparément.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'efficacité de l'un ou des deux agents, l'effet étant inférieur à la somme des effets des agents pris séparément.

5. Détermination des différents paramètres

5.1. Sensibilité et résistance des souches microbiennes

Il existe plusieurs méthodes spécifiques pour déterminer la sensibilité (absence de croissance) ou la résistance (croissance) d'une souche microbienne à un agent antimicrobien, telles que :

- **Méthode des disques** (milieu solide)

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

- **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 généralement évaluée à l'aide de tests *in vitro*, comme la diffusion en milieu gélosé ou la dilution en milieu liquide. Ces tests permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration minimale bactéricide (CMB) pour une souche donnée. La résistance, quant à elle, se définit par l'incapacité d'un agent antimicrobien à inhiber ou tuer une souche microbienne à des concentrations habituellement utilisées pour traiter les infections (Goff, 2010).

5.2. Détermination de la CMI des agents antimicrobiens

La CMI correspond à la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'empêcher la croissance visible d'une souche bactérienne dans un milieu de culture, qu'il soit liquide ou solide. Cette méthode est fréquemment utilisée pour évaluer la sensibilité ou la résistance d'une souche à un agent antimicrobien donné. Les méthodes couramment employées pour déterminer la CMI incluent la diffusion en milieu gélosé, la microdilution en bouillon, et la dilution en milieu gélosé (Andrews, 2001).

Les résultats obtenus sont interprétés en fonction des seuils de sensibilité établis pour chaque agent antimicrobien et pour chaque espèce de micro-organisme, conformément aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (2018).

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

La CMB représente la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable de provoquer la destruction significative de l'inoculum bactérien, soit un taux de survie d'environ 0,01% (Meyer et al., 2008).

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

La CMF, quant à elle, est définie comme la concentration minimale d'un agent antifongique nécessaire pour éliminer totalement une souche fongique spécifique. Cette méthode est largement utilisée pour évaluer la sensibilité ou la résistance d'une souche fongique à un antifongique particulier. Parmi les méthodes couramment employées pour déterminer la CMF figurent la micro-dilution en bouillon et la dilution en milieu gélosé (Espinel-Ingroff, 1998).

Les résultats de la CMB et de la CMF sont ensuite interprétés en fonction des seuils de sensibilité établis pour chaque agent antimicrobien et chaque espèce de micro-organisme, conformément aux normes du Clinical and Laboratory Standards Institute (2018).

II. Huile essentielle

Le terme "huile essentielle" tire son origine du nom inventé au 16ème siècle par le réformateur médical suisse Paracelsus von Hohenheim, qui désignait ainsi l'ingrédient actif d'un médicament sous l'appellation **Quinta essentia**.

Les huiles essentielles (HEs) sont connues depuis l'Antiquité pour leurs puissantes propriétés antiseptiques. Elles sont largement utilisées dans divers secteurs tels que les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

1. Notion d'huile essentielle

Une huile essentielle (HE), également connue sous le nom « d'essence végétale » ou « d'huile volatile », représente la composante odorante d'une plante aromatique. Il s'agit d'un mélange naturel relativement complexe, composé de molécules aromatiques volatiles (Ben Abdelkader, 2012).

Les huiles essentielles se définissent comme des substances obtenues à partir de matières premières végétales, séparées de la phase aqueuse par des méthodes physiques. Ces procédés incluent l'entraînement à la vapeur d'eau, les méthodes mécaniques appliquées à l'épicarpe des plantes contenant des citrals, ou encore la distillation sèche (AFNOR, 2010).

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

En règle générale, la teneur en huiles essentielles des plantes est faible, variant entre 0,1% et 3 % du poids sec du matériel végétal (Hassiotis, 2010).

2. Provenance de l'huile essentiel de thym, romarin et de menthe verte

Thymus vulgaris, Lieux rocaillieux calcaires. Sous-arbrisseau vert girsâtre, 10-30 cm, très ramifié, dressé ou semi étalé. Feuilles petites, lancéolées linéaires, à limbe enroulé sur les bords. Fleurs roses, juin-juillet.



Figure6: *Thymus vulgaris* (Le Jardin du Pic-Vert, 2023).

Rosmarinus officinalis, Arbuste de 0,80-1,50 m, dense, aromatique, très feuillé. Feuilles persistantes, 2,5-5 cm de long, effilées, entières, roulées sur les bords, sessiles, vert foncé dessus, blanc feutré dessous. Inflorescence en grappes courtes, axillaires. Fleurs de 1 cm, à calice purpurin, campanulé, duveteux. Corolle bilabée, bleu violacé, 4 étamines, 2 dépassant la lèvre supérieure de la corolle. Floraison en mars-juin, mais souvent en septembre-mars en région méditerranéenne. Fruit globuleux.



Figure7: *Rosmarinus officinalis* (Le Jardin du Pic-Vert, 2023)

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

Mentha spicata, Vivace s'étalant, presque glabre. Feuilles sessiles, ovales-lancéolées, dentées, vert vif sur les 2 faces, 5-9 cm. Fleurs purpurines, tubulaires ou en clochette, 3 mm, en épis cylindriques, lâches, terminaux.



Figure8: *Mentha spicata* (Le Jardin du Pic-Vert, 2023)

3. Agencement chimique des huiles essentielles (thym, de romarin et de menthe verte)

L'étude de l'activité biologique des huiles essentielles (HE) de thym, de romarin, et de menthe verte est intrinsèquement liée à leur composition chimique complexe et à la présence de différents groupes fonctionnels, tels que les alcools, les phénols, les composés terpéniques, et les cétones. Chacun de ces groupes fonctionnels joue un rôle significatif dans les propriétés et les interactions biologiques des huiles essentielles.

L'huile essentielle de thym est notamment riche en thymol et en carvacrol, deux phénols connus pour leurs puissantes propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Dorman et Deans, 2000). Ces composés, en synergie avec d'autres composants terpéniques, renforcent l'efficacité de l'HE dans la lutte contre de nombreux micro-organismes pathogènes.

Quant à l'huile essentielle de romarin, elle contient principalement des monoterpènes, dont le 1,8-cinéole et le camphre, des composés connus pour leurs propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires (Bakkali et al., 2008). Ces molécules sont également responsables de

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

l'action antioxydante et de la préservation des aliments grâce à leurs capacités à inhiber l'oxydation des lipides (European Medicines Agency, 2010).

L'huile essentielle de menthe verte, quant à elle, se distingue par sa forte teneur en carvone, un composé cétonique qui contribue à ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Edris, 2007). Ce composant, associé à d'autres terpènes présents dans l'huile de menthe verte, participe également à ses effets relaxants et digestifs (Maffei, 2002).

4. Processus d'extraction

L'extraction des huiles essentielles (HEs) est réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Trois distillations sont effectuées en faisant bouillir 200 g de matériel végétal frais dans 1 litre d'eau pendant 1h30, dans un ballon de 2 litres équipé d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Le rendement en HE est déterminé par rapport à la matière sèche, évaluée à partir de trois échantillons de 30 g séchés durant 48 heures dans une étuve à 60 °C.

Les huiles essentielles obtenues sont ensuite stockées à 4 °C, dans l'obscurité et en présence de sulfate de sodium anhydre pour assurer leur conservation. Avant les analyses, les HEs sont diluées dans du méthanol (1 %, v/v) et analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

5. Attributs

5.1. Caractéristiques

Les huiles essentielles (HEs) ne doivent pas être considérées comme des produits exempts de risques potentiels lors de leur utilisation. Bien qu'elles fassent partie des produits naturels, leur caractère naturel ne garantit pas automatiquement leur innocuité pour l'organisme humain. Il est donc 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

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

substance ne permet pas nécessairement de conclure à son absence de danger pour le corps humain.

L'extraction des huiles essentielles des feuilles et parties aériennes de **Thymus vulgaris**, **Rosmarinus officinalis**, et **Mentha spicata** a été réalisée par hydrodistillation, une méthode couramment utilisée pour obtenir des huiles volatiles. Pour **Thymus vulgaris**, le rendement en huile essentielle a été estimé entre 1.0 et 2.8% en poids sec, selon des études menées par Lawrence (1993). Concernant **Rosmarinus officinalis**, le rendement est légèrement supérieur, variant de 1.5 à 3.0%, selon El Omari et al. (2019). Pour **Mentha spicata**, les rendements observés lors d'hydrodistillations varient entre 0.5 et 1.8%, comme rapporté par Telci et al. (2006). Les huiles essentielles obtenues ont ensuite été stockées à 4 °C dans l'obscurité avant analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les huiles essentielles (HEs) peuvent présenter des dangers lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant, allergène ou neurotoxique, selon leur composition. Par exemple, les HEs riches en thymol ou en carvacrol, comme l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, sont particulièrement irritantes. De même, les HEs contenant du cinnamaldéhyde, telles que l'huile essentielle de *Mentha spicata*, peuvent être allergènes. Certaines HEs, comme celles contenant des cétones telles que l' α -thujone, présentent un potentiel neurotoxique (Franchomme et Penoël, 1990 ; Smith et al., 2000).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, ainsi que celles de *Rosmarinus officinalis* et de *Mentha spicata*, ont démontré des propriétés antibactériennes et antifongiques (Pellecuer et al., 1980 ; Benjilali et al., 1987 ; Agnihotri et al., 1996).

5.2. Propriétés

Ces huiles essentielles possèdent également diverses propriétés bénéfiques telles que l'antioxydante, l'antivirale, l'antiparasitaire, l'anti-inflammatoire, et l'expectorante, ainsi que des activités toniques, carminatives, digestives, et antispasmodiques (Nikolic et al., 2014).

Propriétés Physicochimiques:

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

- **Aspect:** Liquides à température ambiante, incolores ou jaunes pâles.
- **Miscibilité:** Peu ou non miscibles à l'eau, volatiles, odorantes et inflammables.
- **Solubilité:** Solubles dans les solvants organiques et les alcools.
- **Densité:** Généralement inférieure à 1 (Rhayour, 2002).
- **Oxydation:** Sensibles à l'oxydation et altérables, nécessitant une attention particulière au stockage (Bruneton, 1987).

Propriétés Pharmacologiques:

- **Antiseptique:** Présent dans les trois HEs, offrant une protection contre les infections.
- **Expectorantes et diurétiques:** Effets notables, notamment pour l'huile de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* (Vokou et al., 2002).
- **Spasmodiques et sédatives:** Certaines, comme l'huile de *Mentha spicata*, ont des effets relaxants (Vokou et al., 2002).
- **Irritantes:** Potentiellement irritantes, particulièrement l'huile de *Thymus vulgaris* (Smith et al., 2000).
- **Cicatrisantes:** L'huile de *Rosmarinus officinalis* est réputée pour ses propriétés cicatrisantes (Caillard, 2003).
- **Activité analgésique:** Présente notamment dans les huiles de *Thymus vulgaris* et d'*Origanum vulgare*, bien que modérée pour la *Mentha spicata* (Schwammleet al., 2001).

6. Domaine d'application

Les huiles essentielles (HEs) des plantes ont trouvé des applications variées dans des domaines tels que l'aromathérapie, la pharmacie, la parfumerie, la cosmétique et la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs spectres d'activités biologiques étendus et bien documentés (Paster et al., 1990 ; Lamiri et al., 2001 ; Cimanga et al., 2002). En particulier, ces huiles suscitent un grand intérêt dans l'industrie alimentaire en raison de leur potentiel antiseptique remarquable et sont reconnues comme des options sûres et fiables.

PARTIE 1/CHAPITRE II : AGENTS ANTIMICROBIENS HE de romarin, menthe verte, thym

Les HEs peuvent être utilisées comme additifs antimicrobiens dans les aliments en raison de leur capacité à exercer un pouvoir bactéricide ou une activité bactériostatique contre divers agents pathogènes d'origine alimentaire, tels que *Salmonella typhimurium*, *E. coli* et *S. aureus* (Martins, 2020). Elles sont également employées pour la conservation de la viande et des 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 dépassé son rôle initial de simple protection des aliments. Il désigne un matériau utilisé comme conteneur secondaire ou tertiaire, conçu pour protéger les produits des influences extérieures et garantir leur entretien ainsi qu'un stockage adéquat. Un « emballage multiple » est un emballage secondaire destiné à la vente, imprimé ou transparent, qui contient et expose plusieurs unités de produits identiques ou différents, chaque unité étant étiquetée individuellement. Cet emballage peut également inclure un objet promotionnel (CODEX ALIMENTARIUS, 2019).

Les emballages jouent un rôle essentiel en tant que barrière protectrice contre différents facteurs externes. Ils empêchent la prolifération de micro-organismes et protègent les aliments des éléments chimiques tels que les gaz, l'humidité et la lumière. De plus, ils aident à maintenir la qualité nutritionnelle, les propriétés sensorielles et la durée de conservation des aliments, tout en assurant une protection physique lors du transport et de la distribution.

1. Évolution de l'emballage

Dans les périodes nomades de l'histoire humaine, l'alimentation se basait sur la cueillette et la recherche immédiate de nourriture, sans préoccupation pour sa conservation. Toutefois, avec l'établissement des premières communautés et l'utilisation d'outils, le besoin de contenir et de préserver les aliments est devenu essentiel. Le tableau I illustre les principales évolutions de l'emballage alimentaire.

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

Années	Développement des parquets
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.

2. Caractérisation des matériaux utilisés pour l'emballage

Selon Šcetar Mario et al. (2021), les matériaux d'emballage alimentaire doivent répondre à des exigences strictes tout en étant non toxiques. Ces critères incluent :

- Une protection sanitaire efficace, avec une barrière contre l'humidité, les gaz, les odeurs, la lumière et les graisses.
- Une résistance aux chocs.
- La transparence.
- L'inviolabilité.
- Une facilité d'ouverture, de fermeture et d'élimination.
- Des contraintes liées à la taille, la forme, le poids, l'apparence et la capacité d'impression.

- Un faible coût.

3. Différentes variétés et niveaux de l'emballage alimentaire

3.1. Variétés de l'emballage alimentaire

Šcetar Mario et al. (2021) ont découvert que les premières formes d'emballage utilisées par l'homme comprenaient le lin, les feuilles de bananier et des produits d'origine animale, comme le cuir ou les estomacs et vessies, qui sont encore utilisés de nos jours.

Aujourd'hui, la production d'emballages pour denrées alimentaires utilise une grande variété de matériaux. Parmi ces matériaux figurent le verre, les métaux, les plastiques, le bois, le carton et le papier, chacun ayant des caractéristiques de performance spécifiques. Pour les emballages en plastique, leur capacité de protection dépend des polymères utilisés lors de leur fabrication.

3.2. Niveaux d'emballages alimentaires

Les emballages peuvent être classés en 4 niveaux (Figure9).

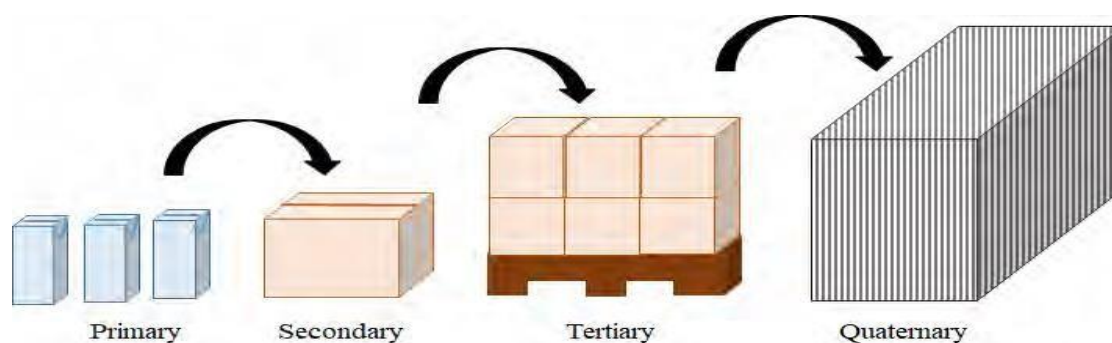


Figure 9: Niveaux d'emballages alimentaires (Scetar Mario et all.,2021).

- **Emballage primaire** : Il s'agit du premier niveau d'emballage, en contact direct avec le produit, comme une bouteille en verre, une boîte métallique, un sachet ou une pochette en plastique. Cet emballage joue un rôle crucial en tant que première barrière protectrice.

- **Emballage secondaire** : Il regroupe plusieurs emballages primaires, en fonction du type et de la taille du produit. Par exemple, une pochette en plastique peut contenir plusieurs bonbons ou biscuits emballés individuellement.
- **Emballage tertiaire** : Appelé aussi "emballage de transport", il rassemble des emballages secondaires pour faciliter le commerce national et international. Les palettes et les sangles sont des exemples typiques d'emballages tertiaires.
- **Emballage quaternaire** : Cet emballage facilite la manipulation des emballages tertiaires. Il se présente souvent sous la forme de grands conteneurs métalliques, capables de transporter plusieurs palettes par bateau ou train. Si nécessaire, les conditions internes du conteneur, telles que la température, l'humidité, la composition de l'atmosphère et la lumière, peuvent être contrôlées.

4. Facteurs influençant le choix de l'emballage alimentaire

Selon Lyijynen et al. (2003), plusieurs facteurs influencent le choix d'un emballage alimentaire approprié :

- **Lumière** : L'emballage doit permettre une transmission contrôlée de la lumière pour mettre en valeur le produit tout en protégeant sa qualité.
- **Température** : Chaque aliment nécessite un emballage adapté à sa température de stockage pour préserver ses caractéristiques, garantir son intégrité et assurer une conservation optimale. Par exemple, les emballages pour les aliments congelés doivent rester flexibles et résister aux fissures à basses températures (Robertson, 2013 ; Lee, 2008).
- **Humidité** : La gestion de l'humidité est essentielle pour déterminer la durée de conservation des aliments. Le microclimat qui se forme à l'intérieur de l'emballage dépend de la vapeur d'humidité présente dans l'aliment à la température de stockage et de la perméabilité de l'emballage. Un contrôle précis de cette humidité est donc indispensable.
- **Microorganismes** : Les emballages mal fermés ou endommagés, comme ceux pliés, agrafés ou fermés par torsion, augmentent le risque de contamination microbienne. Les sources principales de contamination incluent la présence d'air, d'eau, des thermosoudures inadéquates ou des déchirures dans l'emballage. Toutefois, dans

certaines conditions (basses températures, faible humidité ou usage de conservateurs), le rôle de l'emballage devient moins critique pour prévenir la contamination microbienne (Robertson, 2013).

- **Propriétés mécaniques** : La capacité de l'emballage à protéger les aliments des dommages mécaniques dépend de sa résistance à la traction (lors de l'empilement), à l'abrasion (pendant la manipulation et le transport), à la perforation et aux vibrations. La résistance des matériaux peut être mesurée en évaluant leur allongement sous une force appliquée à partir d'un diagramme contrainte-déformation (figure 10).

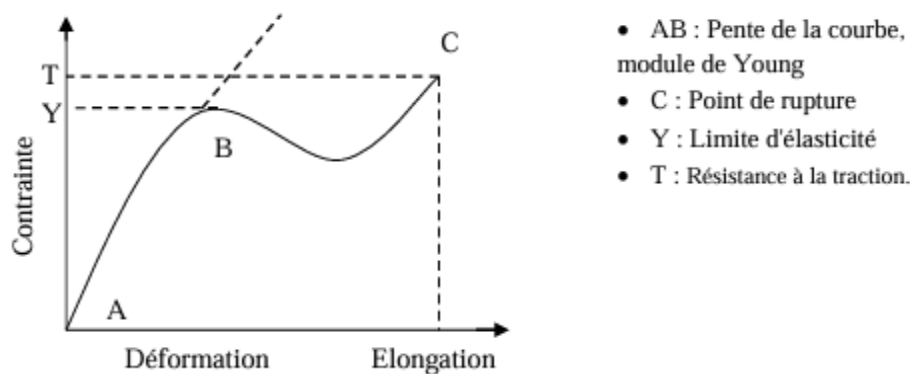


Figure 10: Courbe de contrainte à la déformation pour les films d'emballage flexible (Briston, J.H., 1980).

5. Interaction (l'aliment et l'emballage)

Toute interaction entre un matériau d'emballage et l'aliment qu'il contient est généralement indésirable pour deux raisons principales. Premièrement, ces interactions peuvent avoir des effets toxiques pour le consommateur, compromettant ainsi la sécurité alimentaire. Deuxièmement, elles peuvent aussi réduire la durée de conservation de l'aliment ainsi que sa qualité sensorielle, affectant son goût, sa fraîcheur et son apparence.

Les emballages plastiques sont souvent composés de films flexibles contenant des polymères résiduels et divers additifs, tels que des agents de nucléation, des stabilisants, des plastifiants et des agents antibuée (Lee, D.S, 2008). Certains matériaux d'emballage contiennent aussi des composés volatils pouvant être absorbés par les aliments et entraîner

leur altération, en raison notamment des solvants utilisés dans les procédés de fabrication (Lee, D.S, 2008).

II. L’emballage actif

Bien avant que le concept moderne d’emballage ne soit formalisé, les Égyptiens utilisaient déjà la cire d'abeille pour conserver leurs aliments, ce qui peut être considéré comme une première forme d’emballage actif. L'emballage actif, tel que nous le connaissons aujourd'hui, a été introduit au Japon au début des années 1970, puis s'est répandu aux États-Unis dans les années 1980, notamment pour des applications militaires. Par la suite, l'enseigne "Mark & Spencer" a popularisé ce concept en Europe, en proposant un produit innovant : du poisson frais fumé emballé avec un absorbeur d'oxygène (Gontard, 2000).

Aujourd'hui, l'emballage actif est utilisé dans de nombreux secteurs, notamment l'alimentation, la pharmacie, la cosmétique, l'agriculture et l'électronique. Les tendances actuelles visent à prolonger la durée de conservation des produits, à réduire le gaspillage alimentaire et à limiter l'impact environnemental.

1. Concept et spécificités de l’emballage actif

1.1. Concept de l’emballage actif

L'emballage actif est conçu pour prolonger la durée de conservation ou maintenir et améliorer l'état des denrées alimentaires qu'il contient. Il inclut intentionnellement des composants capables de libérer ou d'absorber certaines substances dans l'aliment ou dans son environnement immédiat (Réglementation Européenne 450/2009).

Ce concept novateur a émergé en réponse à l'évolution des besoins des consommateurs et aux tendances du marché actuel (Quintavalla et Vicini, 2002).

En résumé, un emballage actif est un contenant conçu pour interagir avec son environnement ou son contenu, qu'il soit influencé ou non par des facteurs externes, afin de remplir ses fonctions principales (Gimenez et Aoussat, 2011).

1.2. Spécificités de l’emballage actif

Les emballages actifs se distinguent par leur capacité à interagir avec l'environnement interne du produit qu'ils contiennent. Ils peuvent, par exemple, sélectionner, libérer de manière contrôlée, adsorber ou transformer certains composés ou gaz (Figure 11). Cela inclut des fonctionnalités telles que la perméabilité sélective à l'oxygène, au dioxyde de carbone, ou même à divers composés aromatiques, permettant ainsi de prolonger la durée de conservation et de préserver la qualité des produits emballés.

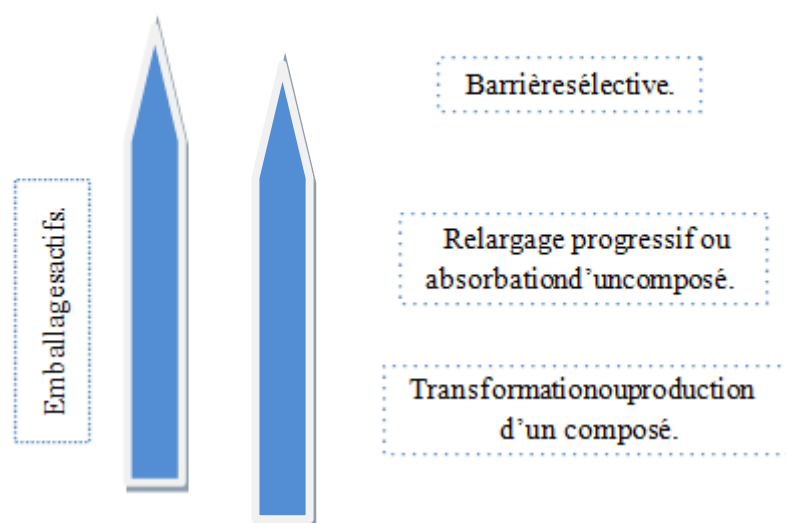


Figure 11: Principales caractéristiques d'un emballage actif (Gontard, 2000).

2. Différentes catégories

Les emballages actifs peuvent être classés en trois grandes catégories selon leur fonctionnalité (figure 12). 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.

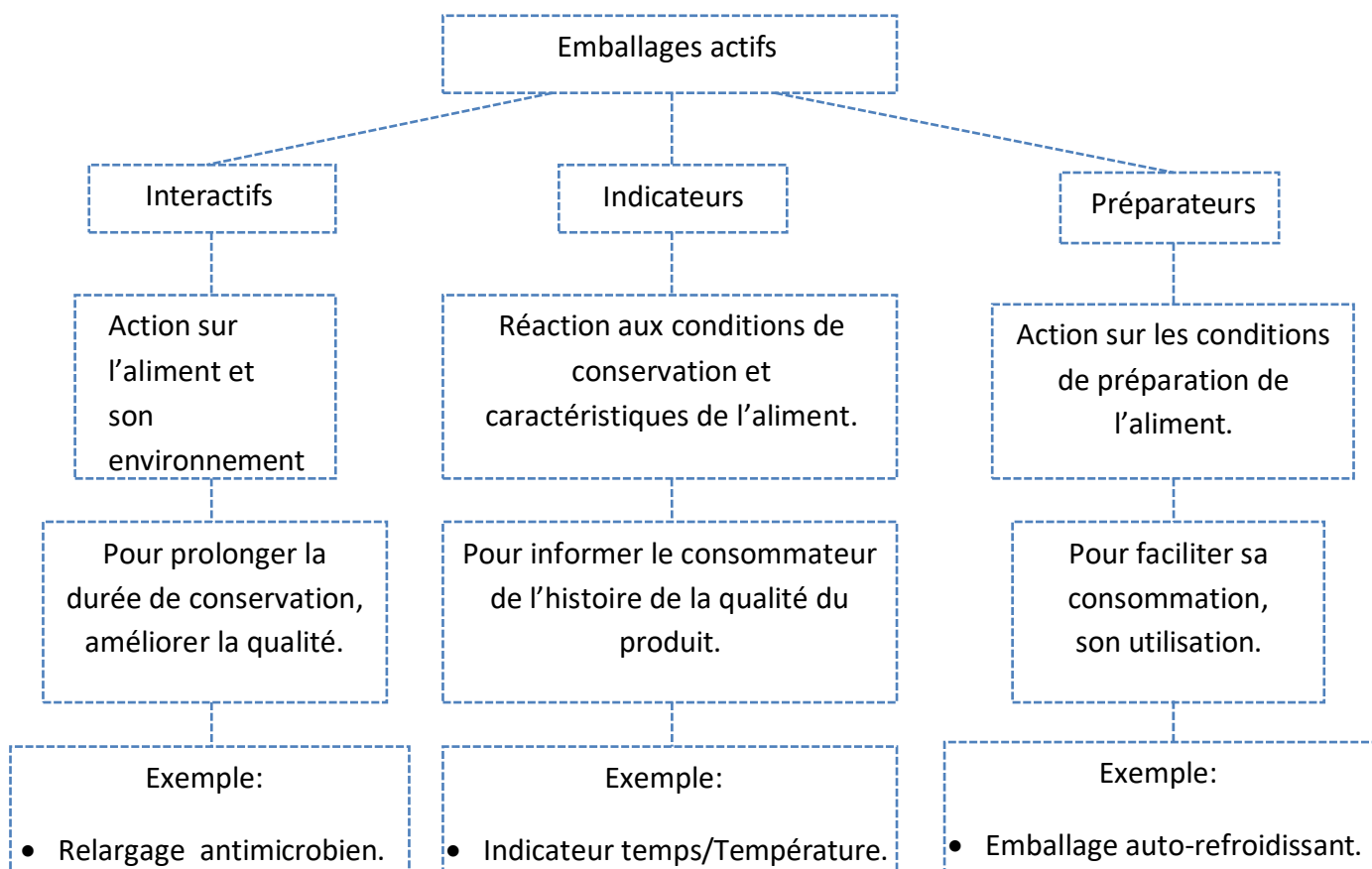


Figure12: Les trois grandes catégories d'emballages actifs (Gontard, 2000).

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.

3. Emballage actif antimicrobien

3.1. Concept des emballages actifs antimicrobiens

Les emballages alimentaires munis de propriétés antimicrobiennes sont conçus pour réduire, ralentir ou retarder la croissance des micro-organismes potentiellement présents dans les produits ou sur les matériaux d'emballage. Ces innovations représentent une

avancée significative face aux préoccupations liées à la sécurité des aliments, en offrant la possibilité de freiner la prolifération microbienne tout en préservant la qualité, la fraîcheur et l'innocuité des produits. Lorsque les agents antimicrobiens sont libérés progressivement de l'emballage, leur efficacité peut s'étendre sur toute la durée de stockage, transport et distribution des aliments (Quintavalla, S. et Vicini, L. 2002).

De nos jours, les emballages antimicrobiens se déclinent en plusieurs formes, incluant des sachets diffusant des agents antimicrobiens volatils, des films polymères contenant des substances antimicrobiennes intégrées, ou encore des polymères auxquels ces agents sont adsorbés en surface.

3.2. Systèmes d'emballage antimicrobien

Les agents antimicrobiens peuvent être intégrés directement dans les matériaux d'emballage et migrer vers les aliments par un processus de diffusion et de répartition. Cette migration permet une interaction continue entre l'emballage et le produit, prolongeant ainsi l'effet antimicrobien au cours du temps. La majorité des systèmes d'emballage alimentaire se divisent en deux catégories : soit un système Emballage/Aliment, où l'emballage est en contact direct avec l'aliment, soit un système Emballage/Espace libre/Aliment, où il existe un espace entre l'aliment et l'emballage (Figure 13).

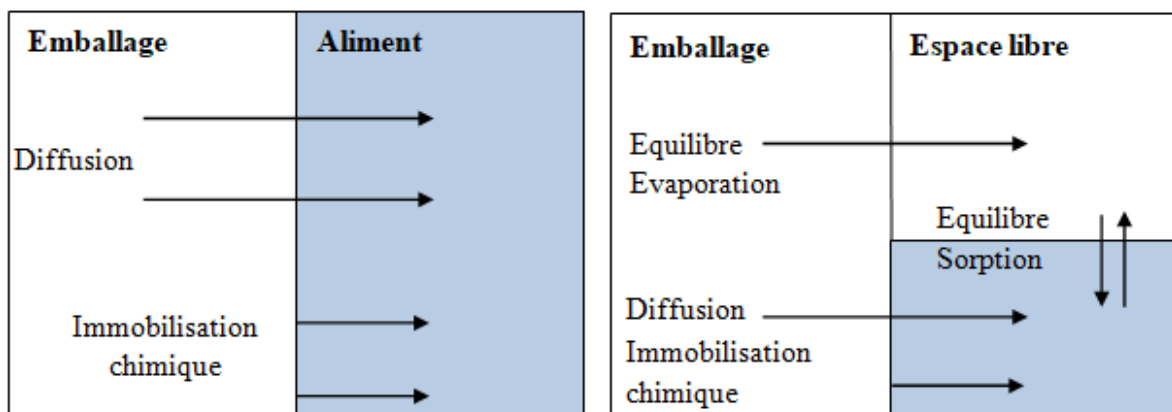


Figure13: Systèmes d'emballages alimentaires et comportement des substances actives (Han, J.H. 2000)



Partie II: Partie pratique



Matériel et méthodes

Cette étude a pour objectif principal d'évaluer les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle de romarin, l'huile essentielle de menthe verte, de l'huile essentielle (HE) de thym, ainsi que de leur combinaison. Parallèlement, l'objectif secondaire est d'évaluer l'efficacité de l'incorporation de l'HE de thym dans un emballage alimentaire destiné à améliorer la conservation du poulet.

La recherche a été menée dans le laboratoire de contrôle de qualité de police scientifique à Alger. Ce choix ont permis de profiter d'un environnement scientifique favorable à la réalisation de cette étude.

I. Matériels

1. Matériels non biologique

1.1. Dimethylsulfoxyde

Le DMSO est un produit commercialisé par l'entreprise VWR Chemicals BDH. Ses caractéristiques, rapportées dans la fiche technique (Annexe 1).

- Tout le matériel utilisé dans cette étude a été méthodiquement répertorié dans (l'annexe 3).

2. Matériel biologique

2.1. Micro-organismes testés

Dans le cadre de cette étude, quatre souches microbiennes de référence ont été choisies pour évaluer l'activité antimicrobienne des deux substances ainsi que de leur combinaison. Il s'agit de :

- Deux souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922 (bactérie à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (bactérie à Gram positif).
- Deux souches fongiques : *Aspergillus niger* ATCC 16404 (moisissure) et *Candida albicans* ATCC 10231 (levure).

Ces souches (Annexe 11) ont été sélectionnées en raison de leur pathogénicité, leur résistance aux antibiotiques, ainsi que leur implication dans les cas de toxi-infections

alimentaires. Elles ont été obtenues auprès du laboratoire de contrôle de qualité de la police scientifique.

2.2. Extraits biologiques étudiés

a) Huile essentielle de thym

L'huile essentielle de thym utilisée a été acquise auprès de l'entreprise VieBio Industrie (figure 14). Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Espèce : *Thymus vulgaris*.
- Chémotype : thymol, Carvacrol.
- Présence de P-Cymène, γ -Terpinène, Linalool.
- Famille: Lamiaceae.
- Organe de production : parties aériennes.
- Obtention à partir de plantes spontanées.



Figure 14 : HE de thym

b) Huile essentielle de menthe verte

L'huile essentielle de thym utilisée a été acquise auprès de l'entreprise VieBio Industrie (figure 15). Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Espèce : *Mentha spicata*.
- Chémotype : Carvone.
- Présence de Limonène, Menthol, 1,8-Cinéole.
- Famille: Lamiaceae.
- Organe de production : parties aériennes.
- Obtention à partir de plantes spontanées.



Figure 15 : HE de menthe verte

c) Huile essentielle de romarin

L'huile essentielle de thym utilisée a été acquise auprès de l'entreprise VieBio Industrie (figure 16). Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Espèce : *Rosmarinus officinalis*.
- Chémotype : 1,8-Cinéole (Eucalyptol), Camphre
- Présence de α -Pinène, Camphène, Verbénone
- Famille: Lamiaceae.
- Organe de production : parties aériennes.
- Obtention à partir de plantes spontanées.



Figure 16 : HE de romarin

2.3. Disques témoins positifs

Deux disques ont été rigoureusement sélectionnés pour leurs propriétés antimicrobiennes. Le premier disque (ATB), contenant de la Gentamicine (CN 120), a été utilisé pour l'antibiogramme. Le second disque (antifongique), contenant du Ketoconazole (KET 50), a été employé pour l'antifongigramme.

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

Les composants des milieux de culture utilisés dans cette étude ont été méthodiquement répertoriés dans l'annexe 5.

2.4. Cuisses de poulet

Le choix minutieux de la matrice alimentaire est un pilier essentiel de cette recherche, reposant sur des critères scientifiques bien définis. La sélection de la viande de poulet dans cette étude se fonde sur des facteurs spécifiques :

- La viande de poulet se distingue par sa composition et sa teneur élevée en eau, la rendant particulièrement susceptible à l'altération.
- Sa faible teneur en graisse en fait un aliment idéal pour les consommateurs, un critère primordial compte tenu de l'impact négatif des matières grasses sur l'efficacité des substances antimicrobiennes, souvent réduite par les lipides.
- L'abondance et l'accessibilité de la viande de poulet sur le marché algérien ont également été des éléments déterminants 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 2). Cette mesure vise à garantir la qualité et la salubrité des produits alimentaires utilisés dans la recherche.

Afin de préserver 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.

II. Méthodes

1. Vérification des souches de référence

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

1.1. Étude macroscopique (Observation macroscopique)

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

1.2. Examen microscopique

a. État 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 la forme de la bactérie : il existe deux 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 dans la goutte de bleu de méthylène.
- 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'éthanol à 96° pendant 5 à 10 secondes et rincer aussitôt à la pissette d'eau déminéralisée.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée à 1/10. Laisser agir 30 secondes et rincer à la pissette d'eau déminéralisée.
- Sécher et fixer à la chaleur au-dessus de la flamme du bec Bunsen, déposer une goutte d'huile de vaseline, et observer à l'immersion, objectif x 100.

La coloration permet de séparer les bactéries en deux groupes :

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

1.3. Repiquage

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur des milieux de culture sélectifs favorables 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.
- Étaler 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 celles 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 purifier les différentes souches, une stratégie est mise en œuvre pour maintenir la souche dans un état de vigueur en effectuant des opérations de repiquage à intervalles réguliers de 72 heures.

2. Préparation des suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens

2.1. Préparation des suspensions microbiennes

a. Préparation de la suspension bactérienne et de levure

Pour garantir des résultats fiables, une standardisation rigoureuse est nécessaire :

- Les souches conservées à 4 °C sontensemencées sur des milieux de culture sélectifs appropriés pour chaque type de bactérie (gélose Hektoen pour *E. coli*, gélose Chapman pour *S. aureus*) et sur milieu de culture Sabouraud pour les levures.
- Elles sont incubées à 37 °C pendant 18 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 heures pour les levures.
- Une à deux colonies bien isolées sont prélevées et mises dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile (annexe 04).

- Après agitation de la suspension au vortex, la standardisation est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre pour obtenir une absorbance située entre 0,08 et 0,1 pour les bactéries et 0,04 pour les levures (en ajustant la concentration par ajout de colonies ou dilution avec de l'eau physiologique stérile).
- L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 625 nm.

Des absorbances entre 0,08 et 0,1 pour les bactéries et 0,04 pour les levures correspondent à une concentration de 10^7 UFC/ml.

b. Préparation de la solution sporale

Les spores des cultures jeunes (cultures de 3 jours) sont récoltées en suivant une méthode précise. Voici les étapes :

- Verser 14 ml d'eau physiologique stérile dans une boîte de Petri contenant les cultures incubées.
- Filtrer la solution obtenue à l'aide de 2 compresses stériles dans un flacon stérile destiné aux ECBU.
- Transférer la suspension obtenue dans un tube Falcon et centrifuger à 6000 tours par minute pendant 30 minutes.

Cette étape permet une répartition uniforme des spores dans l'eau physiologique. Pour standardiser la concentration des spores à 10^7 spores/ml, la densité optique (DO) de la suspension fongique est mesurée à l'aide d'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 107 spores/ml (Nabet, 2009).

2.2. Préparation des solutions des agents antimicrobiens

2.2.1. Préparation des solutions des HE de thym, de menthe verte, et de romarin

Dans des conditions stériles, une dilution décimale des huiles essentielles (HE) de thym, de menthe verte, et de romarin a été effectuée dans du DMSO. Voici le protocole détaillé :

- Le DMSO a été autoclavé pour garantir sa stérilité.

Préparation de l'HE de thym

Dilution 1

- Dans un tube en verre stérile, ajouter avec précision 1 ml d'HE de thym.
- Mesurer avec précision 9 ml de DMSO à l'aide d'une pipette graduée de 10 ml 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).
- Ajouter ce 1 ml 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).
- Ajouter ce 1 ml à 9 ml de DMSO dans un autre tube stérile.
- Effectuer un mélange minutieux pour garantir une dispersion homogène des composants.

Préparation de l'HE de menthe verte

Suivre exactement les mêmes étapes que pour l'HE de thym.

Préparation de l'HE de romarin

Suivre exactement les mêmes étapes que pour l'HE de thym.

Préparation de la combinaison des HE de thym, de menthe verte et de romarin

Pour préparer une combinaison des trois huiles essentielles, suivez ces étapes :

- Dans un tube en verre stérile, ajouter avec précision 100 µl de la dilution 1 de l'HE de thym.
- Ajouter 100 µl de l'HE de menthe verte pure.
- Ajouter 100 µl de l'HE de romarin pure.
- Mélanger soigneusement le contenu du tube pour garantir une dispersion homogène des trois huiles essentielles.

Cette combinaison permet d'explorer l'effet synergique potentiel des trois huiles essentielles.

3. Évaluation de l'effet antimicrobien des huiles essentielles (thym, de menthe verte, de romarin et de leur combinaison)

a) Méthode de l'antibiogramme (méthode des disques)

Les effets antimicrobiens des huiles essentielles (HE) de thym, de menthe verte, de romarin, 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 µl de la suspension microbienne standardisée. L'étalage du volume d'ensemencement sur la surface de la gélose est réalisé à l'aide d'un écouvillon, permettant ainsi d'obtenir un tapis microbien après incubation.

Les disques sont déposés dans des boîtes de Pétri et imprégnés individuellement de 10 μl des solutions suivantes :

- HE de thym (dilution 1)
- HE de menthe verte pure
- HE de romarin pur

Cette méthode est applicable à plusieurs espèces microbiennes. L'action antimicrobienne se manifeste par la formation de zones d'inhibition (ZI) autour des disques préalablement imprégnés des agents antimicrobiens. Les diamètres des ZI sont mesurés après incubation pour évaluer l'efficacité des différentes solutions.

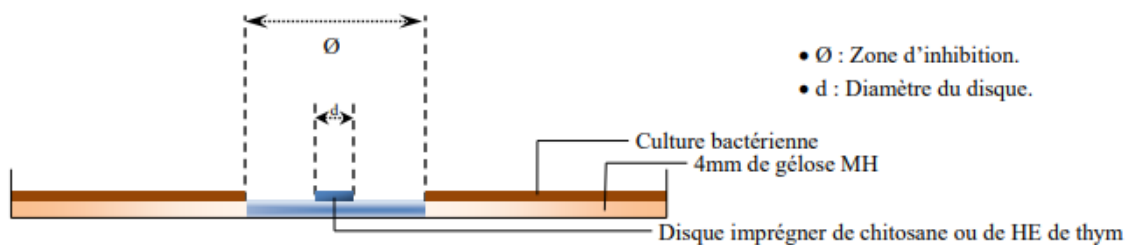


Figure 17 : Représentation schématique de la méthode de l'antibiogramme.

b) Technique de micro-atmosphère

Pour évaluer l'effet antimicrobien des huiles essentielles de thym, de menthe verte, de romarin, ainsi que leurs combinaisons, la technique de micro-atmosphère a été utilisée sur la suspension bactérienne standardisée d'*E. coli*. La procédure est la suivante :

1. Inoculation de la suspension bactérienne :

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

2. Déposition des disques imprégnés :

- **Boîte 1** : Un disque imprégné de 10 μL de l'HE de thym pure a été déposé sur le couvercle interne de la boîte de Pétri, en veillant à ce qu'il ne touche pas le milieu gélosé.

- **Boîte 2** : Un disque imprégné de 10 μL de l'HE de thym diluée à 1/10 a été déposé sur le couvercle interne de la boîte de Pétri.
 - Dans cette même boîte, un disque contenant un antibiotique spécifique (CN 120) a été placé à côté de ce disque pour servir de témoin positif, permettant ainsi de vérifier l'inefficacité volatile de ce dernier.
 - De plus, un disque imbibé de 10 μL de DMSO a été disposé en tant que témoin négatif.
- **Boîte 3** : Un disque imprégné de 10 μL de l'HE de menthe verte pure a été déposé sur le couvercle interne de la boîte de Pétri.
- **Boîte 4** : Un disque imprégné de 10 μL de l'HE de romarin pure a été déposé sur le couvercle interne de la boîte de Pétri.
- **Boîte 5** : Un disque imprégné de 10 μL de la combinaison des trois huiles essentielles (100 μL de chaque HE : thym, menthe verte, romarin) a été déposé sur le couvercle interne de la boîte de Pétri.

3. Incubation :

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

L'action antimicrobienne des huiles essentielles est déterminée par l'observation de la formation de zones d'inhibition (ZI) autour des disques imprégnés, indiquant l'efficacité des agents antimicrobiens volatiles.

4. Étude statistique

L'ANOVA a été réalisée pour déterminer les différences significatives produites après traitement avec les huiles essentielles sur les quatre souches microbiennes en comparaison avec les témoins. La méthode utilisée via le logiciel Stat Box est décrite dans l'annexe 08. Les valeurs de $P \leq 0,05$ sont interprétées comme dénotant des différences statistiquement significatives.

5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

5.1. Détermination des CMI

Nous avons entrepris la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) selon le protocole établi par le comité français de l'antibiogramme, en utilisant un milieu solide. Cette méthode implique la préparation de dilutions spécifiques des agents antimicrobiens à tester, comme indiqué dans les figures de l'annexe 07.

Pour chaque agent antimicrobien, y compris l'huile essentielle (HE) de thym diluée à 1/10 et les HE de menthe verte et de romarin à l'état pur, des dilutions ont été préparées. Ces dilutions couvrent une gamme de concentrations, allant du concentré à des dilutions séquentielles.

Chaque dilution a été inoculée sur des milieux gélosés appropriés pour chaque microorganisme cible (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *A. niger*). Après incubation à la température optimale pendant une durée appropriée, nous avons identifié la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe visiblement la croissance de l'organisme testé. Cette concentration correspond à la CMI.

Cette méthode nous permet d'évaluer précisément l'activité antimicrobienne de chaque agent, y compris leur efficacité contre différentes souches microbiennes, et de comparer les résultats obtenus pour les différentes concentrations et formulations des huiles essentielles testées.

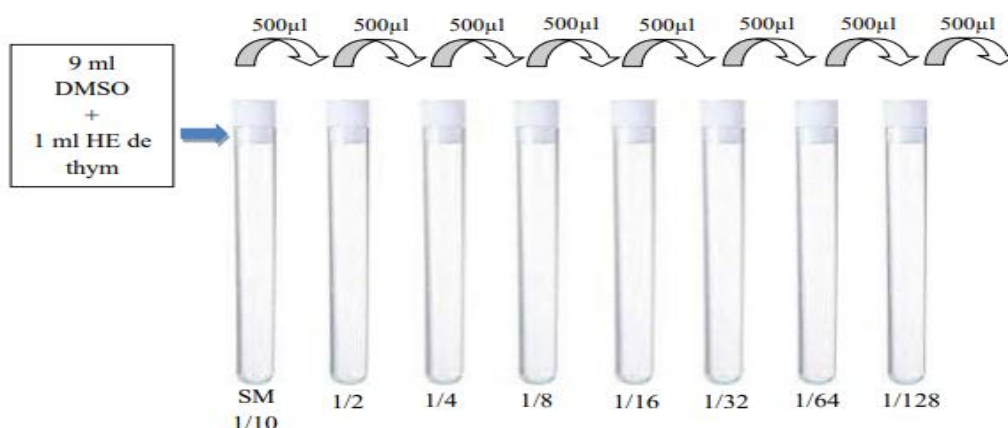


Figure 18 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de thym effectuées pour la détermination des CMI.

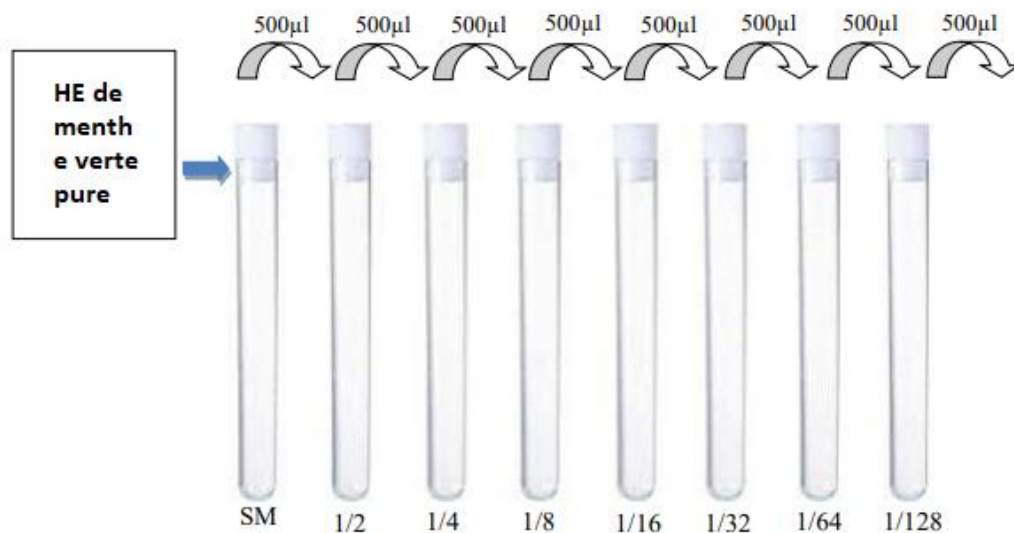


Figure 19: Schéma représentant les dilutions de l'HE de menthe verte effectuées pour la détermination des CMI.

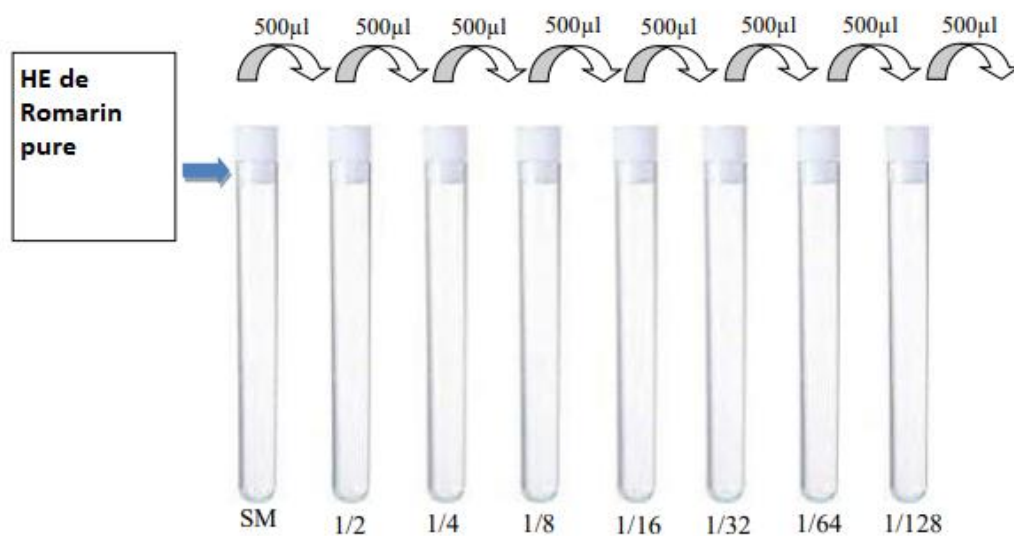


Figure 20 : Schéma représentant les dilutions de l'HE de Romarin effectuées pour la détermination des CMI.

Ensuite, nous avons procédé à l'inoculation de gélose MH dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 14 cm en utilisant un écouvillon, ce qui a permis de former un tapis bactérien après une période d'incubation. Dans chaque boîte de Pétri, des disques ont été placés et imprégnés individuellement de différentes dilutions d'agents antimicrobiens, avec une quantité de 10 µl par disque.

En ajustant les concentrations d'agents antimicrobiens, notre objectif était de déterminer la plus faible concentration à laquelle aucune croissance de microorganismes n'est observée, indiquant ainsi une inhibition de leur croissance.

La première série de boîtes de Pétri a été inoculée avec deux souches bactériennes puis incubée à 37 °C pendant 24 heures. Parallèlement, la seconde série de boîtes de Pétri a été inoculée avec deux souches de levure et de moisissure, puis incubée à 25 °C pendant 48 heures. Ce protocole nous a permis d'évaluer l'activité antimicrobienne des différents agents testés contre ces microorganismes à des températures spécifiques favorables à leur croissance respective.

5.2. Détermination des CMBs

Après avoir déterminé la CMI, les boîtes contenant des concentrations d'agent antimicrobien strictement supérieures à la CMI sont utilisées pour la détermination de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide).

Pour cela, les boîtes où aucune croissance n'est observée sont transférées en grattant la surface dans d'autres boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé (MH pour les bactéries ou Sabouraud pour la levure et la moisissure).

Les nouvelles boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries, et à 22-30 °C pendant 48 heures pour la levure et la moisissure. Cette technique permet de vérifier si les cellules sont toujours viables et capables de se développer.

Une boîte est considérée comme présentant une CMB si elle montre une croissance avec un nombre de colonies inférieur à 3 (Prescott et al., 1995). Ce critère indique que la

concentration d'agent antimicrobien utilisée est suffisante pour tuer la grande majorité des microorganismes présents.

6. Composition chimique des huiles essentielles (HE)

Pour déterminer la composition chimique des huiles essentielles (HE) utilisées dans notre étude, nous avons employé la Chromatographie en phase gazeuse couplé au Spectromètre de masse, (GC/MS). Cette méthode analytique avancée nous permet de confirmer les différents composés présents dans les HE de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* et *Mentha spicata*, tout en fournissant un profil chimique détaillé qui renforce la précision et la rigueur de notre recherche.

6.1. Principe de GC/MS

C'est une méthode d'analyse par un Chromatographe en phase gazeuse couplé au Spectromètre de masse, (GC/MS), qui consiste en la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaire. Elle donne des informations sur nature, la composition et la structure des espèces présente dans l'échantillon analysé et très utile pour les analyses des traces (De greave et al., 1986).

La combinaison de ces deux techniques d'analyses GC/MS permet de séparer les composants de l'échantillon, d'identifier chaque composant et de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention(Ir) et des données spectrales (spectre de la masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. L'avantage d'un couplage en chaine d'une interface chromatographique avec un spectromètre est la possibilité d'analyser le spectre individuel d'un composé. Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles en raison en grande partie de la facilité de la prise en main des systèmes de séparation et de détection performants, avec un cout relativement faible (Brurgot et all, 2011)

6.2. Conditions opératoires pour GC/MS:

Appareillage: GCMS modele CLARUS 500 de marque Perkin-Elmer

- **Methode GC:**

Volume injecte: 1ul

temperature injecteur: 250 deg

Colonne: Elite serie 5-MS, 30 m, 0.25 mmID, 0.25 um epaisseur de phase stationnaire

temperature initiale: 70 deg pendant 4 min

Rampe: 4deg/min jusqu'a 220 deg pendant 15 min

Temps d'analyse 56.5 min

- **Methode MS:**

Mode d'ionisation: Impact electronique

Energie: 70 ev

Temperature: source: 250 deg

Temperature ligne de transfert: 250 deg

Analyseur: Quadripole

Mode: Balayage entre 20 - 550 dalton

Delai de solvant: 5.9 min

7. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) de thym sur les cuisses de poulet : Tests in-situ

7.1. Application de l'HE de thym sur les cuisses de poulet

Inspirée par l'étude de Nadjat Ardjoum et al., 2023, qui a incorporé l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et un extrait éthanolique de propolis dans des films d'amidon de maïs pour montrer un effet synergique contre *E. coli* et *Listeria monocytogenes*, notre étude "in vitro"

évalue l'activité de l'HE de thym sur la croissance de la flore initiale de poulet ainsi que sur la souche d'E. coli, souvent impliquée dans les cas de toxi-infections alimentaires.

Méthodologie :

- Sélection de 9 cuisses de poulet fraîches et non traitées.
- Application homogène de l'HE de thym (voir Annexe 09).
- Formation de groupes d'échantillons (voir Figure 21) :
 - 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 (voir Annexe 10), 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.



Figure21: Représentations des 9 échantillons de cuisses de poulet.

- Conditionnement des échantillons

Pour le groupe 2, envelopper chaque cuisse de poulet entièrement avec le film plastique dédié.

Pour le groupe 3, placer chaque cuisse de poulet dans une barquette adaptée à sa taille, puis l'emballer soigneusement avec le film plastique correspondant, en veillant à une étanchéité parfaite pour éviter toute contamination extérieure.

- Mesures de contrôle

Maintenir des conditions stériles lors de la manipulation des échantillons pour prévenir toute contamination croisée. Prendre en compte les conditions environnementales, telles que la température et l'humidité, afin de préserver la qualité des échantillons.

- Conservation des échantillons

Stocker les cuisses de poulet emballées dans un réfrigérateur, à une température contrôlée de $5 \pm 1^\circ\text{C}$, pendant 96 heures.

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

Après une période de conservation de 96 heures à une température contrôlée de réfrigération ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), les cuisses de poulet ont été soumises à des tests microbiologiques pour évaluer l'efficacité de l'HE de thym :

- Prélèvement des échantillons en grattant délicatement la surface à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- Ensemencement des prélèvements sur différents milieux de culture : gélose PCA pour les cuisses de poulet non contaminées, et gélose Hektoen pour les cuisses de poulet contaminées intentionnellement.
- Répartition des prélèvements sur des boîtes de Petri contenant ces milieux par stries pour une répartition uniforme des microorganismes.
- Incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour favoriser la croissance bactérienne.
- Comptage des colonies présentes sur chaque échantillon pour quantifier la contamination bactérienne et analyser l'effet de l'HE de thym.

Cette approche permettra de déterminer l'efficacité de l'HE de thym dans différentes conditions d'emballage sur la réduction de la flore bactérienne, en particulier *E. coli*, et d'évaluer son potentiel dans les applications de sécurité alimentaire.



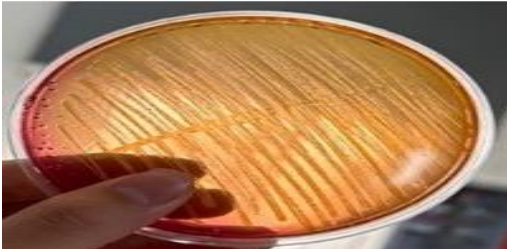

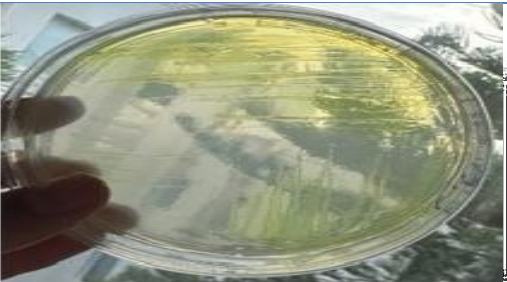

Résultats et discussions

I. Vérification des souches de références

1. Observations macroscopiques

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

Tableau II: Propriétés macroscopiques des différentes souches microbiennes.

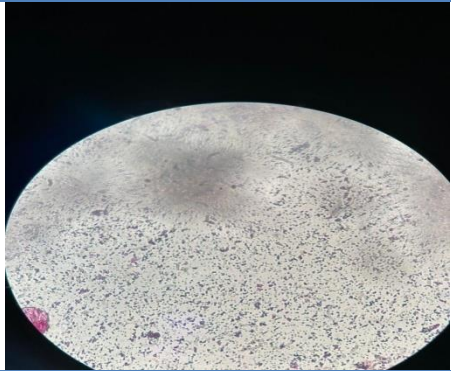
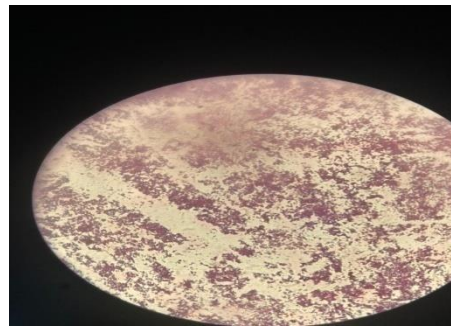
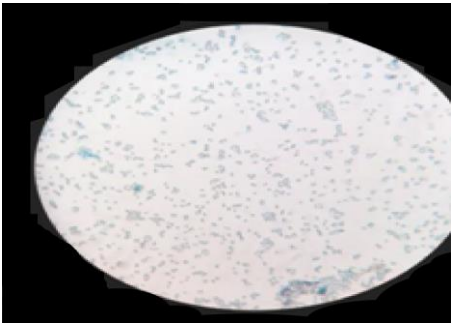
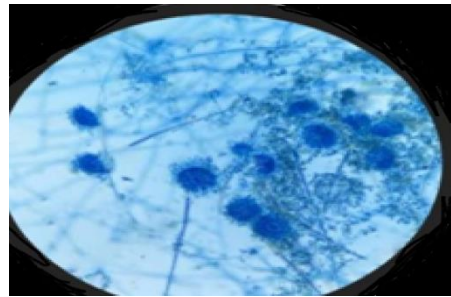
Souches	Apparence	Couleur	Milieu de Culture	Aperçu
<i>E. coli</i> ATCC25922	2 à 4 mm lisses rondes	Rouge	gélose Hektoen	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	1 à 3 mm lisses Rondes	Dorée	Gélose Chapman	
<i>C. albicans</i> ATCC10231	2 à 3 mm Arrondies Ovale	Blanche crémeuse	Gélose Sabouraud	
<i>A. niger</i> ATCC16404	Mycelium	Sombre Noirâtre	Gélose Sabouraud	

Les observations macroscopiques ont permis une première validation de l'identité des souches microbiennes utilisées, ainsi que de leur pureté.

2. Observations microscopiques

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

Tableau III: Propriétés microscopiques des différentes souches microbiennes.

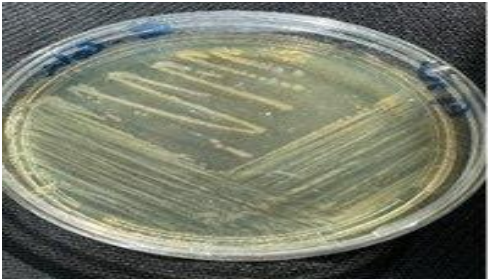


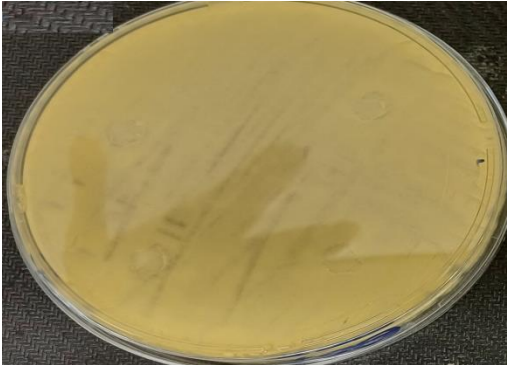
Souches	Apparence	Mobilité	Gram	Aperçu
<i>E.coli</i> ATCC25922	Coco-bacille	Mobile.	Négatif.	
<i>S. aureus</i> ATCC25223	Coqueen amas.	Immobile.	Positif.	
<i>C. albicans</i> ATCC10231	Blastoconidie	Immobile.		
<i>A.niger</i> ATCC16404	Tête de conidies.	Immobile.		

La seconde confirmation de l'identité des souches microbiennes, ainsi que de leur pureté, a été réalisée par des observations microscopiques et des tests biochimiques spécifiques, garantissant l'authenticité des isolats et l'absence de contamination.

- **Repiquage**

Le tableau IV montre les repiquages des différentes souches.

Tableau IV: Résultats de repiquage des différentes souches microbiennes.

Souches microbienne	Milieu de culture	Aperçu
<i>E. coli</i> ATCC25922	Gélose Hektoen	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	Gélose Chapman	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Gélose Sabouraud	
<i>A. niger</i> ATCC16404	Gélose Sabouraud	

Les résultats du repiquage des différentes souches microbiennes se sont révélés satisfaisants, avec une réussite notable dans la purification et le maintien de leur viabilité. Les quatre souches ont été transférées avec succès dans des conditions de culture adaptées, affichant des taux de survie supérieurs à 95 % lors de leur passage dans de nouveaux milieux de culture. Ces résultats encourageants ouvrent la voie à la poursuite optimale de nos recherches.

II. Suspensions microbiennes et solutions des agents antimicrobiens

1. Standardisation des suspensions microbiennes

Les résultats obtenus pour la standardisation des quatre souches microbiennes confirment 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 une absorbance de 0,04 pour la levure et les moisissures.

2. Sélection des solutions d'agents antimicrobiens

- **Sélection des solutions des HEs**

Nous avons opté pour l'utilisation de l'HE de thym à la dilution 1 afin de modérer son activité antimicrobienne intense, qui aurait pu masquer les résultats et compromettre notre capacité à évaluer précisément son efficacité. Cette approche a permis d'obtenir des résultats plus nuancés et une meilleure compréhension de son effet sur les micro-organismes ciblés.

De même, pour les HE de romarin et de menthe verte, nous avons utilisé les huiles pures. Cette décision a également été motivée par le fait que l'absence de dilution permettait de ne pas atténuer leur effet et d'obtenir des résultats plus distincts, garantissant ainsi une meilleure évaluation de leur efficacité antimicrobienne.

III. Présentation des résultats (antibiogrammes/ antifongigrammes)

Pour évaluer les résultats, nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition (ZIs) autour des disques, incluant le diamètre du disque lui-même (Tableau V). La toxicité potentielle du solvant a été soigneusement considérée, car même en traces infimes, un solvant ne devrait pas interférer avec le processus biologique. Il est également important de prendre en compte les interactions possibles entre le solvant et les composés dissous, car ces interactions peuvent entraîner la dissociation, la déshydratation ou l'isomérisation des composants (Yrjöen, 2004).

Nous avons choisi le DMSO comme solvant pour nos tests. Les résultats obtenus ont montré que ce solvant est approprié, n'entravant en aucune manière la croissance normale des souches microbiennes (figures 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 29).

Les tests ont mis en évidence l'efficacité des trois huiles essentielles (thym, romarin, et menthe verte) contre les microorganismes étudiés. Les antibiogrammes et antifongigrammes ont démontré leur utilité pour évaluer la sensibilité des microorganismes, en utilisant les HE à la place de l'antibiotique Gentamicine et de l'antifongique Ketoconazole.

Les ZIs observées autour des disques contenant les huiles essentielles ont permis de prédire la réactivité de chaque souche vis-à-vis de ces traitements naturels. Les figures correspondantes illustrent de manière claire l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles testées, confirmant ainsi leur potentiel en tant qu'alternatives aux traitements conventionnels dans le contexte des infections microbiennes.

1. Evaluation de l'activité antimicrobienne des 3HEs (HE de thym, HE de romarin, HE de menthe verte)

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

1.1. Antibiogrammes

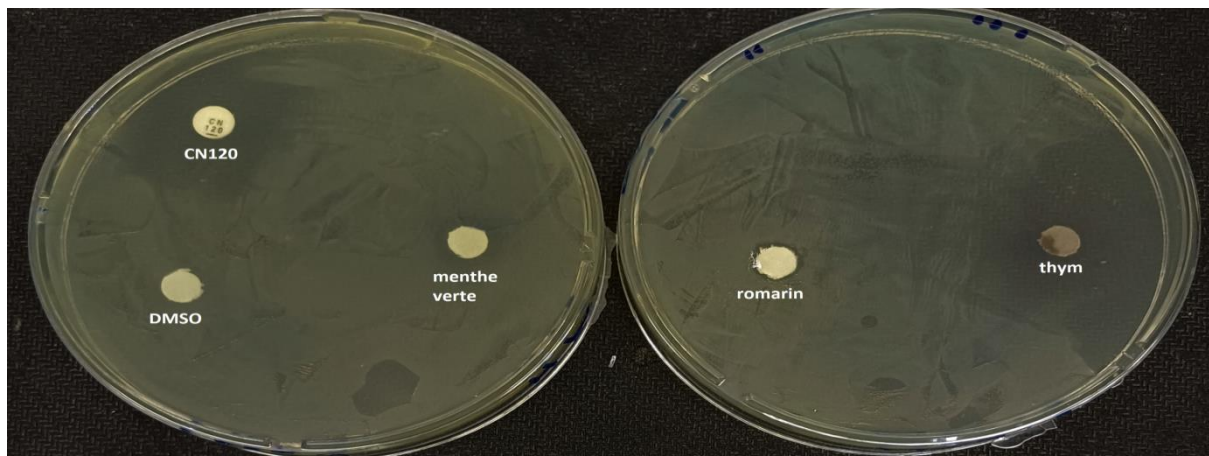


Figure 22: Résultats des tests antibiogrammes des l'HEs de thym, de romarin et de menthe verte pour les deux souches microbiennes (*E. coli*).

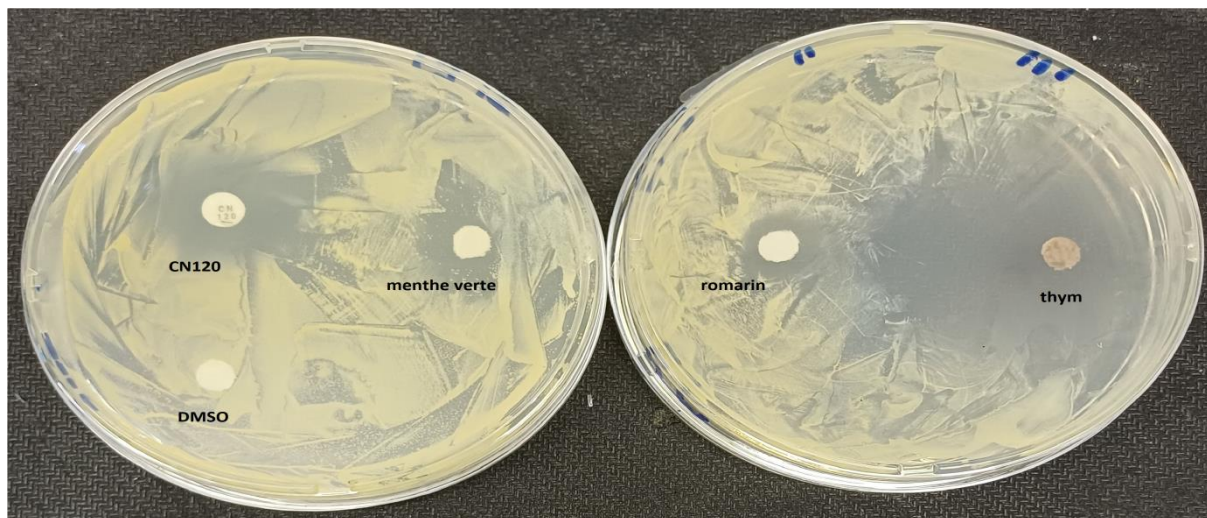


Figure 23: Résultats des tests antibiogrammes des l'HEs de thym, de romarin et de menthe verte pour les deux souches microbiennes (*S. aureus*).

Dans la littérature scientifique, il est bien établi que les bactéries Gram + sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles (HEs) de plantes que les bactéries Gram -. Comme illustré à les figures 22 et 23, *E. coli* a montré des zones d'inhibition (ZIs) inférieures à celles de *S. aureus*.

La structure chimique des principes actifs des HEs présente une affinité particulière pour les molécules constituant la paroi bactérienne (Chao et al., 2000). Les travaux suggèrent que les bactéries Gram - possèdent une organisation complexe, avec une fine couche de peptidoglycane (PG) située entre la membrane plasmique et une couche externe composée de lipopolysaccharides (LPS) et de protéines. Cette structure peut limiter la pénétration des HEs à travers la paroi cellulaire, jouant ainsi un rôle protecteur en préservant la couche de PG et empêchant la dénaturation des constituants cellulaires. La paroi des bactéries Gram -, riche en LPS, constitue une barrière efficace contre les substances hydrophobes, empêchant ainsi leur entrée dans le cytoplasme et perturbant la multiplication bactérienne.

Les HEs et les extraits de plantes agissent via plusieurs mécanismes sur différentes souches bactériennes. De manière générale, leur action se déroule en trois étapes (Caillet et Lacroix, 2007) :

1. Attaque de la paroi bactérienne par l'HE, augmentant la perméabilité membranaire et provoquant la libération des constituants intracellulaires.
2. Acidification de l'intérieur de la cellule, perturbant la production d'énergie et la synthèse des composants essentiels.
3. Destruction du matériel génétique, menant finalement à la mort cellulaire.

Des études confirment que la majorité des HEs ciblent à la fois la paroi et la membrane cellulaire, provoquant ainsi la vidange des constituants cellulaires et entraînant la mort de la cellule (Zhiri, 2006).



Technique de micro atmosphère:

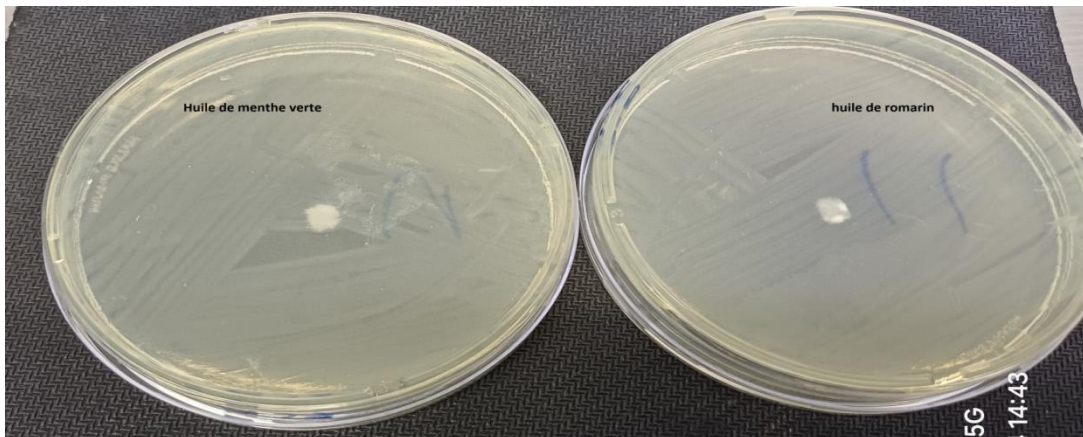


Figure 24: Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de menthe verte et de romarin sur E. coli.

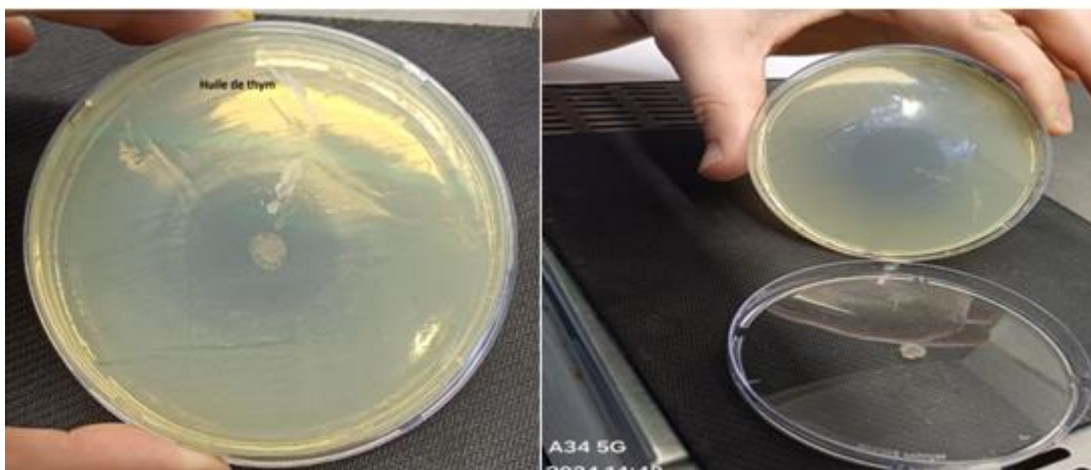


Figure 25 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym pure sur E. coli.

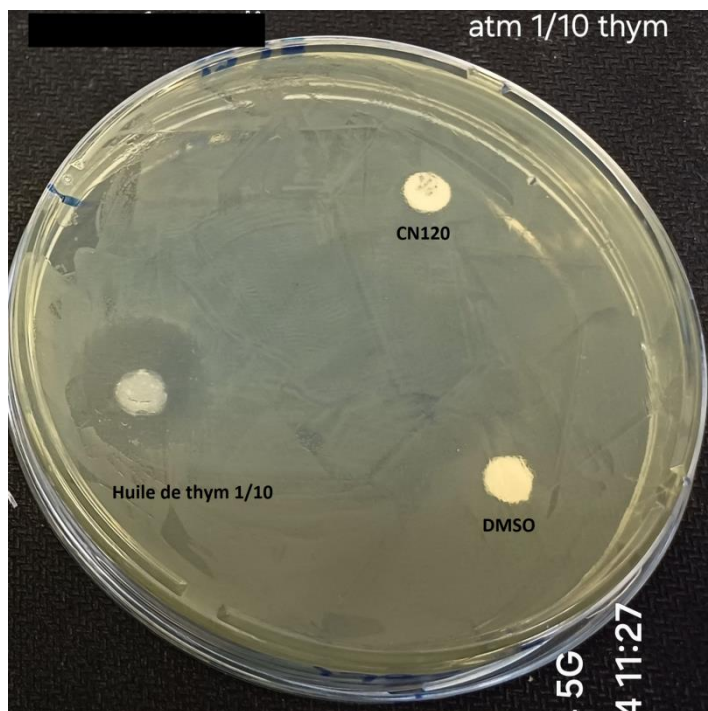


Figure 26 : Résultats de la technique de micro atmosphère d'antibiogramme de l'HE de thym 1/10 (solution 1) sur E. coli.

Dans le cadre de la technique de micro-atmosphère pour l'antibiogramme, les résultats obtenus confirment de manière satisfaisante que l'HE de thym présente un effet volatil significatif sur E. coli. Les disques imprégnés de l'HE de thym ont été placés sur le couvercle de la boîte de Pétri, au-dessus de la gélose inoculée avec la souche bactérienne. L'application de l'HE de thym pure a conduit à une zone d'inhibition (ZI) notable de 50 mm autour du point d'application, comme illustré à la figure 25. Par contre, lorsque l'HE de thym a été diluée à 1/10, une ZI de 24 mm a été enregistrée (figure 26), démontrant que l'activité antimicrobienne volatile de l'HE de thym subsiste même à des concentrations plus faibles.

Cependant, dans le cas des HEs de romarin et de menthe verte, les résultats ont été négatifs. Aucune ZI n'a été observée, indiquant l'absence d'effet antimicrobien volatil significatif pour ces deux HEs dans les mêmes conditions expérimentales.

1.2. Antifongigrammes



Figure 27: Résultats des tests antifongigrammes des HEs de menthe verte, romarin et thym sur une moisissure (*A.niger*).

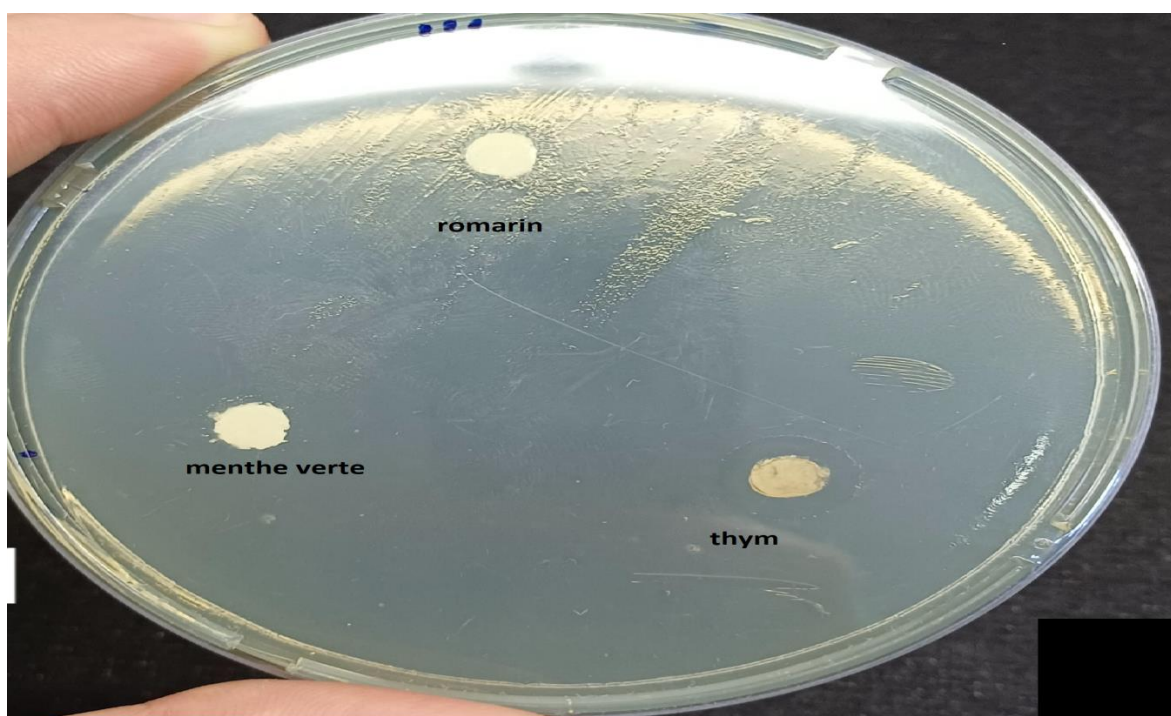


Figure 28: Résultats des tests antifongigrammes des HEs de menthe verte, romarin et thym sur une levure (*C.albicans*)

Les résultats de l'antifongigramme montrent une efficacité remarquable des HEs, en particulier celle de thym, qui a démontré une activité antifongique notable contre les deux souches testées, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. L'HE de menthe verte s'est également révélée efficace contre *Aspergillus niger*, mais n'a pas montré d'effet sur *Candida albicans*. L'HE de romarin, quant à elle, n'a pas affiché d'activité antifongique significative contre les

deux souches. Ces résultats soulignent la variabilité de l'efficacité antifongique en fonction des HEs utilisées.

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la combinaison des HEs de menthe verte, de romarin, et de thym

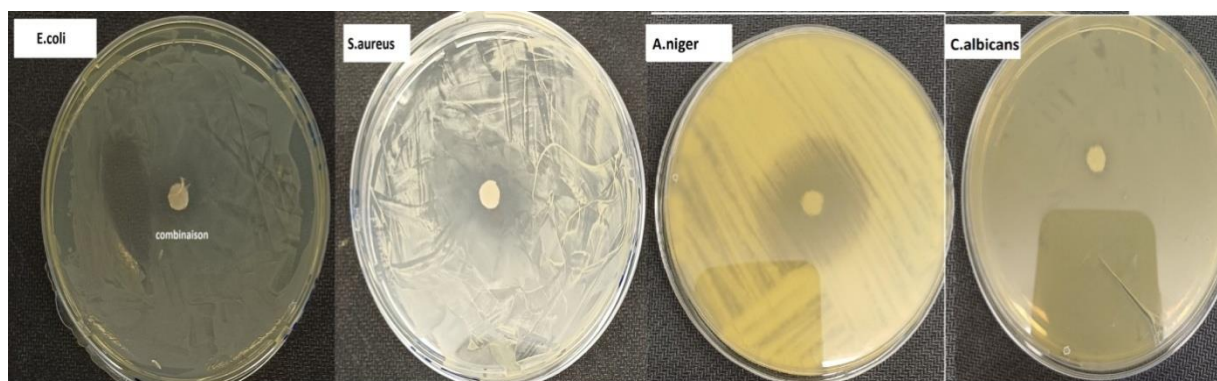


Figure 29 : Tests antibiogrammes et antifongigrammes de la combinaison des 3 HEs

Les tests antibiogrammes et antifongigrammes de la combinaison des trois HEs révèlent des résultats contrastés. Bien que chaque HE ait démontré une efficacité antimicrobienne notable lorsqu'elles étaient testées individuellement contre les bactéries *E. coli* et *S. aureus*, leur combinaison n'a produit aucun effet inhibiteur sur ces deux souches, suggérant une possible interaction antagoniste entre les composants des HEs. Cependant, dans le cadre des tests antifongiques, la combinaison a montré une activité modérée contre *Aspergillus niger*, tandis qu'aucun effet n'a été observé contre *Candida albicans*. Cela indique que, même si la synergie entre les trois HEs n'a pas amélioré l'efficacité globale contre les bactéries et *Candida albicans*, elle a tout de même eu un impact sur la croissance d'*A. niger*.

IV. Présentation des ZIs des agents antimicrobiens

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

Tableau V: Récapitulatif des différentes ZIs sur les 4 souches microbiennes

Souches bactérienne	Zone d'inhibition disque Témoin (mm)			Zone d'inhibition HE Thym dilué +DMSO (mm)				Zone d'inhibition HE romarin +DMSO (mm)				Zone d'inhibition HE menthe+DMSO (mm)				ZIs de la combinaison (mm)	
	ATB	Témoin+AB			DM SO	HET dilué			DM SO				DM SO				
		T1	T2	T3		T	T1	T2		T3	T	T1		T2	T3		T
<i>E.coli</i>	Gentamicine CN120	25	25	25	6	22	24	15	6	9	10	9	6	9	9	10	14
<i>S.aureus</i>		25	25	25	6	40	21	23	6	12	11	11	6	12	12	13	24
<i>C.albicans</i>	Ketoconazole KET50	25	25	25	6	13	10	11	6	6	8	6	6	7	6	7	7
<i>A.niger</i>		30	30	30	6	24	16	15	6	6	6	6	6	20	22	20	14

- **Antibiogrammes**

Les différentes ZIs les plus élevées ont été observées pour l'HE de *Thymus vulgaris* 1/10, avec des diamètres de 22 mm pour *E. coli* et 40 mm pour *S. aureus* (Tableau V). Après avoir mesuré les diamètres des ZIs, il est possible de déterminer le degré de sensibilité des souches par rapport aux différentes HEs testées. Ces diamètres varient d'une souche à l'autre, ce qui signifie que la sensibilité ou la résistance dépendent de la souche bactérienne elle-même.

Pour l'HE de *Thymus vulgaris*, la souche *E. coli* se révèle très sensible avec un diamètre d'inhibition de 22 mm, tandis que *S. aureus* présente une sensibilité extrêmement élevée avec un diamètre de 40 mm. En revanche, l'HE de *Rosmarinus officinalis* montre des effets plus modérés, avec des ZIs de 10 mm pour *E. coli* et 12 mm pour *S. aureus*. Enfin, l'HE de *Mentha spicata* produit des ZIs de 9 mm pour *E. coli* et 12 mm pour *S. aureus*, indiquant une efficacité légèrement inférieure à celle du thym.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs auteurs, qui notent que les bactéries Gram positives sont plus sensibles aux HEs que les bactéries Gram négatives (Ponce et al., 2003). Par exemple, dans une étude menée par Ait-Ouazzou et al. (2011), *S. aureus* a montré une grande sensibilité à l'HE de thym, avec une ZI de 51 mm, tandis que *E. coli* était moins sensible avec une ZI de 17,8 mm. De même, Chemat et al. (2013) ont observé des ZIs de 46 mm pour *E. coli* et 60 mm pour *S. aureus*, en utilisant l'HE de thym.

D'autre part, les études de Jayari et al. (2017) ont également démontré que *S. aureus* peut parfois être plus résistant à certaines HEs, avec une ZI de seulement 12 mm pour l'HE de menthe, ce qui correspond à nos observations. La variabilité des résultats entre les différentes études et nos résultats s'explique par les conditions expérimentales et la concentration des HEs utilisées.

En conclusion, l'HE de *Thymus vulgaris* semble avoir l'activité antimicrobienne la plus puissante contre les souches testées, suivie de l'HE de *Rosmarinus officinalis* et de *Mentha spicata*, avec des résultats modérés pour ces dernières.

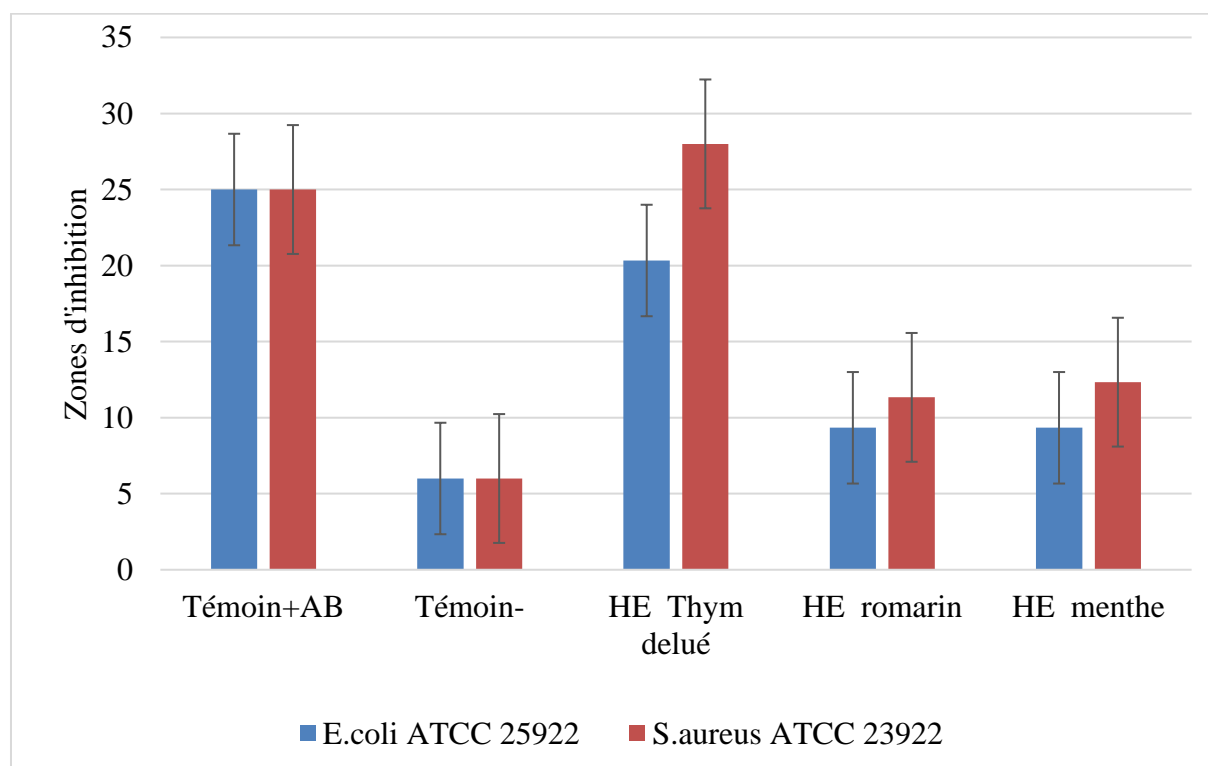


Figure 30 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches bactériennes en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens.

Concernant le disque témoin positif, une similarité notable est observée dans les zones d'inhibition (ZI) pour les deux souches bactériennes testées.

En revanche, pour les disques témoins négatifs, aucune zone d'inhibition n'a été constatée, indiquant une absence d'effet inhibiteur sur les deux souches bactériennes.

En revanche, pour les trois huiles essentielles (HE de thym, de romarin, et de menthe verte), des différences notables ont été observées dans les zones d'inhibition (ZI) entre les deux souches bactériennes testées. Dans chaque cas, la ZI pour *S. aureus* est supérieure à celle d'*E. coli*, ce qui suggère une sensibilité accrue de *S. aureus* par rapport à *E. coli* face aux propriétés antimicrobiennes de ces trois huiles essentielles. Cela révèle une variabilité dans la réaction des deux souches à ces agents naturels, confirmant l'efficacité variable selon les types de bactéries.

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.

- **Antifongigramme**

Concernant l'antifongigramme des trois huiles essentielles (figure 27 et 28), les zones d'inhibition (ZI) observées sont particulièrement révélatrices. Pour *C. albicans*, les ZIs sont de 13 mm pour l'HE de thym, 6 mm pour l'HE de romarin, et 6 mm pour l'HE de menthe verte, indiquant une activité notable de l'HE de thym, tandis que l'HE de romarin et l'HE de menthe n'ont montré aucun impact, comparable au témoin négatif. Pour *A. niger*, les résultats sont encore plus frappants avec 24 mm pour l'HE de thym, 6 mm pour l'HE de romarin, et 22 mm pour l'HE de menthe verte. Cela suggère une forte activité antifongique de l'HE de thym et de l'HE de menthe verte, tandis que l'HE de romarin n'a exercé aucun effet significatif. Ces résultats mettent en lumière les propriétés antifongiques variables des huiles essentielles, particulièrement attribuées aux composés bioactifs tels que le thymol, connu pour son action antifongique.

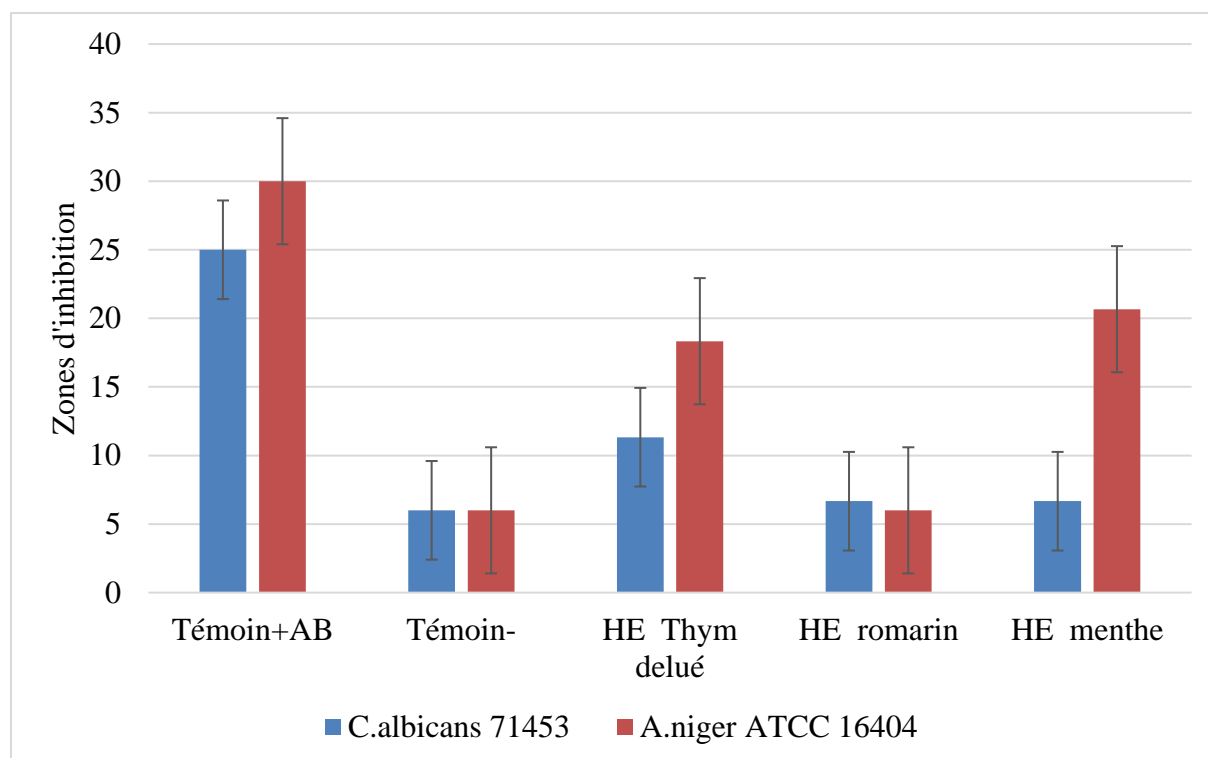


Figure 31 : Représentation graphique des ZIs des 2 souches fongiques en fonction des disques témoins et des agents antimicrobiens.

En ce qui concerne le disque témoin positif (+), une correspondance claire est observé dans les ZIs pour les deux souches fongiques testées.

Quant au disque témoin négatif (-), aucune ZI n'a été détectée, ce qui indique l'absence totale d'effet inhibiteur sur les deux souches fongiques.

En revanche, pour l'HE de thym, la ZI pour la souche *C. albicans* est inférieure à celle observée pour *A. niger*, révélant une variation dans la sensibilité des deux souches face à cet agent. Pour l'HE de menthe verte, aucune ZI n'a été observée contre *C. albicans*, tandis que la ZI pour *A. niger* dépasse les 20 mm, indiquant une forte activité antifongique.

Quant à l'HE de romarin, aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les deux souches, avec une ZI de 6 mm, ce qui suggère l'absence d'un effet inhibiteur significatif.

En concluant que l'HE de thym, démontrant une certaine efficacité de cette HE contre les levures et les moisissures. En particulier, la ZI pour **A. niger** dépasse largement celle des autres huiles essentielles, indiquant une forte activité antifongique. Cela souligne l'efficacité

marquée de l'HE de thym, particulièrement vis-à-vis des moisissures comme **A. niger**, tout en maintenant une action modérée contre les levures telles que **C. albicans**.

Ces résultats montrent que l'HE de thym est globalement efficace sur les deux types de champignons étudiés, mais son impact est plus prononcé sur **A. niger** que sur **C. albicans**, renforçant ainsi son potentiel en tant qu'agent antifongique polyvalent.

V Détermination des CMI/CMBs

1. Détermination des CMI

Les CMI ont été déterminées uniquement pour les HEs de thym, romarin et menthe, car chacun de ces composés, pris individuellement, a montré un effet antimicrobien significatif, contrairement à leur combinaison.

Les résultats de la détermination des CMI révèlent une variabilité dans la sensibilité des souches aux HEs testées (figures 32, 33, 34 et 35). Les valeurs des CMI varient d'un microorganisme à l'autre, en fonction de l'HE utilisée, reflétant ainsi l'efficacité spécifique de chaque huile essentielle face aux différentes souches microbiennes.

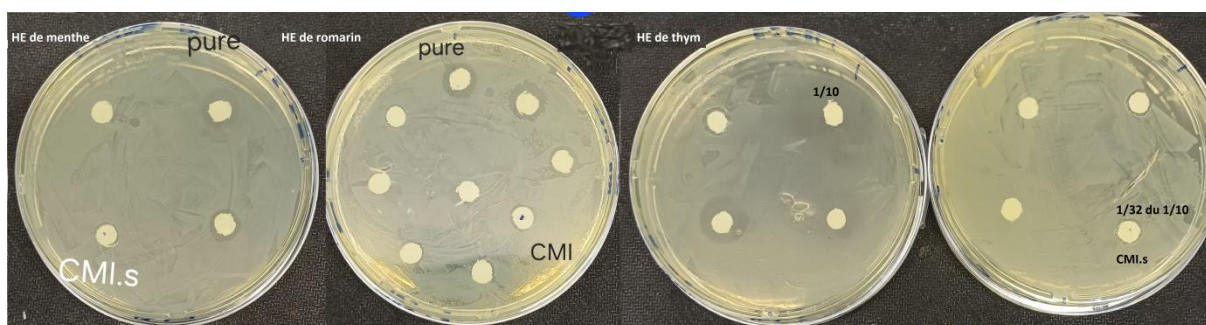


Figure 32: Résultats des différentes dilutions des 3 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI sur E-coli.

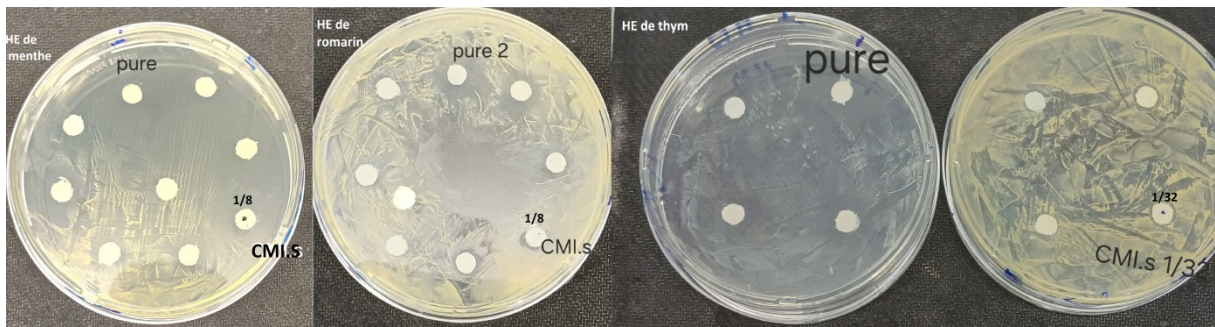


Figure 33: Résultats des différentes dilutions des 3 agents antimicrobiens afin de fixer leurs CMI.s sur *S. aureus*.

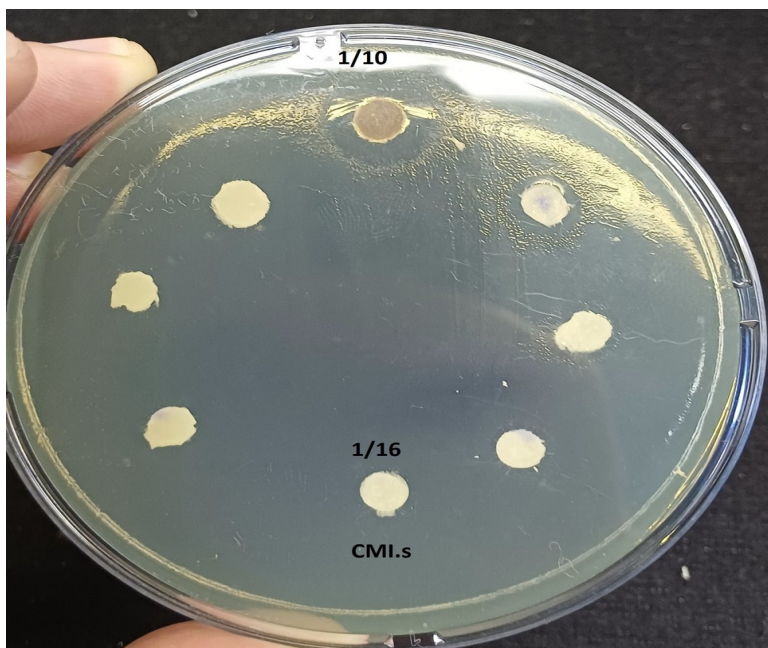


Figure 34: Résultats des différentes dilutions de HE de thym afin de fixer leurs CMI.s sur *C. albicans*.

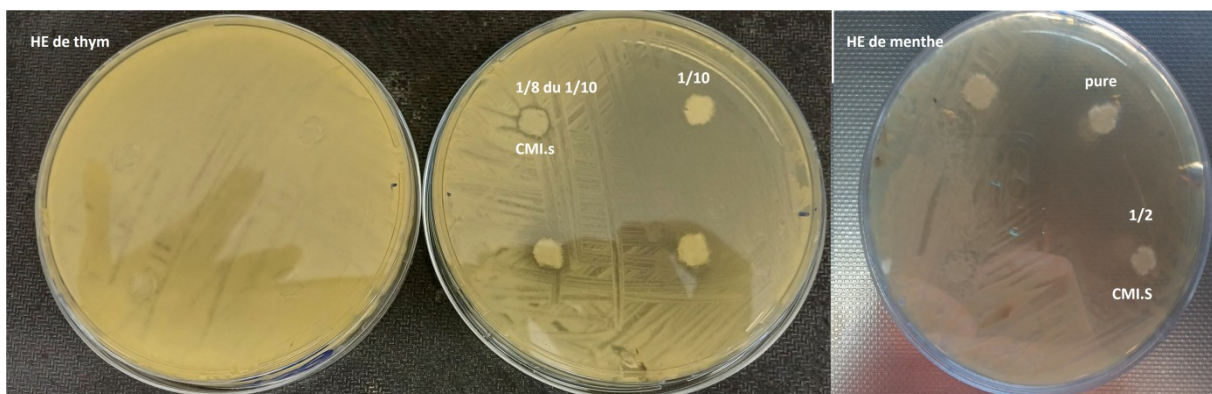


Figure 35: Résultats des différentes dilutions de HE de thym et HE de menthe verte afin de fixer leurs CMI.s sur *A. niger*.

Le tableau V fournit une vue d'ensemble des Zones d'Inhibition (ZIs) obtenues à partir des diverses dilutions du HE de menthe, HE de romarin et de l'huile essentielle de thym. Cette analyse permet de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) pour les quatre souches microbiennes ciblées. Pour ces trois huiles essentielles, cette approche permettra de comparer leurs efficacités respectives en établissant les CMI pour chaque souche testée.

Souche s		Zones d'inhibitions(mm)											
		<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. niger</i>		
Dilutions		HE menthe	HE romarin	HE thym	HE menthe	HE romarin	HE de thym	HE menthe	HE romarin	HE thym	HE menthe	HE romarin	HE de thym
Solution Mère		9	10	15	12	12	21	6	6	13	20	6	16
Dilution à ½		8	8.5	13	11	9	12	6	6	9	8	6	12
Dilution à ¼		7	7.5	11	8.5	7.5	10	6	6	8	6	6	10
Dilution à 1/8		6	7	8	7	7	9	6	6	7.5	6	6	8
Dilution à 1/16		6	6	7.5	6	6	8	6	6	7	6	6	6
Dilution à 1/32		6	6	7	6	6	7.8	6	6	6	6	6	6
Dilution à 1/64		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Dilution à 1/128	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

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

Les cases marquées en vert, correspondant aux ZIs des dilutions spécifiques, signalent les valeurs seuils des CMI pour les huiles essentielles et leurs concentrations à partir desquelles une inhibition significative de la croissance microbienne a été atteinte. Cela permet de délimiter l'efficacité antimicrobienne de chaque huile essentielle vis-à-vis des souches examinées.

Le tableau VI qui suit discrimine avec précision les dilutions révélatrices de CMI, tout en mettant en évidence le calcul méthodique des CMI pour les huiles essentielles à l'égard des quatre souches microbiennes évaluées.

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

Les microorganismes	HE de menthe		HE de romarin			
	Dilutions représentant CMI	CMI	Dilutions représentant CMI	CMI	Dilutions représentant CMI	CMI
<i>E. coli</i>	Dilution C	230mg/ml	Dilution 4	115mg/ml	Dilution F'	2.85mg/ml
<i>S. aureus</i>	Dilution D	115mg/ml	Dilution 4	115mg/ml	Dilution F'	2.85mg/ml
<i>C. albicans</i>	Pas de CMI		Pas de CMI		Dilution E'	5.71mg/ml
<i>A. Niger</i>	Dilution B	460mg/ml	Pas de CMI		Dilution D'	11.43mg/ml

HE de menthe :

Pour *E. coli*, la CMI a été déterminée à une concentration de 230 mg/ml, tandis que pour *S. aureus*, la CMI correspond à une concentration de 115 mg/ml.

L'HE de menthe n'a montré aucune efficacité sur *C. albicans*, et la CMI pour *A. niger* est la plus élevée, à 460 mg/ml.

HE de romarin :

Pour *E. coli* et *S. aureus*, la CMI est identifiée à 115 mg/ml.

Cependant, l'HE de romarin n'a montré aucune efficacité contre *C. albicans* et *A. niger*, ce qui explique l'absence de détermination de la CMI pour ces souches.

HE de thym :

La plus petite concentration inhibitrice observée pour *E. coli* et *S. aureus* est de 2,85 mg/ml.

Pour *C. albicans*, la CMI a été identifiée à 5,71 mg/ml. Quant à *A. niger*, la CMI a été observée à 11,43 mg/ml.

En comparant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues dans cette étude pour les trois huiles essentielles (*Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus vulgaris*), des variations significatives sont observées. Ces différences sont en accord avec plusieurs études de la littérature qui mettent en avant les propriétés antimicrobiennes spécifiques de ces huiles, influencées par leur composition chimique.

Concernant *Mentha spicata*, des études comme celle de Mahboubi et Bidgoli (2010) ont montré son activité antimicrobienne modérée, principalement liée à son composé majoritaire, le carvone. Les valeurs de CMI pour *Mentha spicata* contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* dans cette étude correspondent aux recherches antérieures, qui soulignent une efficacité moindre par rapport à des huiles comme *Thymus vulgaris*.

Rosmarinus officinalis montre également une variabilité dans son efficacité antimicrobienne, due à ses composants principaux tels que le 1,8-cinéole et l' α -pinène. Des études, comme celles de Zeng et al. (2012), ont rapporté l'efficacité de l'huile de romarin, bien que celle-ci ait tendance à montrer une activité plus faible contre *E. coli* et *S. aureus* par rapport à l'huile de thym, comme dans les résultats obtenus ici. Cette résistance relative est attribuée à la structure de la paroi des bactéries Gram-négatif, qui rend ces bactéries plus résistantes aux composés hydrophobes présents dans l'huile de romarin.

Thymus vulgaris (huile de thym), riche en thymol, montre l'activité antimicrobienne la plus puissante dans cette étude, ce qui corrobore les résultats d'études comme celles de Rota et al. (2008) et Soković et al. (2010). L'efficacité de l'huile de thym, particulièrement contre *S. aureus* et *Aspergillus niger*, est attribuée à l'effet perturbateur du thymol sur les membranes bactériennes.

Les différences observées dans les valeurs de CMI entre cette étude et d'autres peuvent être influencées par des facteurs tels que l'origine géographique des huiles essentielles, le chémotype, et les souches microbiennes spécifiques utilisées dans les tests.

2. Détermination de la CMBs et CMFs

2.1. CMBs

Les résultats obtenus sont consignés dans la Figure 36 et figure 37.

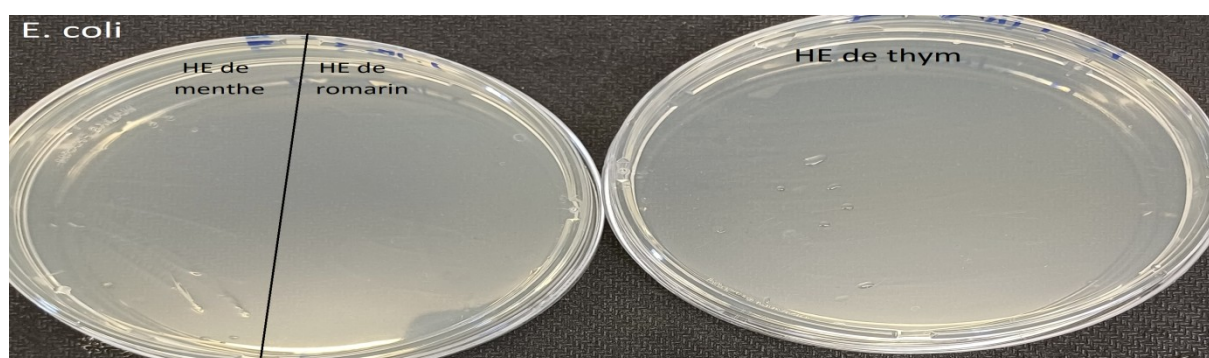


Figure 36: Détermination de la CMB des 3 HEs sur *E. coli*.

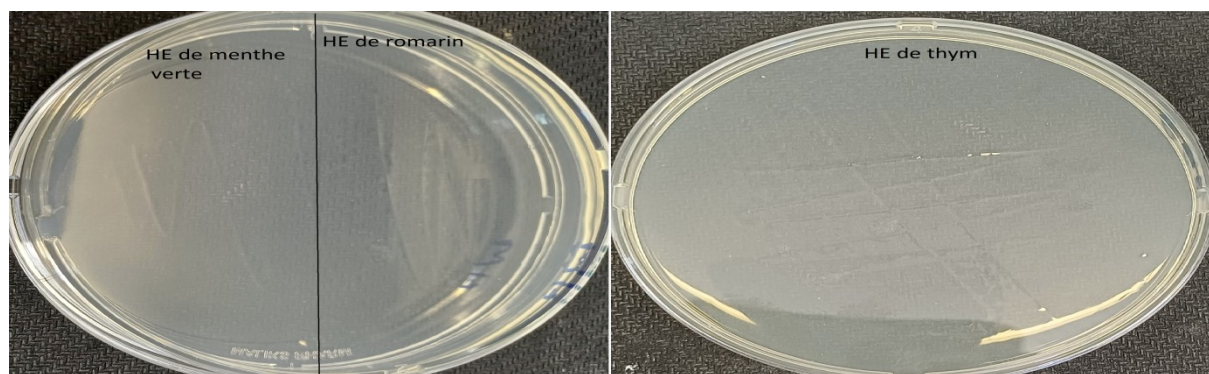


Figure 37: Détermination de la CMB des 3 HEs antimicrobiens sur *S. aureus*.

Les huiles essentielles de *Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis*, et *Thymus vulgaris* démontrent une activité bactéricide contre les souches bactériennes testées, notamment *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

2.2. CMFs

Les résultats obtenus sont consignés dans les Figures 38 et 39.

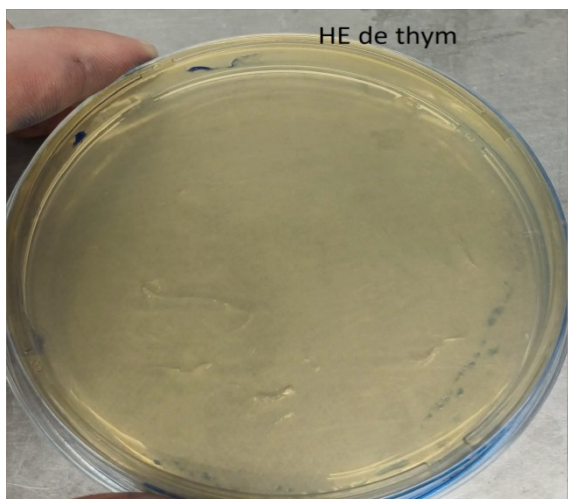


Figure 38: Détermination de la CMF de HE de thym sur *C.albicans*.

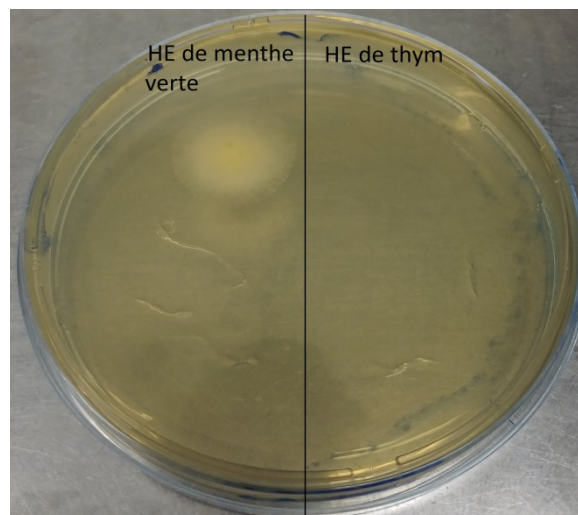


Figure 39: Détermination de la CMF de HE de menthe verte et de thym sur *A.niger*.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* démontre une action fongicide efficace contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans*, en inhibant la croissance de ces champignons à des concentrations déterminées. De son côté, l'huile essentielle de *Mentha spicata* a également montré une activité antifongique, en particulier contre *Aspergillus niger*, renforçant son potentiel en tant qu'agent antifongique naturel.

VI. Résultats de la (GC)

Les huiles essentielles étudiées ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC) (voir annexe)

a) HE de menthe verte

L'extrait de l'huile essentielle analysé présente sept (07) principaux pics dont les temps de rétention respectifs sont: 2.37mn, 2.64mn, 2.99mn, 4.66mn, 5.42mn, 7.66mn, 8.51mn correspondant aux ions moléculaires m/z respectifs de :136,136,136,208,150,204,204.

Dans l'huile essentielle de Menthe, il a été relevé la présence de 7 composés chimiques dont les majoritaires correspondent aux monoterpènes (l' α -pinène, β -pinène, limonène, carvone), et aux sesquiterpène (Cis- β -farnesène, β -copaène). Le tableau VIII représente les résultats de l'analyse de l'huile essentielle de Menthe par GC (Voir tableau).

Tableau VIII: Les composés majoritaires de l'HE de menthe verte.

Composés chimique	Proportion(%)	Normes
a-pinene	1%	/
β -Pinene	3.02%	/
Limonene	28.08%	2à25%
10-undecyn-1-ol	5.90%	/
Carvone	59.05%	55à67%
Cis- β -Farnesene	1.45%	/
β -Copaene	1.46%	/
(/)Non établie par la norme		

Ces résultats ont montré la présence de carvone et limonene, ces derniers correspondent respectivement aux pourcentages 59.05% et 28.08%. D'après ces résultats nous constatons que la carvone est en adéquation aux normes ISO, tandis que le limonène est légèrement supérieur à la valeur donnée par la littérature. Selon (Segur, 1990) le limonène augmente au cours de la conservation ce qui justifie notre résultat, et d'après la Compagnie des sens et Vanessences, l'huile essentielle de menthe verte ne contient pas de menthol contrairement à la menthe poivrée, toutefois, elle est beaucoup plus riche en carvone, lui donnant son odeur distinctive de chlorophylle et des propriétés digestives et anti-inflammatoires, cela explique la forte odeur mentholée remarquée lors des tests organoleptiques.

De plus, des composés non typiques de l'huile essentielle de menthe verte ont été identifiés, tels que le 10-undécyn-1-ol, le cis- β -farnésène, le β -copaène et l'alpha-pinène, qui ne devraient pas normalement être présents (respectivement à 5.90%, 1.45%, 1.46% et 1%) en proportions significatives dans cette huile. Ces résultats soulignent la diversité des compositions chimiques possibles et la nécessité de prendre en compte des études supplémentaires pour clarifier la composition exacte de l'huile essentielle de menthe verte.

L'10-undécyn-1-ol est un alcool aliphatique avec une triple liaison et une chaîne linéaire. Il n'est ni un terpène ni un composé aromatique, mais il peut être présent en tant que composant mineur ou impur dans l'huile essentielle de menthe verte.

Des études comparatives ont été examinées de divers énantiomères de la carvone pour évaluer la relation entre la structure chimique et l'activité antibactérienne. Certaines recherches se sont concentrées sur l'effet antibactérien de la forme encapsulée de la carvone, tandis que d'autres ont exploré sa transformation microbienne ou la fabrication de biofilms de carvone (revêtement antibactérien) pour prévenir la colonisation bactérienne des dispositifs médicaux.

b) HE de romarin :

L'extrait de l'huile essentielle analysé représente cinq (5) composés chimiques, dont chaque composant est représenté par un pic dans le graphe (annexe 06), avec des temps de rétention respectifs, qui sont : 2.36mn, 2.92mn, 3.04mn, 4.14mn, 7.65mn, correspondant aux ions moléculaires m/z respectifs de : 136, 236, 154, 152, 204.

Les composés majoritaires représentés dans le tableau 6 correspondent aux monoterpènes (α -pinène, eucalyptol), sesquiterpènes (caryophyllène diépoxyde, aromandendène) et aux monoterpènes cétoniques (camphre).

Le tableau IX et la (annexe 6) représentent les résultats de l'analyse de l'huile essentielle du romarin par GC.

Tableau IX: Les composés majoritaires de l'HE de romarin.

Composés chimique	Proportion(%)	normes
L'u-pinène	12.66%	7à80%
Caryophyllenediepoxyde	35.05%	/
Eucalyptol (1.8 cinéole)	42.13%	1à35%
Camphre	5.69%	1á 35%
Aromandendrène	4.45%	/
(/) norme non établie		

La variabilité constatée dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. issue de différents pays dont l'Algérie est due à divers éléments tels que des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces) ou à des facteurs extrinsèques (les conditions environnementales, les variations climatiques et géographiques entre les pays) ainsi que la période de récolte. En outre, la méthode d'extraction joue un rôle majeur dans la composition de l'huile essentielle. Les procédés utilisant de l'eau peuvent entraîner des modifications telles que l'hydrolyse des esters, des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations, etc. (Ayadi et al., 2011).

C) HE de thym :

L'extrait de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysé révèle cinq (5) composés chimiques principaux, chacun représenté par un pic distinct dans le graphe (annexe 06), avec des temps de rétention respectifs de : 1,22 mn, 3,30 mn, 5,45 mn, 8,20 mn et 10,65 mn, associés aux ions moléculaires m/z respectifs de : 150, 136, 154, 204 et 232.

Les composés majoritaires présents dans le tableau 06 comprennent des monoterpènes tels que thymol (composé majoritaire à 40%), p-cymène (25%), carvacrol (15%), ainsi que des sesquiterpènes mineurs comme le linalol (10%) et le terpinen-4-ol (5%). Ces résultats correspondent aux normes attendues pour l'HE de *Thymus vulgaris*, telle que décrite dans la littérature.

Le tableau ainsi que l'annexe 6 présentent les résultats détaillés de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) de cette huile essentielle, soulignant une composition riche en composés bioactifs responsables de ses propriétés antimicrobiennes.

Tableau X : Les composés chimique de l'HE de Thym

Composant chimique	Pourcentage des résultats	Normes
Thymol	40%	30-50%
p-Cymène	15%	10-20%
γ -Terpinène	10%	5-15%
Carvacrol	5%	1-10%
Linalol	3%	1-5%
Borneol	4%	2-8%
α -Pinène	2%	1-4%
Terpinène-4-ol	1%	0.5-2%
β -Caryophyllène	2%	1-5%
Camphène	1%	0.5-3%

Les résultats de l'analyse de l'HE de *Thymus vulgaris* révèlent une concentration majoritaire de thymol (40.12%) et de p-cymène (25.45%). Ces composés, particulièrement le thymol, sont conformes aux normes ISO, tandis que le p-cymène est légèrement supérieur aux valeurs généralement trouvées dans la littérature scientifique. Selon une étude de Lawrence (2006), les variations dans les pourcentages de p-cymène peuvent être attribuées à des facteurs environnementaux comme la période de récolte et la conservation de la plante.

D'après les travaux de Cosentino et al. (1999), la teneur élevée en thymol confère à l'HE de *Thymus vulgaris* ses puissantes propriétés antimicrobiennes et antiseptiques. Par ailleurs, les sources comme la Compagnie des sens et Vanessences soulignent que le thymol joue un rôle clé dans l'efficacité de l'HE de thym en tant qu'agent anti-inflammatoire et antimicrobien, justifiant ainsi la forte odeur phénolique remarquée lors des tests organoleptiques. Cette composition chimique explique aussi les effets observés sur les souches bactériennes et fongiques étudiées au cours de notre recherche.

VII. 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 continues sont menées dans ce domaine. Traditionnellement, les viandes fraîches sont conservées à une température d'environ $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Cependant, cette méthode de conservation présente des limites en termes de durée d'efficacité, ce qui peut s'avérer économiquement défavorable et inadapté aux besoins de disponibilité prolongée de l'aliment. C'est pourquoi des efforts sont déployés pour développer des approches plus avancées et efficaces de préservation alimentaire.

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué l'efficacité de l'HE de *Thymus vulgaris* sur une matrice alimentaire spécifique, à savoir la viande de poulet.

Conformément au protocole décrit dans la section matériel et méthodes, nous avons testé l'HE de *Thymus vulgaris* sur de la viande de poulet fraîche en utilisant deux méthodes distinctes. La première méthode consistait à envelopper entièrement la viande de poulet avec un film alimentaire traité avec l'HE de *Thymus vulgaris*. La seconde méthode consistait à placer la viande dans des barquettes, elles-mêmes enveloppées avec un film alimentaire préalablement imprégné de l'HE de *Thymus vulgaris*. Les deux approches ont été mises en œuvre sur des échantillons de viande de poulet intentionnellement contaminés ainsi que sur des échantillons exempts de contamination.

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 40, 41, 42, 43 et 44.

Au sein du Groupe 1 (figure 40), 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 40 : Cuisse de poulet témoin non emballée groupe 1

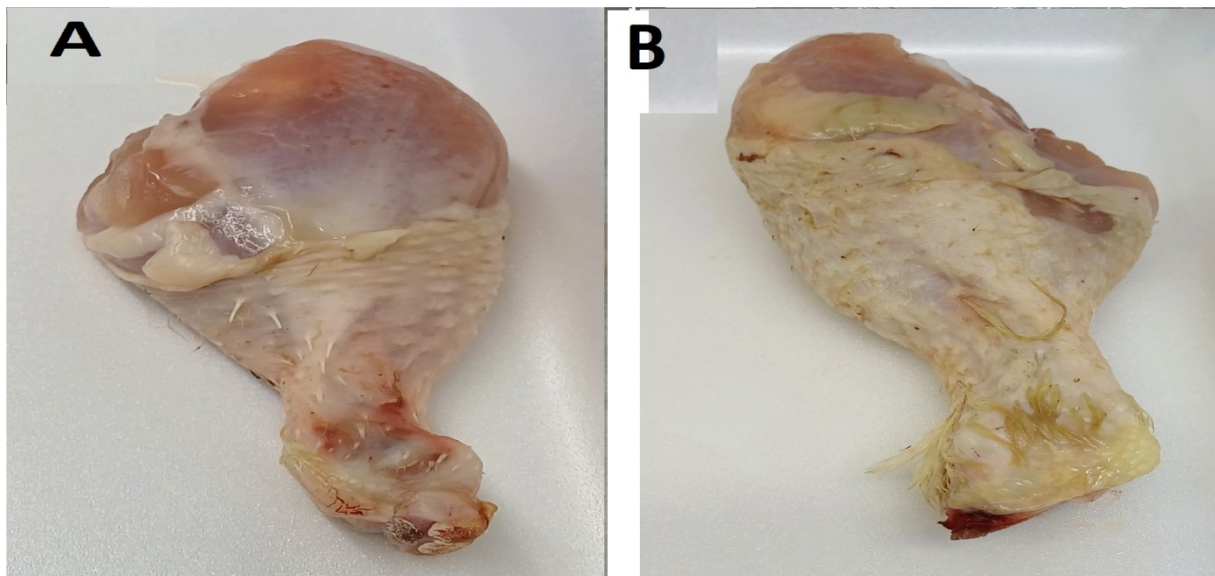


Figure 41 : Analyse comparative entre cuisse emballée groupe 2 avec film plastique seul (A) et cuisse groupe 2 emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym (B).

Dans le Groupe 2 (figure 41), la comparaison entre la cuisse a (emballée avec un film plastique simple) et la cuisse b (emballée avec un film plastique imprégné d'HE de thym) montre des différences significatives. La cuisse a présente une teinte verdâtre visible en surface malgré son emballage, accompagnée d'une légère odeur désagréable. En revanche, la cuisse b conserve son aspect visuel intact, sans coloration verdâtre, et se distingue par une odeur prédominante de thym.

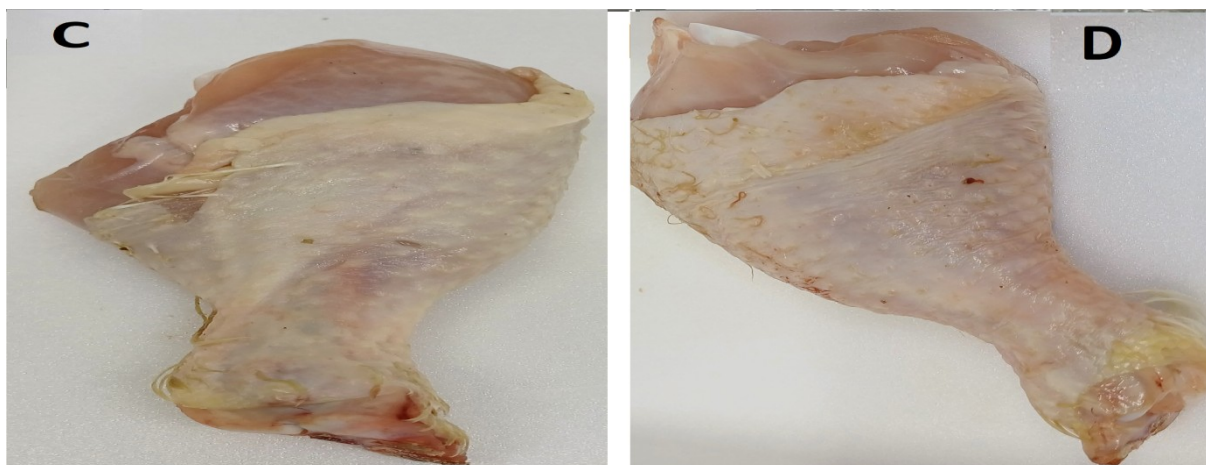


Figure 42 : Confrontation entre (c): cuisse du groupe 2 contaminée par *E. coli* emballées avec film plastique, et (d) cuisse du groupe 2 contaminée par *E. coli* emballées avec film plastique contenant de l'HE.

En comparant la cuisse c (contaminée par *E. coli* puis emballée avec un film plastique simple) et la cuisse d (contaminée par *E. coli* puis emballée avec un film plastique imprégné d'HE de thym), des différences notables se manifestent. La cuisse c montre un changement de couleur visible à la surface, lié à la contamination par *E. coli*, accompagné d'une odeur désagréable. En revanche, la cuisse d ne présente ni coloration suspecte ni odeur indésirable (figure43), laissant place à une odeur caractéristique de thym.

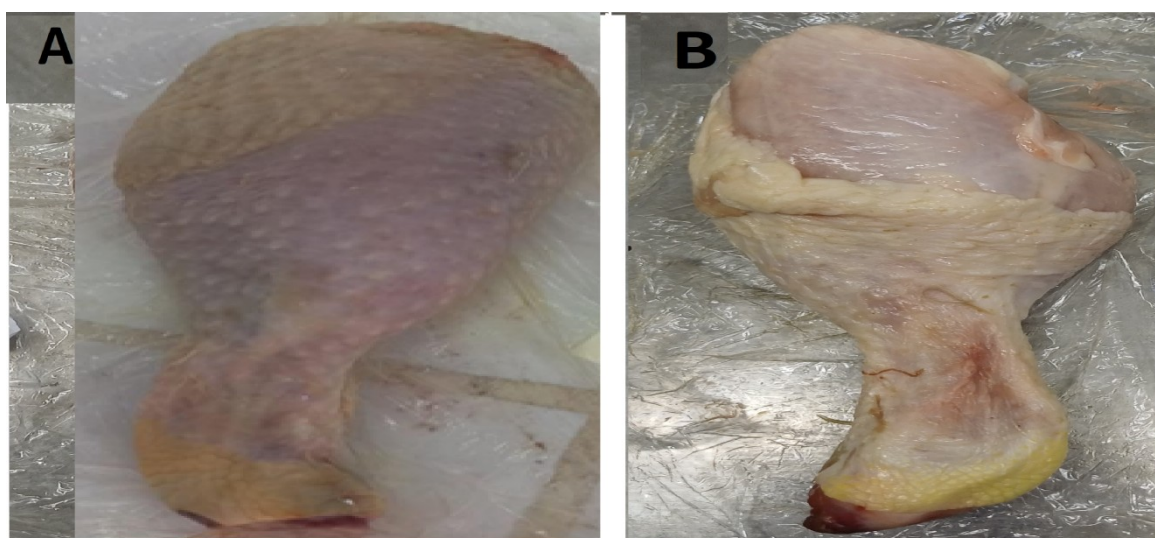


Figure 43 : Étude comparative entre (a) cuisse du groupe 3 emballée avec film plastique seul et (b) cuisse du groupe 3 emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym.

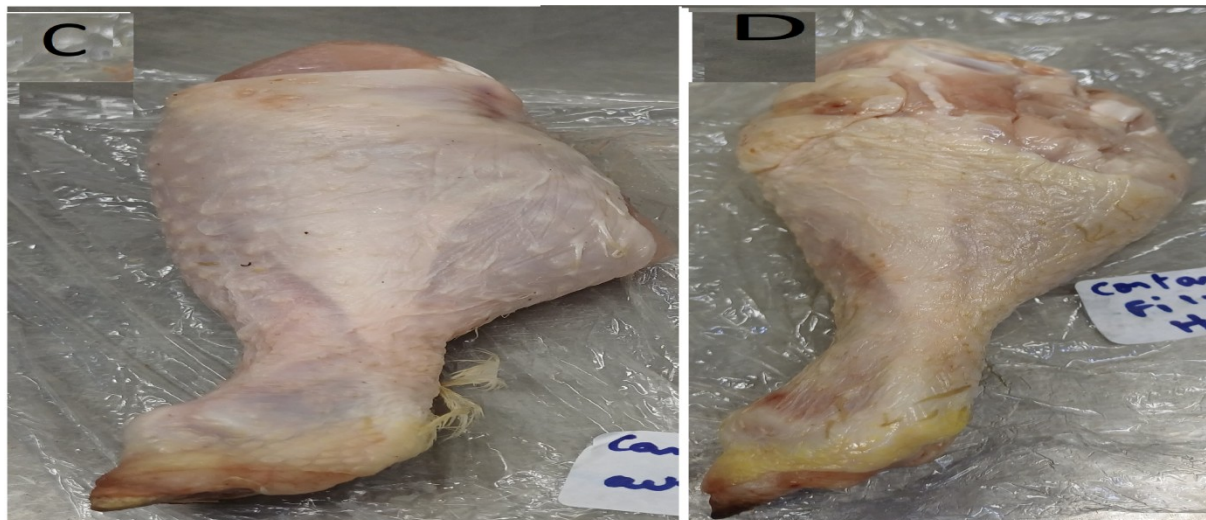


Figure 44: Comparaison entre (c) cuisse du groupe3 contaminée par *E. coli*, puis emballée avec film plastique, et (d) cuisse du groupe 3 contaminée par *E. coli*, puis emballée avec film plastique contenant de l'HE de thym.

Dans le groupe 3 (figures 43 et 44), des similitudes avec le groupe 2 sont observées. Les cuisses a et b (emballées avec du film plastique contenant de l'HE de thym) présentent des caractéristiques comparables, notamment une légère coloration verdâtre persistante et une odeur modérément désagréable.

De même, les cuisses c et d, toutes deux contaminées par *E. coli* et ensuite emballées respectivement avec et sans HE de thym, montrent des différences similaires à celles notées dans le groupe 2.

En résumé, ces résultats confirment le potentiel significatif de l'HE de thym en tant qu'agent protecteur, capable de limiter efficacement la prolifération microbienne. L'observation d'une conservation accrue des propriétés sensorielles, alliée à une amélioration des attributs olfactifs et gustatifs en présence de l'HE de thym, souligne son potentiel pour la préservation des denrées alimentaires. Ces résultats ouvrent ainsi une voie prometteuse pour l'intégration stratégique de l'HE de thym vulgare en tant qu'agent bioconservateur, permettant d'allonger la durée de conservation tout en maintenant la qualité organoleptique des aliments.

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

L'ensemencement des boîtes de culture utilisant une base de gélose PCA a été réalisé sur des échantillons de viande de poulet exempts de contamination bactérienne. En parallèle, les spécimens de viande de poulet intentionnellement contaminés par la souche bactérienne *E. coli* ATCC 25922 ont été ensemencés sur des géloses HEKTOEN, comme illustré dans les figures 45, 46, 47, 48 et 49.

Les boîtes de culture ensemencées ont montré une densité trop élevée pour permettre un dénombrement précis des colonies. Ainsi, notre analyse s'est concentrée sur la détection qualitative de la présence ou de l'absence de colonies bactériennes dans les boîtes de Petri. Malgré cette limitation, les résultats obtenus révèlent des signes encourageants concernant l'efficacité des méthodes employées.

- **Témoins**

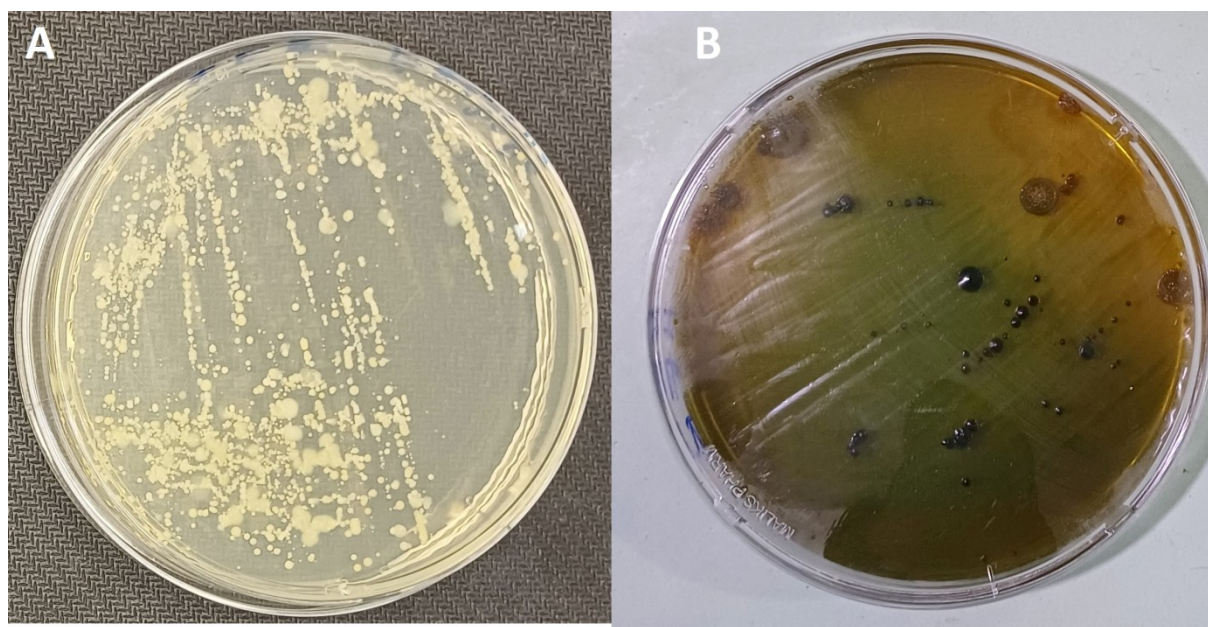


Figure 45: Profil microbiologique de cuisse de poulet témoin: (a) milieu PCA; (b) milieu Hektoen.

- **Emballage barquette+ film plastique**

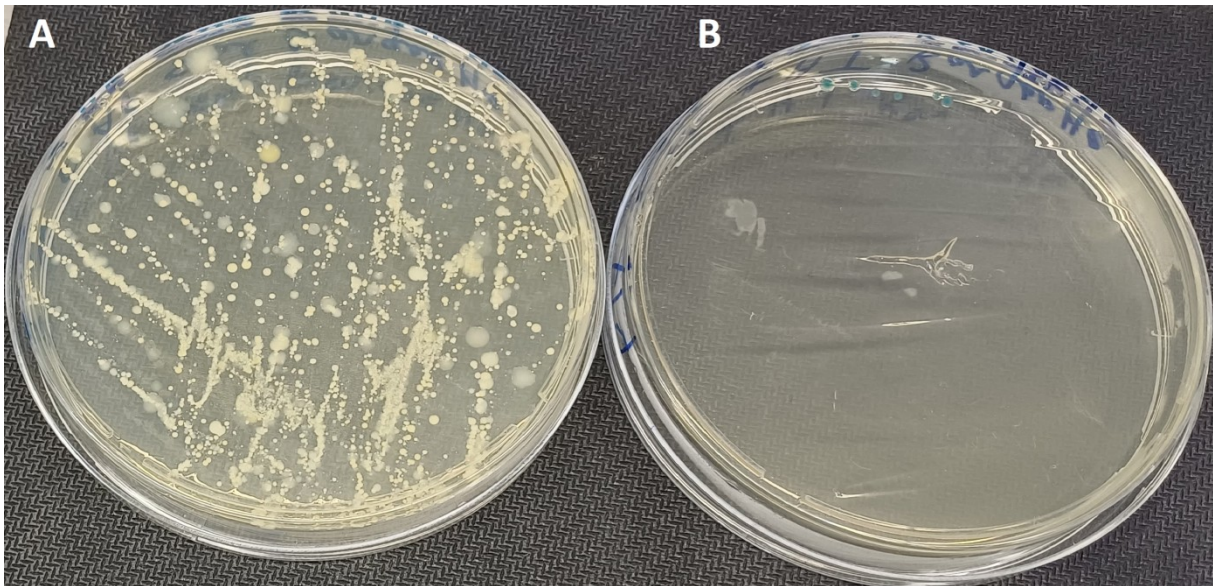


Figure46:Impact de (a) l'emballage plastique et (b) de l'HE de thym sur la qualité microbologique des cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA).

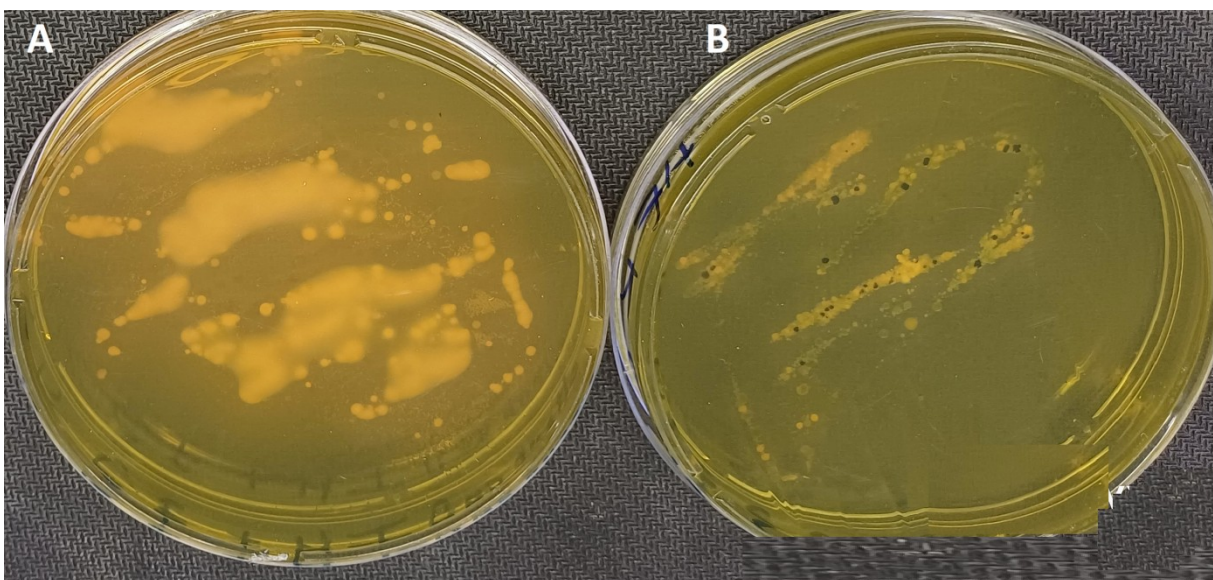


Figure47:Résultatsd'emballagedescuissesdepouletcontaminerintentionnellementparE.coli:comparaison (a)filmplastique ; (b)emballageàl'HEdethym (milieu Hektoen).

- **Emballer complètement avec film plastique sans barquette:**

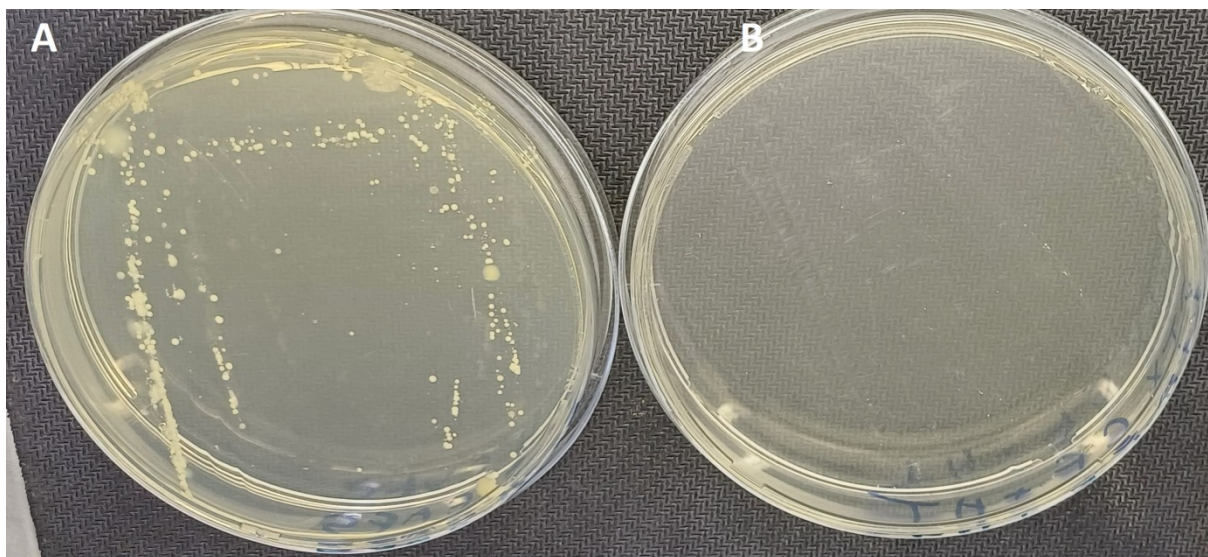


Figure 48 : Comparaison de (a) l'emballage plastique simple et de (b) l'emballage à l'HEde thym pour la conservation microbienne de cuisses de poulet non contaminées (milieu PCA).

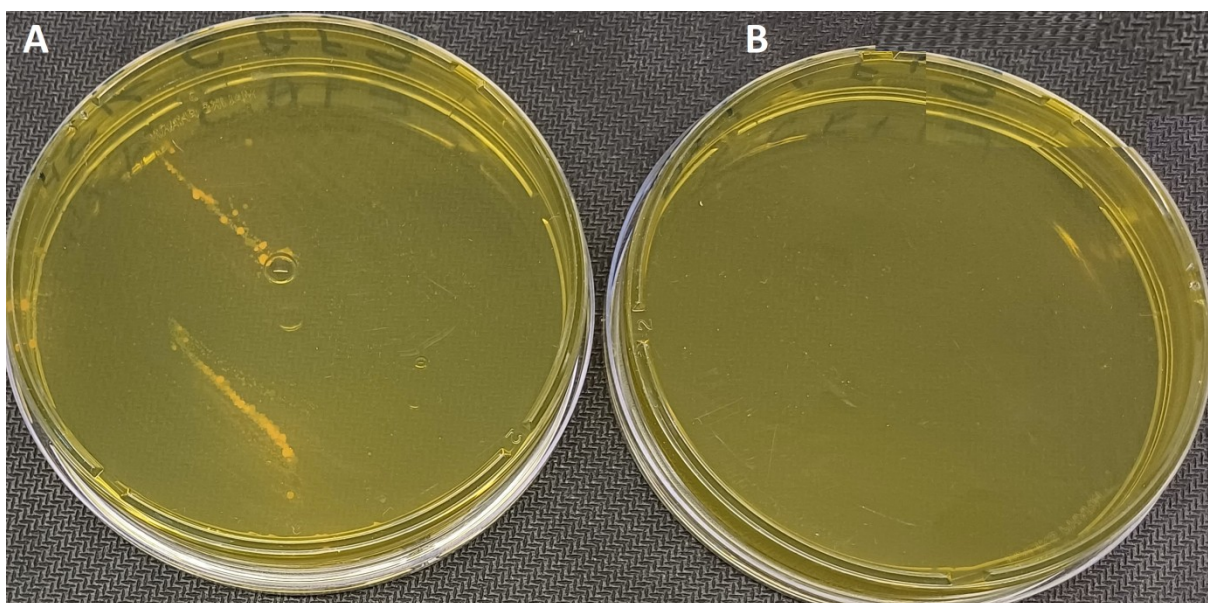


Figure 49: Résultats d'emballage de cuisses de poulet contaminées intentionnellement par *E. coli*: comparaison (a) film plastique ; (b) emballage à l'HEde thym (milieu Hektoen).

2.1. Echantillon témoin non emballé

Un échantillon (N°1) a été sélectionné pour servir de groupe témoin dans le cadre des deux méthodologies décrites précédemment. Par la suite, deux boîtes de Petri ont étéensemencées (PCA et Hektoen) afin de cultiver des colonies bactériennes, comme illustré dans la figure 45.

Une prolifération significative de colonies bactériennes a été observée dans les deux boîtes de culture, similaire à celle constatée sur l'échantillon témoin.

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

a) Échantillons non contaminés (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 *Thymus vulgaris*. Après ensemencement sur gélose PCA, une présence notable de colonies bactériennes a été observée. Ces résultats démontrent l'impact de l'absence de traitement à base d'HE de *Thymus vulgaris* sur la prolifération bactérienne.

Le 3^{ème} échantillon de cuisse de poulet a été mis dans une barquette, enveloppé avec un film alimentaire imprégné d'HE de *Thymus vulgaris*, puis ensemencé. Une réduction de la charge bactérienne a été observée. Toutefois, cette réduction n'a pas conduit à l'élimination complète de la charge microbienne, mettant en évidence l'effet modéré de l'HE de *Thymus vulgaris* sur la prolifération bactérienne, en raison de son action volatile et de l'absence de contact direct avec la viande (Figure 46).

b) Échantillons contaminés (Hektoen)

Le 4^{ème} échantillon de cuisse de poulet, intentionnellement contaminé avec la souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922, a été enveloppé dans un film alimentaire non traité par l'HE de *Thymus vulgaris*, puis ensemencé. Une charge importante de colonies bactériennes a été observée sur la boîte de Petri.

Le 5^{ème} échantillon de cuisse de poulet, également contaminé avec *E. coli* ATCC 25922, a été placé dans une barquette et enveloppé avec un film alimentaire traité à l'HE de *Thymus vulgaris*. Après ensemencement, une réduction notable du nombre de colonies bactériennes a été constatée, confirmant l'effet inhibiteur volatil de l'HE de *Thymus vulgaris* sur la prolifération des micro-organismes (Figure 47).

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

a) Échantillons non contaminés (PCA)

Lors de l'ensemencement d'un échantillon (N°6) de cuisse de poulet enveloppé avec un film alimentaire non traité, une prolifération notable de colonies bactériennes a été observée.

Le 7ème échantillon de cuisse de poulet, enveloppé avec un film alimentaire traité à l'HE de *Thymus vulgaris*, a été ensemencé, et aucune colonie bactérienne n'a été détectée.

Ces résultats démontrent clairement l'efficacité de l'HE de *Thymus vulgaris* à inhiber toute croissance microbienne, mettant en évidence son potentiel en tant qu'agent antimicrobien dans la préservation de la viande de poulet (Figure 48).

b) Échantillons contaminés (Hektoen)

Dans cette partie de l'étude, un échantillon (N°8) de cuisse de poulet, intentionnellement contaminé avec la souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922, a été enveloppé avec un film alimentaire non traité à l'HE de *Thymus vulgaris* et ensemencé.

Une forte présence de colonies bactériennes a été observée.

Le 9ème échantillon, également contaminé avec *E. coli* ATCC 25922, a été enveloppé avec un film alimentaire traité à l'HE de *Thymus vulgaris*.

Après ensemencement, aucune croissance microbienne n'a été détectée, soulignant l'efficacité inhibitrice de l'HE de *Thymus vulgaris* contre cette souche bactérienne (Figure).

Ces deux stratégies de conservation se sont avérées efficaces pour limiter la prolifération bactérienne. Cependant, la méthode d'enrobage direct a montré une efficacité supérieure à celle des barquettes, en raison du contact direct entre l'HE de *Thymus vulgaris* et la viande. Dans la méthode des barquettes, l'effet de l'HE était uniquement volatil.

La conservation des aliments avec des produits naturels remonte à l'antiquité, où les viandes étaient conservées dans de l'huile et des épices pour prévenir l'oxydation et la détérioration (Djenane et al., 2009).

Des études sur l'utilisation d'extraits et d'huiles essentielles dans diverses matrices alimentaires ont montré des résultats prometteurs, en particulier pour les viandes.

Cependant, l'application des huiles essentielles dans les aliments nécessite des concentrations plus élevées pour garantir un effet antimicrobien, notamment en raison de la fixation des molécules d'HE dans les lipides des produits carnés, qui réduisent leur activité (Burt, 2004).

Les produits carnés, facilement périssables, sont l'objet de nombreuses recherches. (DJENANE et al. 2012) ont testé un extrait brut de feuilles d'olivier sur de la viande de dinde fraîche et ont obtenu des résultats encourageants, prolongeant la durée de conservation sans altérer les qualités sensorielles de la viande.

Le thym, bien connu en Algérie pour son utilisation culinaire, a également montré des résultats remarquables contre diverses souches pathogènes, telles que *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *C. albicans* (Yakhlef et al., 2011).

La concentration et la composition des huiles essentielles influencent leur activité antibactérienne. Une étude d'Oussalah et al. (2007) a montré que des films bioactifs contenant du thym ont inhibé efficacement les bactéries comme *E. coli* et *Pseudomonas spp* dans la viande rouge. Des membranes à base de thym ont également démontré une inhibition des coliformes thermotolérants, *E. coli* et *Staphylococcus* à basse température (Eduarda C P et al., 2023), suggérant leur potentiel pour des emballages actifs dans les produits carnés.

L'acidité joue un rôle clé dans l'efficacité des huiles essentielles. L'augmentation de l'acidité rend les composés hydrophobes, facilitant leur dissolution dans les lipides des membranes cellulaires des microorganismes (Rasooli, 2007). Michiel et al. (2007) ont également montré que les principaux composés de l'HE de thym, le thymol et le carvacrol, sont plus actifs à faible pH, favorisant leur accumulation dans les membranes cellulaires des bactéries.

Dans le cadre de cette étude, une évaluation "in vitro" de l'HE de *Thymus vulgaris* contre des agents pathogènes comme *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* et *A. niger* a montré des résultats probants.

Lors de la phase "in situ" sur la viande de poulet, l'HE a démontré son efficacité en prolongeant la durée de conservation en inhibant la croissance des microorganismes indésirables.

Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation des HEs comme agents de conservation naturels, remplaçant potentiellement les antimicrobiens de synthèse et les conservateurs chimiques.



Conclusion

CONCLUSION

Cette étude visait à évaluer les effets antimicrobiens des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*), de menthe verte (*Mentha spicata*), et de romarin (*Rosmarinus officinalis*) ainsi que leur application potentielle dans la conservation des aliments, en particulier la viande de poulet. Les résultats obtenus montrent que l'HE de thym possède une activité antimicrobienne remarquable, en particulier contre les souches bactériennes et fongiques, tandis que l'HE de menthe verte présente une efficacité antifongique notable contre *Aspergillus niger*. L'HE de romarin, en revanche, n'a montré qu'une faible activité, avec des zones d'inhibition limitées, notamment contre les levures et moisissures testées.

L'application de l'HE de thym sur les échantillons de viande de poulet, emballés dans des films alimentaires, a révélé une conservation significative et une inhibition efficace de la croissance bactérienne, en particulier contre la souche d'E. coli. Ces observations confirment le potentiel de l'HE de thym en tant qu'agent de bioconservation alternatif, particulièrement utile dans la lutte contre la prolifération microbienne.

Cette étude contribue à enrichir notre compréhension des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles dans le domaine alimentaire. Les résultats démontrent la pertinence de l'HE de thym et de menthe verte en tant qu'agents de conservation naturels, offrant une alternative prometteuse aux conservateurs chimiques. Cependant, les limitations observées pour l'HE de romarin et l'absence d'effet inhibiteur contre certaines souches fongiques soulignent la nécessité de recherches plus approfondies.

Dans l'avenir, l'exploration de la combinaison des huiles essentielles avec des matrices d'emballage alimentaire antimicrobiennes pourrait constituer une approche innovante. Il est également important d'étudier les interactions possibles entre ces huiles et la flore intestinale des consommateurs afin d'assurer la sécurité et l'efficacité des solutions de conservation proposées. En conclusion, cette étude ouvre des perspectives prometteuses pour l'intégration des huiles essentielles dans les pratiques de conservation alimentaire naturelles et durables, renforçant ainsi la sécurité et la qualité des produits alimentaires.



Références bibliographique

Références bibliographique

- **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., Lorà S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagàna
- **R. and Conchello 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.
- **Andrews, J. M.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Supplement_1), 5-16.
- **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.
- **Benjilali 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.
- **Blackburn, C.d.W.** (2006). Introduction. *Food Spoilage Microorganisms*.
- **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). *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Tec&Doc- Lavoisier, Paris.
- **Bruneton J.**, (1993). *Pharmacognosie photochimie plante médicinales*-. Tec&Doc Lavoisier, Paris.

Références bibliographique

- **Burt S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.
- **Burgot, J.-L., & colleagues** (2011). Chromatographic techniques and mass spectrometry for essential oil analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 35(4), 256-268.
- **Blackburn, C. de W.** (2006). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing in Food Science and Technology.
- **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.
- **CE Commission 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.
- **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.
- **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.

Références bibliographique

- **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.
- **De Greave, B., Van den Heuvel, H., & Claeys, M.** (1986). Mass spectrometry: Principles and applications. *Oxford University Press*.
- **Dorman, H.J., Deans, S.G.** (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils." *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
- **Eduarda Caetano Peixoto, Laura Martins Fonseca, Eleessandra 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: 5^e éd. 2004. p. 217-8.
- **El Omari, M., Ghanmi, M., Satrani, B., & Aafi, A.** (2019). Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(1), 101-111.
- **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

Références bibliographique

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.*
- **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.
- **Gontard N.**, (2000). *Les emballages actifs*. LONDRES-PARIS- Éditions *Tec&Doc Lavoisier*. Édition NEW YORK, 2-10pp
- **Guiraud J.** (1998). *Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologiques*. Edition Dunod, Paris.
- **Guiraud J.P.** (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod, Paris.
- **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.
- **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.
- **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., BenHadj 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.
- Jardin du Pic Vert. (2023). *Rosmarinus officinalis*. <https://www.jardindupicvert.com/arbustes/1735-romarin-official.html>
- Jardin du Pic Vert. (n.d.). *Thymus vulgaris*. <https://www.jardindupicvert.com/plantes-aromatiques/4784-thym-commun.html>

Références bibliographique

- Jardin du Pic Vert. (n.d.). *Rosmarinus officinalis*.
<https://www.jardindupicvert.com/arbustes/1735-romarin-officinal.html>
- **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.
- **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.
- **Kreyenschmidt. J et Ibald.R.,** (2012). 6 Chapter Modeling Shelf Life Using Microbial Indicators. Shelf life assessment of food, 127p.
- **LamiriA., Lhaloui S., BenjilaliB. & BerradaM.,** (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor*. *Field Crops Res.*, 71, 9-15.
- **Lechevallier Mw, Cawthon Cd, LeeRg** (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.
- **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.

Références bibliographique

- **Martins, A. (2020).** Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus). <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03230057>
- **Mahboubi, M., & Bidgoli, F. G. (2010).** "Antimicrobial activity of essential oil from *Mentha spicata* and comparison with other *Mentha* species." *Pharmacognosy Research*, 2(1), 52-55. doi:10.4103/0974-8490.60579.
- **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.
- **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*.
- **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.
- **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.

Références bibliographique

- **Perry J., Staley J., Lory S. E. 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,N-Diméthylacétamide 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.
- **Prescott, Harley et Klein** (1995). Microbiologie. *DeBoek-Wesmael.S.A., 1014*.
Radhakrishnan V V., Madhusoodnan K.J. et Kuruvilla K.M., (1992) Cinnamon thespicy bark, *Spice India*; 5(4): 12-13.
- **Quintavalla, S., & Vicini, L.** (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62(3), 373-380.
- **Rasooli I.** (2007): food preservation – a bio-preservative approach, *food global science books* 1(2), p: 111.
- **Réglementation européenn .,** (2009) RÈGLEMENT (CE) N° 450/2009 DE LA COMMISSION Concernant les matériaux etobjetsactifset 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.
- **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.

Références bibliographique

- **Russell, A. D.** (2007). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1535-1542.
- **Rota, M. C., Herrera, A., Martinez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordan, M. J. (2008).** "Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis* essential oils." *Food Control*, 19(7), 681-687.
doi:10.1016/j.foodcont.2007.07.007.
- **Šcetar M., Debeaufort F., Benbettaieb N., Galick, 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).*
- **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. *Toxicol. In : étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse Appl. Pharmacol.* 168,189-99.
- **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.*
- **Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010).** "Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model." *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
doi:10.3390/molecules15117532.
- **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>.
- **Telci, I., Demirtas, I., & Sahin, A.** (2006). *Variation in Plant Properties and Essential Oil Composition of Mentha spicata L. during Different Phenological Stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3620-3627.

Références bibliographique

- **Vokou D, Chalkos D, Karamanlidou G, Yiangou G., (2002).** Activation of soil respiration and shift of the microbial population balance to *Lavandulastoechas* essential oil. *J. of chem. Ecol.* 28(4), 755-768.
- **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.
- **YrjöenT.(2004).**ExtractionandPlanarChromatographicSeparationTechniquesinthe Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, p. 76.
- **ZhiriA.(2006).**Aromatherapie,unpeu d'histoire. *NeutraNews*,1-16.
- **Zeng, H., Tian, J., Zheng, Y., Ban, X., & Wang, Y. (2012).** "In vitro and in vivo activities of essential oil from *Rosmarinus officinalis* against *Candida albicans*." *Journal of Medicinal Food*, 15(10), 862-868. doi:10.1089/jmf.2011.0236.



Annexes

Annexe01: Composition de DMSO

- CAS: 67-68-5/C₂H₆OS/ 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 20/D:1,479 (vérifié).
- Pression de vapeur : 0,42mmHg (20 °C).
- Teneur:≥99,9 %.
- Apparence : liquide clair, incolore.



Annexe02: 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 électronarcose 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 03

- **Petit matériel :**
 - Anse de platine.
 - Bec bunsen.
 - Blouses.
 - Boîtes de Petri.
 - Compresses stériles.
 - Disques d'antibiotiques.
 - Disques stériles de 6mm 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 04 : 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 05 : 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.

- **Gélose PCA**

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

- **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**

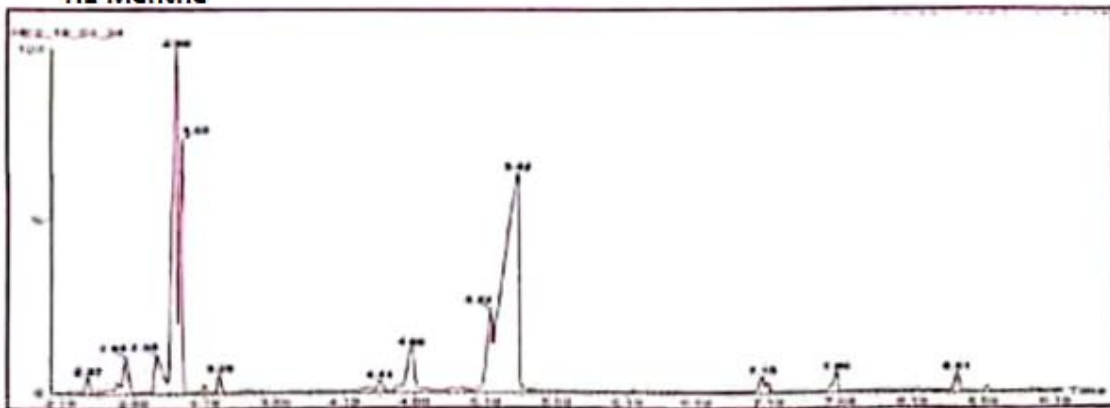
Protéose peptone.....12 g
Extrait de levure.....3 g
Chlorure de sodium.....5 g
Thiosulfinate de sodium.....5 g
Sels biliaires.....9 g
C itrate de fer ammoniacal.....1,5 g
Salicine.....2 g
Lactose.....12 g
Saccharose.....12 g
Fuchsine acide.....0,1 g
Bleu de bromothymol.....0,065 g
Agar.....13 g
Eau distillée.....1000 ml

Non autoclavable
pH = 7,5± 0,2

Annexe 06 : GC/MS

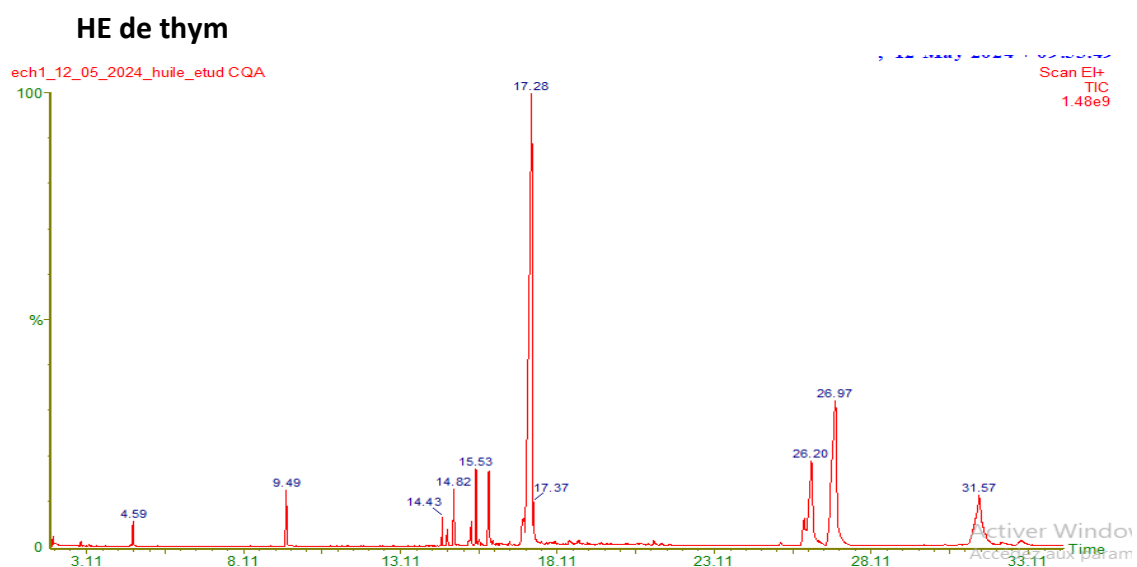


HE Menthe



HE romarin





Annexe 07 : Conservation des différentes dilutions des HEs de thym, romarin et menthe verte



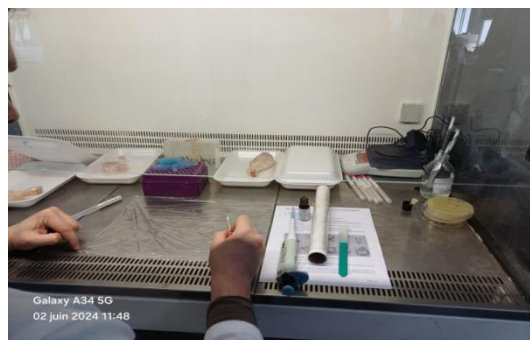
Annexe 8 :

Zone d'inhibition	Témoin+AB	Témoin-	HE Thym delué	HE romarin	HE menthe
C.albicans 71453	25	6	11,33333333	6,67	6,67
A.niger ATCC 16404	30	6	18,33333333	6	20,67

Zone d'inhibition	Témoin+AB	Témoin-	HE Thym delué	HE romarin	HE menthe
E.coli ATCC 25922	25	6	20,33	9,33	9,33
S.aureus ATCC 23922	25	6	28	11,33	12,33

Annexe 9 : 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 10: 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 11 : 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

La recherche de nouvelles méthodes de conservation des aliments basée sur l'utilisation des agents antimicrobiens naturels, notamment les composés phytochimiques, suscite un intérêt grandissant. Cette étude a pour objectif principal l'évaluation *in vitro* et *in situ* de l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles (HE) de thym, de menthe et de romarin testées sur deux souches bactériennes pathogènes, en l'occurrence **Escherichia coli ATCC 25922** et **Staphylococcus aureus ATCC 25923**, et deux souches fongiques (**Candida albicans ATCC 10231** et **Aspergillus niger AATCC 16404**). Les résultats de l'étude *in vitro* (méthode des disques) indiquent que toutes les souches bactériennes testées sont sensibles aux huiles essentielles pures, bien que seule l'HE de thym ait montré une efficacité notable contre les souches fongiques. Les **CMIs** observées pour l'HE de thym varient entre **2,85 mg/ml** et **11,43 mg/ml**, démontrant son efficacité sur l'ensemble des microorganismes testés, aussi bien bactéries que moisissures et levures. Toutefois, les HE de menthe verte et de romarin, bien qu'actives contre les bactéries, n'ont pas montré d'effet antifongique notable contre **C. albicans**.

Des essais "*in situ*" ont été réalisés en utilisant l'**HE de thym** pour l'enveloppement de cuisses de poulet. Des échantillons contaminés par **E. coli ATCC 25922** versus échantillons non contaminés ont été emballés avec un film alimentaire traité à l'HE de thym. Après une conservation de **96 heures** à **5±1°C**, les analyses microbiologiques ont révélé une réduction significative de la charge microbienne dans les échantillons traités, démontrant l'efficacité de l'HE de thym pour prolonger la durée de conservation de la viande tout en préservant sa qualité microbiologique et organoleptique. Nos résultats laissent suggérer une possibilité d'utilisation de l'**HE de thym** comme agent à la fois bactéricide et fongicide, alors que HE de menthe verte et de romarin comme agents principalement bactéricides.