



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département des sciences Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En Vue de l'Obtention du Diplôme de master académique en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème

Activité antibactérienne de L'extrait phénolique de *Phoenix. Dactylifera* L, de huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L et de L'acide acétique sur deux souches de *Pseudomonas*.

Présenté par

M^{elle} AIT YOUNES Leila

M^{elle} MOHAMMED SEGHIR Kahina

Devant le jury composé de :

Président : Mr SADOUDI.R.

Maitre de conférences UMMTO

Promotrice : M^{elle} OUSSAID.S.

Maitre assistante UMMTO

Examineur : Mm HELLAL.Z.

Maitre assistante UMMTO

Examineur : M^{elle} ASMANI.K.

Maitre assistante UMMTO

Année universitaire : 2015/2016



*Remerciement et
dédicace*

Remerciement

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-nous de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de mémoire, nous ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadreur M^{elle} Oussaid Saliha maitre d'assistance (A). A l'université de Tizi – Ouzou qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance tant pour nous avoir accordée sa confiance que pour nous avoir guidé dans notre travail.

Nous remercions le directeur Mr Khoudir Madani de Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS) de nous avoir accueilli au sein du laboratoire.

Nous remercions aussi les membres, de Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia pour l'aide précieuse que nous apportée.

Nous aimerons également remercier madame Ould Amar ouiza responsable de laboratoire de contrôle de qualité de DBK pour son encouragements qui nous a permis le bon déroulement et l'aboutissement de notre mémoire.

Nos remerciements également :

Mr SADOUDI.R. Qui a fait l'honneur de présider le jury ;

M^{me} HELLAL.Z. et M^{elle} ASMANI.K. Qui ont accepté d'examiner notre travail.

Je n'oublierai jamais l'aide précieuse que Madame Agag Hayet m'a offert au sein de la faculté de biologie qu'elle trouve ici tous mes vifs remerciements.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Enfin nous voudrions dire merci à tous les enseignants du département de Biochimie et microbiologie l'université de Tizi-Ouzou pour l'aide pendant notre formation d'étude.

Dédicaces

Je remercie dieu tout puissant qui m'a permit d'arriver à ce but.

Je dédié ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :

A mes très chers parents qui se sont sacrifiés pour mon bien être

Qui par leur précieux conseils qui m'ont guidés vers la voie de la réussite.

*A mes chères sœurs : **Ryma, lynda.***

*A ma chère tante : **Agag Hayet.***

A ma très chère camarade Kahina qui m'a aidée et encouragée a réaliser ce travail.

*A tous mes amis : **Moumouh , Dina, lila, Kamel, Tina, zola,***

A toute la promotion de Microbiologie Appliquée 2016.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

Dédicaces

Je remercie dieu tout puissant qui m'a permit d'arriver à ce but.

Je dédié ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :

A mes très chers parents qui se sont sacrifiés pour mon bien être

Qui par leur précieux conseils qui m'ont guidés vers la voie de la réussite.

*A mon chère frère : **toufik***

*A mes Chères sœurs : **Farida, lilia***

*A mes chères tantes : **Nadia, Malika.***

A ma très chère camarade Liela qui m'a aidée et encouragée à réaliser ce travail

*A tous mes amis : **Mourad , Amine, Lynda, samia, Hayet.***

A toute la promotion de Microbiologie Appliquée 2016.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.



Résumé

Résumé

La conservation à basse température est consciencieusement appliquée. Toutefois elle favorise le développement de microorganisme psychrotrophe notamment lors de la rupture de la chaîne du froid.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de trois agents actifs, l'huile essentielle de *Rosmarinus*, l'acide acétique et l'extrait hydraulique du régime de *Phoenix dactylifera L* et leur combinaison sur deux souches de *Pseudomonas*

L'extraction assistée par micro-onde a été utilisée pour extraire les composés phénoliques à partir du régime de datte. L'effet de trois facteurs indépendants à savoir la puissance d'irradiation, le temps d'irradiation et le pH du meilleur solvant extracteur (l'eau) sur la teneur des composés phénoliques totaux a été évalué en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse à l'aide d'un outil informatique le JMP7. Les conditions optimales permettant d'obtenir un rendement maximal en polyphénols totaux, sont 600W, 90s à pH 7..

L'estimation de l'activité antibactérienne a été effectuée avec la méthode de diffusion sur disque sur deux souches bactériennes, l'extrait hydraulique du régime de *Phoenix dactylifera L* optimisé s'avère sans effet sur *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

Par contre L'huile essentielle extraite par hydrodistillation, présente respectivement une activité prononcée sur les deux souches avec des diamètres de la zone d'inhibition de 23 ± 1.41 mm et 28 ± 2.81 mm pour une concentration de 95mg/ml. Alors que pour l'acide acétique donne des de 30 ± 0 mm pour *Pseudomonas aeruginosa*, Différentes combinaisons suivant un plan de mélange préétabli révèle un effet meilleur en combinant l'huile essentielle et de l'acide acétique avec un diamètre de la zone d'inhibition de 28 ± 0 mm sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Mots clés : Composés phénolique, l'huile Essentielle, Bactéries psychrotrophes, *Phoenix dactylifera L*, *Rosmarinus officinalis L*, Acide acétique, Activité antibactérienne.

Abstract

Conservation at low temperatures is quasi-systematic use; however subserve the development of psychrotrophic microorganism, particularly when the cold food chain is broken.

The objective of this study was to evaluate the effect of three active agents, essential oil *Rosmarinus*, acetic acid and extract the hydraulic regime of *Phoenix dactylifera* L and their combination of two strains of *Pseudomonas*.

The extraction assisted by microwave was used to extract the phenolic compounds from the Support for date he effect of three independent factors namely the irradiation power, irradiation time, and pH of the best extractor solvent (water) on the content of total phenolics was, evaluated using the methodology of response surface using a computer tool JMP7.

the optimal conditions for obtaining maximum performance in total polyphenols, are 600W, 90s pH 7 ..

The estimate of the antibacterial activity was carried out with the disk diffusion method on two bacterial strains. This study revealed that of *Pseudomonas.Sp* and *Pseudomonas aeruginosa ATCC* has been revealed resistant to phenolic extracts,

On the other hand ,the essential oil extracted by hydrodistillation, shows diameter of the zone inhibition $23 \pm 1.41\text{mm}$ and $28 \pm 2.81\text{mm}$ against *Pseudomans* and *Pseudomans aeruginosa*, respectively, while the acetic acid gives a diameter of $30 \pm 0 \text{ mm}$.

Combinations of essential oil and acetic acid shows highest activity effect of with diameter of zone inhibition $28 \pm 0\text{mm}$ against *Pseudomonas aeruginosa*.

Key word: phenolic content, Essential oil, Psychrotrophe bacteria, *Phoenix dactylifera* L, *Rosmarinus officinalis* L, Acetic acid, Antibacterial Activity.



*Liste
d'abréviation*

Liste des abréviations

- Aw** : Activité de l'eau
- ADP** : adénosine di phosphaté
- AFNOR** : la norme de l'Association Française de Normalisation
- ANOVA** : Analyse de la variance
- CSPs**: Cold Shock Proteins
- CAPs**: Cold Acclimation Proteins
- CCD** : conception centrale des composés
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- MS**: Matière sèche
- EAM** : Extraction assistée par micro-ondes
- EAG** : Equivalent Acide Gallique
- FC** : folin–Ciocalteu
- GN** : Gélose nutritive
- He.s** : Huile essentielle
- JMP** : Java Memory profiler (programme informatique de statistique).
- MH** : Muller Hinton
- m/v** : Rapport masse/volume
- MSR** : méthode des surfaces réponse
- NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide
- Na₂CO₃** : Carbonate de sodium
- P** : Puissance micro-ondes
- PT** : Contenu en phénols totaux (Total Phenolic Content)
- RHE** : Rendement en Huile Essentielle
- R²** : coefficient de détermination
- R²_A** : coefficient de détermination d'ajustement
- SAS** : Système d'Analyse Statistique
- T** : Temps d'irradiation
- UFC/ml** : Unité Formant des Colonies par millilitre
- W** : Watt



*Liste des
figures*

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure1 : Exemple de quelques terpènes..... | 9 |
| Figure 2 : Présente quelque structure de composés aromatiques..... | 10 |
| Figure 3 : Les flavonoïdes..... | 12 |
| Figure 4 : les polyphénols non flavonoïdes..... | 13 |
| Figure 5 : <i>Rosmarinus officinalis L.</i> Djebel Antar, Béchar..... | 21 |
| Figure 6 : les dattes et le régime du palmier <i>Phoenix dactylifera</i> | 22 |
| Figure 7 : Les étapes suivies pour la préparation de la poudre de <i>P. dactylifer L.</i> | 24 |
| Figure 8 : Photographie du dispositif d'extraction des composés phénolique par EAM..... | 25 |
| Figure 9 : Dispositif utilisé pour l'extraction des He.s par hydrodistillation..... | 29 |
| Figure 10 : Séparation des He.s par décantation..... | 30 |
| Figure 11 : régression linéaire du model quadratique..... | 39 |
| Figure 12 : Les valeurs expérimentale et prédite (optimum)..... | 41 |
| Figure 13 : Effets significatifs des coefficients du modèle d'équation établie de Polyphénols..... | 43 |
| Figure 14 : Profil de prédiction déterminant les conditions optimales d'extraction pH..... | 44 |
| Figure 15 : l'effet des interactions..... | 45 |
| Figure 16 : Histogramme présentant des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 47 |
| Figure 17 : Histogramme présentant des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas Sp.</i> | 47 |
| Figure 18 : Corrélations entre le diamètre des zones d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudomonas Sp</i> et les concentrations d'huiles de Romarin..... | 48 |
| Figure 19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Romarin testée à différentes concentrations sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudomonas Sp.</i> | 49 |
| Figure 20 : Activité antibactérienne des polyphénols à différentes concentrations sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudomonas Sp.</i> | 50 |
| Figure 21 : Les diamètres des zones d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtenus avec l'acide acétique..... | 51 |
| Figure 22 : Histogramme présentant la Variation des diamètres de la zone d'inhibition (mm) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction de la concentration d'acide acétique..... | 52 |
| Figure 23 : Corrélations entre les diamètres des zones d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et les concentrations de l'acide acétique..... | 52 |
| Figure 24 : Photos du diamètre des zones d'inhibition par les différents mélanges des Agents antibactériens à 37°C et a 4°C pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 55 |
| Figure 25 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux..... | 69 |
| Figure26 : Structure de la paroi des bactéries à Gram positif..... | 69 |
| Figure27 : Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif..... | 70. |



*Liste des
tableaux*

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Conditions d'extraction utilisées dans les études préliminaires. | 26 |
| Tableau II : Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les trois facteurs étudiés. | 28 |
| Tableau III : la serie de mélanges employé dans le test de l'activité antibactérienne..... | 33 |
| Tableau IV : Les résultats des expériences à un seul facteur par micro-ondes assisté extraction. | 35 |
| Tableau V : L'analyse de variance (ANOVA) pour des résultats expérimentaux obtenus en utilisantEAM. | 42 |
| Tableau VI : Résultat des diamètres des halos d'inhibition de la série 13 mélanges de substances bioactives à 37°C et à 4°C sur <i>Pseudomonas aeroginos</i> | 54 |



Sommaire

Sommaire

| | |
|--|----|
| Résumé. | |
| Liste des abréviations. | |
| Listes des figures. | |
| Liste des tableaux. | |
| Introduction générale..... | 1 |
| Synthèse bibliographique | |
| Chapitre I. Les microorganismes psychrotrophe | |
| I.1. Généralité..... | 3 |
| I.2. Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes..... | 3 |
| I.2.1. Courbe de croissance. | 3 |
| I.2.2. Sensibilité à la chaleur..... | 3 |
| I.2.3. Autres caractéristiques importantes. | 4 |
| I.3. Adaptation des psychrotrophe..... | 4 |
| I.3.1. Maintien des échanges avec le milieu extérieur..... | 5 |
| I.3.2. La synthèse d'enzymes adaptées à fonctionner à basse température..... | 5 |
| I.3.3. Synthèse des protéique à basse température. | 5 |
| I.4. Les techniques de conservation des aliments à base température..... | 6 |
| I.5. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées..... | 6 |
| I.5.1. Protéolyse et lipolyse..... | 6 |
| I.5.2. Autres types d'altérations..... | 7 |
| I.6. Pseudomonas..... | 7 |
| Chapitre II. Les métabolites secondaires des plantes | |
| II.1. Les huiles essentielles..... | 8 |
| II.1.1. Définition..... | 8 |
| II.1.2. Propriétés physico-chimiques des He.s..... | 8 |
| II.1.3. Composition chimique..... | 9 |
| II. 1.3.1. Les terpènes..... | 9 |
| II.1.3.2. Les composés aromatiques dérivés du Phényl-propan..... | 10 |
| II.1.4. Les méthodes d'extraction..... | 10 |
| II.1.4.1. L' hydrodistillation..... | 10 |
| II.1.5. Toxicité des Huile essentielles..... | 10 |
| II.2. Les composée phénoliques..... | 11 |
| II.2.1. Définition..... | 11 |
| II.2.2. Structure chimique et classification..... | 11 |
| II.2.3. Méthode d'Extraction des composés phénoliques par microonde (MAE)... | 13 |
| II.2.4. Avantages et inconvénients de la MAE..... | 13 |
| II.2.5. Paramètres influençant l'extraction MAE..... | 14 |
| II.2.5.1. Nature et volume du solvant..... | 14 |
| II.2.5.2. Temps d'extraction..... | 14 |
| II.2.5.3. Température d'extraction..... | 14 |
| II.2.5.4. Puissance d'irradiation..... | 14 |
| II.2.5.5. Nature de la matrice..... | 15 |
| II.2.6. Principe du plan d'expériences..... | 15 |

| | |
|---|----|
| II.2.7.Optimisation d'extraction par les plans d'expériences..... | 15 |
| II.3. Les alcaloïdes..... | 16 |
| Chapitre III : Activité antimicrobienne des métabolismes secondaires. | |
| III.1.Activité antibactérienne des He.s et les polyphenole..... | 17 |
| III.2.Mécanisme d'action | 17 |
| III.3.Facteurs influençant l'activité antibactérienne | 18 |
| III.3.1. Activité liée à la composition chimique..... | 18 |
| III.3.2. Activité liée à la composition au microorganisme..... | 19 |
| Chapitre IV : Notion sur les plantes étudiées | |
| IV.1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L | 20 |
| IV.1.1.Classification botanique..... | 20 |
| IV.1.2.Habitat et description..... | 20 |
| IV.1.3. composition et Utilisation et propriété thérapeutique..... | 21 |
| IV.2. <i>phoenix dactylifera</i> L..... | 21 |
| IV.2.1.Taxonomie et systématique..... | 21 |
| IV.2.2.Répartition géographique du <i>phoenix dactylifera</i> L..... | 22 |
| IV.2.2.1. Dans le monde..... | 22 |
| IV.2.2.2.En Algérie..... | 22 |
| IV.2.3.Utilisation <i>phoenix dactylifera</i> L..... | 23 |
| Matériels et méthodes | |
| I.1. Matériels..... | 24 |
| I.1.1. Matériel végétal..... | 24 |
| I.1.2. Matériels biologique..... | 24 |
| I.1.2.1. Les souches bactériennes..... | 24 |
| I.2.Méthodes..... | 24 |
| I.2.1. Extraction des composés Phénolique | 25 |
| I.2.1.1. Principe d'extraction par micro-onde (MAE)..... | 25 |
| I.2.1.2. Etudes préliminaires... .. | 25 |
| I.2.1.3. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)..... | 26 |
| I.2.1.4. Extraction des composées phénoliques assistées par micro-ondes..... | 26 |
| I.2.1.5. Dosage des polyphénols..... | 27 |
| I.2.1.6. Modélisation du plan d'expériences..... | 27 |
| I.2.1.7. Analyse statistique..... | 28 |
| I.2.2. Extraction de l'huile essentielle..... | 29 |
| I.2.2.1. Description du dispositif d'extraction..... | 29 |
| I.2.2.2. Procédé d'extraction..... | 29 |
| I.2.2.3. Détermination du rendement des huiles essentielles extraire..... | 30 |
| I.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 31 |
| I.2.3.1. Préparation de l'inoculum..... | 31 |
| I.2.3.1.1. Préparation de pré-culture..... | 31 |
| I.2.3.1.2. Préparation des suspensions bactériennes..... | 31 |
| I.2.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion | 31 |
| I.2.3.3. Etude la synergie entre l'extrait phénolique, l'huile essentielle et l'acide acétique..... | 32 |
| Résultats et discussion | |
| I.1.Extraction des composés phénolique de Palmier dattier du <i>phoenix dactylifera</i> L..... | 34 |
| I.1.1. Etude préliminaire pour la sélection des conditions d'extractions | |

| | |
|---|----|
| appropriées..... | 34 |
| I.1.1.1. Effet du solvant..... | 34 |
| I.1.1.2. Effect des fréquences..... | 36 |
| I.1.1.3. Effet du temps d’irradiation | 36 |
| I.1.1.4. Effet du pH..... | 37 |
| I.1.2. Dosage des polyphénols..... | 37 |
| I.1.3. Optimisation de la MAE..... | 39 |
| I.1.3.1. Modélisation et optimisation en utilisant CCD-RSM dans le processus d’extraction..... | 39 |
| I.1.3.2. Evaluation de la qualité du model..... | 39 |
| I.1.3.3. La validation du modèle quadratique pour la modélisation de MAE..... | 41 |
| I.1.3.4. Détermination l'équation du model..... | 42 |
| I.1.3.5. Analyse de la réponse de surface..... | 43 |
| I.1.3.6. L’extraction finale..... | 46 |
| II.2. Rendement en huile essentielle..... | 46 |
| II.3. Analyse microbiologique..... | 47 |
| II.3.1. Evaluation de l’activité antibactérienne de l’huile de Romarin..... | 47 |
| II.3.2. Evaluation de l’activité antibactérienne des polyphenols | 50 |
| II.3.3. Evaluation de l’activité antibactérienne de l’acide acétique..... | 51 |
| II.3.4. Evaluation de l’effet de synergique entre l’extrait phénolique, de l’huile de Romarin et l’acide acétique..... | 53 |
| Conclusion | 56 |
| Références bibliographiques | 58 |
| Annexe | 68 |



***Introduction
générale***

Introduction générale

Le traitement par la chaleur ou par d'autres procédés de conservation que reçoivent les produits alimentaires n'est pas suffisant pour assurer leur stérilité commerciale. La réfrigération est une barrière importante pour retarder leur altération et empêcher le développement de la plupart des micro-organismes d'altération et pathogènes.

Toutefois, la réfrigération reste insuffisante, plutôt elle favorisent le développement des microorganismes psychrotrophes tels que *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* et *Pseudomonas qui* peuvent se développer à des températures de + 4°C ou moins (Bornert, 2000).

Les dangers microbiologiques peuvent être maîtrisés par association de facteurs inhibiteur, dits barrières. Ces barrières peuvent contribuer à retarder ou empêcher la croissance de certains microorganismes, y compris des micro-organismes pathogènes. Parmi les principales barrières utilisables en plus de la réfrigération, on trouve: l'addition des molécules bioactives y compris les composés phénoliques et les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme agents antioxydants, antibactériens.

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la favorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (Maihebiau, 1994).

A cet effet, on s'est intéressé à la valorisation de deux plantes a savoir *Rosmarinus Officinalis L* et le régime du *Phoenix dactylifera L*.

L'extraction des principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols et les huiles essentielles, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification de ces derniers. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements des composés phénoliques et les huile essentielle (Bonnailli *et al.*, 2012).

Ce travail est composé de deux parties dont la première expose une synthèse bibliographique regroupant des généralités sur les psychrotrophes, les plantes médicinales étudiées et leurs métabolites secondaires.

Le deuxième est expérimental qui consiste à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de *Phoenix. dactylifera L*,

l'évaluation de leur activité antibactérienne seuls ou combiné avec les huiles essentielles et l'acide acétique sur *Pseudomonas Sp* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922.

Première partie

Synthèse

bibliographique

I. Les microorganismes psychrotrophes

I.1. Généralités

Les microorganismes psychrotrophes sont définis par leur aptitude à se développer à des températures inférieures à +7°C, même s'ils ont des optimums qui varient de 20 °C et 30°C et des maximums d'environ 35°C (Prescott *et al.*, 2010). Ce sont des agents de toxico-infections alimentaires ou d'altération de la qualité marchande des denrées alimentaires et constituent un facteur limitant la conservation des produits réfrigérés.

Dans les groupe des psychrotrophes, on trouve les bactéries à Gram négatif et à Gram positif dont les principaux genres sont *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptomyces* . ainsi que des levures ; des cyanobactéries ; mycètes et des algues (Oikawa *et al.*, 2001 ; Margesin et Mítiva, 2011).

I.2. Caractéristiques physiologiques des bactéries psychrotrophes

I.2.1. Courbe de croissance

Aux températures de réfrigération, les bactéries psychrotrophes présentent une courbe de croissance caractérisée par une phase de latence longue, pouvant durer plusieurs jours, et par une pente très faible au cours de la phase de croissance exponentielle. La multiplication est lente quand la température est proche de la température limite inférieure de croissance.

L'activité de la flore psychrotrophe peut être influencée par des écarts très faibles de température. Ainsi, si une température de +2°C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès +4°C. Sachant que les différentes capacités métaboliques ne subissent pas toutes une inhibition identique. Ainsi, à +4°C, les *Pseudomonas* ont une croissance lente, mais présentent une importante activité de synthèse d'enzymes qui réalisent l'hydrolyse du substrat alimentaire (Bornert, 2000).

1.2.2. Sensibilité à la chaleur

Les bactéries psychrotrophes présentent une sensibilité particulière au stress «chaud», caractérisée par une température maximale de croissance inférieure à +45°C et une température létale inférieure à +50°C. On peut citer les températures limites de croissance suivantes : +35°C pour *Acinetobacter*, +40°C pour *Alcaligenes*, +43°C pour *Pseudomonas* et +45°C pour *Listeria monocytogenes* (Bornert, 2000).

1.2.3. Autres caractéristiques importantes

Le pH : la plupart des bactéries psychrotrophes sont neutrophiles. Les bactéries lactiques et *Listeria monocytogenes* tolèrent des pH acides jusqu'à une valeur limite de 5.

L'activité de l'eau : Le genre *Pseudomonas* ne se développe bien que pour des valeurs d'activité de l'eau (A_w) supérieures à 0,98. Par contre, *Listeria monocytogenes* résiste à des conditions hostiles, elle tolère jusqu'à 10 % de chlorure de sodium et son A_w limite de croissance est de 0,86 (Bornert, 2000).

I.3. Adaptation des psychrotrophes

La croissance d'un micro-organisme nécessite une multitude des réactions dont la vitesse dépend de la température de culture. La vitesse de croissance est maximale pour une valeur de la température qualifiée de température optimale de croissance. De part et d'autre de cet optimum, l'activité métabolique ralentit, jusqu'à être totalement inhibée au delà des températures minimale et maximale de croissance.

L'ampleur de cette dépendance apparaît clairement lorsqu'on considère l'équation d'Arrhenius :

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

Où k est la constante de vitesse de la réaction, E_a est l'énergie d'activation, A est une constante relative à la fréquence de collision et aux facteurs stériques, R est la constante des Gaz parfaits et T , la température absolue.

Cette équation montre que la constante de vitesse (k) d'une réaction dépend essentiellement de l'énergie d'activation (E_a) et de la température absolue (T). Il est, dès lors, facile de comprendre les problèmes que pose le déficit d'énergie lors de la croissance aux basses Températures (Robert, 1999).

Outre l'effet sur la vitesse des réactions, la fragilisation des liaisons hydrophobes, induite par la réfrigération. Il en résulte une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques, par modification de leur conformation dans l'espace. La structure quaternaire est profondément modifiée, avec une dissociation des complexes polymériques. L'assemblage des ribosomes est inhibé, ce qui provoque une diminution des synthèses protéiques. La fluidité des membranes est réduite et l'ensemble des fonctions membranaires tels que le transport des ions ou des nutriments s'en trouve affecté (Gounot, 1991).

Les bactéries psychrotrophes possèdent une relative capacité de résistance au stress froid, mettant en jeu des mécanismes dont les principaux sont :

I.3.1. Maintien des échanges avec le milieu extérieur

La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la physiologie bactérienne, en assurant l'interface entre le milieu intérieur et extérieur. Elle est le siège de nombreux transports actifs et passifs assurant l'équilibre osmotique et l'apport de nutriment à la cellule. Ces fonctions ne peuvent être assurées que si elle est dans un état fluide (Mansilla *et al.*, 2004). Une chute de température, en dessous du point de fusion des acides gras composant la membrane, entraîne la transition d'un état fluide (désordonné) vers un état non fluide (ordonné) dont le résultat est une rigidification de la membrane. En réponse, les bactéries peuvent modifier la composition et les propriétés de leurs acides gras membranaires. La modification des acides gras peut se faire selon trois modalités: l'instauration des acides gras, la variation du niveau de ramification et la diminution de la longueur des chaînes carbonées (Franck, 2010).

I.3.2. La synthèse d'enzymes adaptées à fonctionner à basse température

Les bactéries psychrotrophes doivent être capables de réaliser l'ensemble des réactions biochimiques, dans des conditions thermo-dynamiquement défavorables. La comparaison des enzymes issues de bactéries mésophiles et psychrotrophes, montre un caractère thermolabile plus marqué chez les psychrotrophes, mais surtout une efficacité catalytique bien supérieure (Spiwok *et al.*, 2007; Metpally et Reddy, 2009). En effet leur souplesse structurale permet un changement de conformation, à la catalyse avec de faible quantité d'enzymes. La rigidité enzymatique entraîne une thermolabilité plus prononcée que chez les mesophiles.

I.3.3. Synthèse protéique à basse température

Les bactéries psychrotrophes seraient capables d'adapter au froid par la synthèse de deux types de protéine : « Cold Shock Proteins » CSPs ou « Cold Acclimation Proteins » CAPs. Des études ont montré l'existence de ces protéines chez *Listeria* (Francis et Stewart, 1997), *B.cereus* (Mayr *et al.*, 1996) et *Pseudomonas fragi* (Hebraud *et al.*, 1994). L'action des CSPs et CAPs permet l'adaptation de la bactérie à son milieu qui peut ainsi, associée à un redémarrage de la croissance bactérienne et dans de nombreuses fonctions, notamment dans la régulation de l'expression des gènes ainsi que dans le maintien d'une traduction efficace à basse température.

I.4. Techniques de conservation des aliments à basses températures

L'utilisation du froid pour la conservation des aliments est sans conteste la technique la plus répandue (Charpentier, 2008). Les basses températures retardent le développement des micro-organismes, les réactions chimiques et enzymatiques qui entraînent la détérioration du produit. Les enzymes et les réactions chimiques sont considérablement ralenties à des températures basses (<5°C), alors que la majorité des microorganismes ne sont plus capables d'activité métabolique à des températures inférieures à -5°C. Certains, tels que les bactéries coliformes, sont même inactivés (Charpentier, 2008).

On distingue deux procédés qui utilisent cette technique, la réfrigération et la congélation.

-**la réfrigération** : à une température comprise entre 0 °C et 4 °C, elle permet une conservation de courte durée ; c'est le froid positif.

-**la congélation et la surgélation** : Elles abaissent la température du produit à des températures inférieures à -10 °C, c'est le froid négatif.

Toutes les catégories possibles d'aliments (lait, viandes, légumes...) peuvent être congelées ou surgelées. Les microorganismes présents sont ceux qui se trouvaient dans l'aliment avant l'action du froid. L'intérêt de congélation est de respecter les qualités organoleptiques de l'aliment en évitant un traitement thermique.

I.5. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées alimentaires

De nombreux types d'altérations des denrées ; dues à l'action de bactéries psychrotrophes, ont été décrits. Ils sont le résultat de l'activité d'enzymes microbiennes exocellulaires et affectent, selon les cas : la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit.

I.5.1. Protéolyse et lipolyse

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres, puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de consommateur. Ce type de métabolisme est rencontré en particulier chez les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*. Ces différentes bactéries se caractérisent aussi par une activité lipolytique importante. La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et

gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance, et favorise le phénomène d'oxydation des acides

gras insaturés en méthylcétones (Bornert, 2000).

1.5.2. Autres types d'altérations

Parmi les autres types d'altérations, on peut aussi citer :

- les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine, par exemple, d'une consistance filante des laits décrite avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes* .

- les phénomènes d'acidification, par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Lors du processus hétérofermentaire, la formation de gaz, d'aldéhydes et de cétones est à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit.

- l'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales (Bornert, 2000).

I-1.6. Pseudomonas

Le genre *Pseudomonas*, de la famille des *Pseudomonadaceae*, regroupe des bactéries mobiles aérobies Gram négatif, de 2 à 4 µm de longueur, en forme de bâtonnets renflés, avec un flagelle polaire qui joue un rôle important dans la pathogénicité. Ces bactéries sont asporulées et peuvent produire des pigments, tels que la pyocyanine (vert-bleu) (Nauciel, 2000) et la pyorubrine (jaune-vert) fluorescentes. *P. aeruginosa* peut sécréter un vaste éventail de toxines extracellulaires, notamment l'exotoxine A et des entérotoxines —. D'autres substances comme l'acide hydrocyanique, des enzymes protéolytiques, des biofilms et des substances hémolytiques peuvent également contribuer à la pathogénicité de cette espèce. La combinaison de toxines et de substances dangereuses est un facteur qui joue un rôle déterminant dans la forte virulence de *P. aeruginosa* dans différents hôtes.

II. Les métabolites secondaires des plantes

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires (les protéines, les glucides et les lipides). Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. C'est des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante.

Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures (Muanda, 2010). Et donc se sont des éléments essentiels de la co-évolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003).

II.1. Les huiles essentielles

II.1.1. Définition

Les huiles essentielles (He.s) sont des substances naturelles huileuses, volatiles et odorantes offrant une forte concentration en principes actifs (Lardry et Haberkorn, 2007). Sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation (Iserin *et al.*, 2007). Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (Bruneton, 1993 ; AFNOR, 2000).

II.1.2. Propriétés physico-chimiques des He.s

A la température ordinaire, on trouve généralement les He.s incolores ou jaune pâle à l'état liquide. Toutes les He.s sont volatiles, odorantes et inflammables leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois He.s ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les alcools. Très altérables, elles s'oxydent au contact de l'air et de la lumière (Charpentier, 2008). Les huiles essentielles devraient toujours être conservées dans des flacons de verre opaque entreposées à l'abri de la lumière et du soleil, à environ +8°C (Laurennet, 2012).

II.1.3. Composition chimique

Les Hes sont des mélanges complexes et variables de constituents appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpènes volatils et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Bruneton, 1993)

II.1.3.1. Les terpènes

Ils sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre dans les Hes principalement des mono et des sesquiterpènes (possèdent respectivement 10 et 15 atomes de carbone) (Ruberto et Baratta, 2000) et plus rarement des di-terpènes (20 atomes de carbone). En tétraterpènes, huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes, en polyterpènes ($C_n H_8$) le carbone peut-être de 9 à 30 (Hernandez Ochoa, 2005). Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'ether-oxydes et de carbures (figure 1).

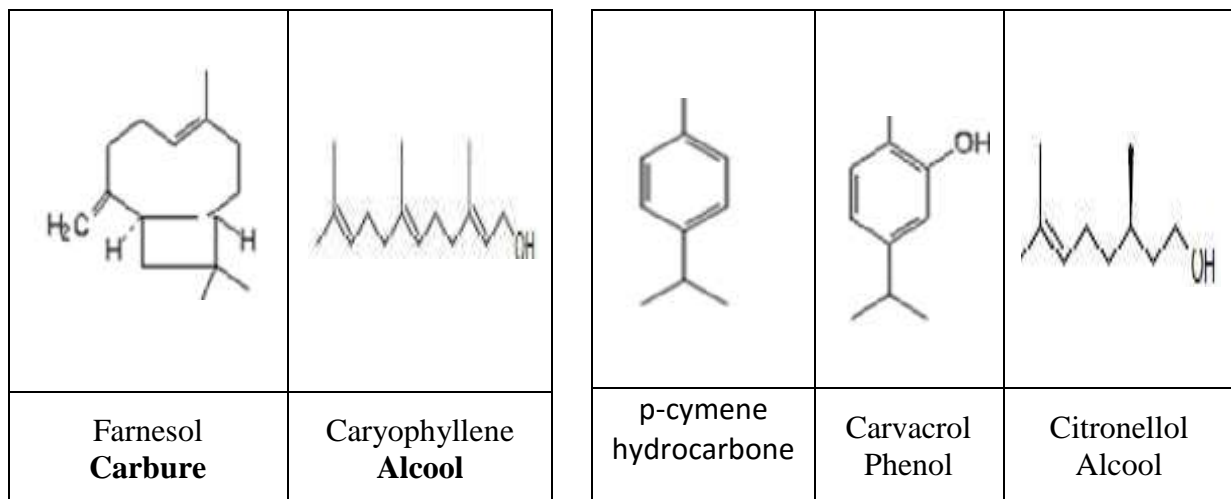


Figure 1 : Exemple des terpènes (Lakhdar, 2015)

II.1.3.2. Les composés aromatiques dérivés du Phényl-propane

Ils sont moins abondants que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme l'eugénol (Hes de girofle), l'anéthol et l'aldéhyde ainsi que (Hes de Badiane et d'anis), le carvacrol (huile essentielle d'origan), l'acide et l'aldéhyde cinnamiques (Figure 2).

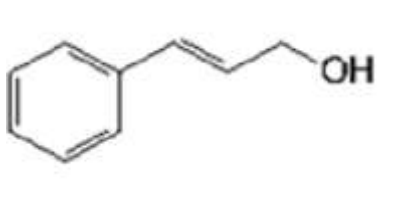
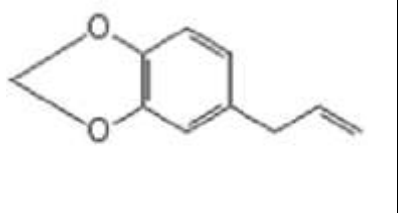
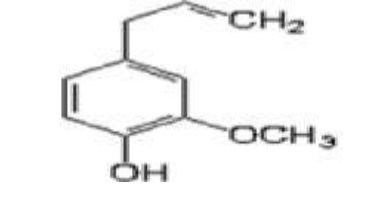
| | | |
|---|--|---|
|  |  |  |
| Cinnamyl alcohol Alcohol | Methylene dioxy compound Safrole | Eugenol Phenol |

Figure 2 : Présente quelque structure de composés aromatiques (Lakhdar, 2015).

II.1.4. Méthodes d'extraction des Hes

Il existe plusieurs méthodes d'extraction (L'extraction au moyen de solvants organiques, expression, extraction au dioxyde de carbone supercritique, ...etc.), choisies en fonction de la partie de la plante où se trouve l'Hes. De chaque procédé résulte un produit différent.

II.1.4.1. L'hydrodistillation

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993).

II.1.5. Toxicité des Hes

Les Hes ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certains Hes sont dangereux lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles de thym, d'origan, de la sarriette), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus) (Guba, 2001). Les cétones et dans une moindre mesure les lactones sont neurotoxiques (romarin, sarriette, cèdre, camphre, thuya, aneth, hysope). Certaines Hes se révèlent cytotoxiques (la toxicité du thym, la lavande) (Inouye, 2003).

Il existe quelques H.es dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzène ou de propenylbenzène comme le safrole, l'estragole (Guba, 2001). Les H.es très liquides peuvent parvenir dans les voies respiratoires si elles sont malencontreusement avalées ou vomies. Cela peut conduire à une inflammation des poumons (pneumonie). De plus, les H.es contenant des phénols sont toxiques pour le foie (clou de girofle, thym, origan) (Boughedioua, 2014).

II.2 Les composées phénoliques

II.2.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires trouvés en abondance dans une grande variété d'aliments, comme les fruits, les légumes, les herbes, les graines et les céréales, et dans les boissons, comme le café, le thé, le cacao et le vin. Les polyphénols sont un grand groupe de composés hétérogènes caractérisés par des groupements phényle hydroxylée (Ozidal *et al.*, 2016).

Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres Fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...) (Muanda, 2010).

II.2.2. Structure chimique et classification

Les composés phénoliques se trouvent principalement liés à des sucres et des acides organiques, qui peuvent être regroupés en flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

Les (figures 3 et 4) présentent la structure des composés phénoliques de type flavonoïdes et non flavonoïdes respectivement. Les flavonoïdes sont composées de deux cycles benzéniques A et B liée à un noyau central pyranique C.

Par contre, les non flavonoïdes ont un groupe plus diversifié de composés de la plus simple les acides benzoïques (C6-C1), et stilbènes en C6-C2-C6 plus complexes, les lignanes et les gallotannins (C6-C3-C3-C6), et les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. On distingue: les tanins hydrolysables (Ellagitannins) et condensés (Muanda, 2010 ; Ozidal *et al.*, 2016).

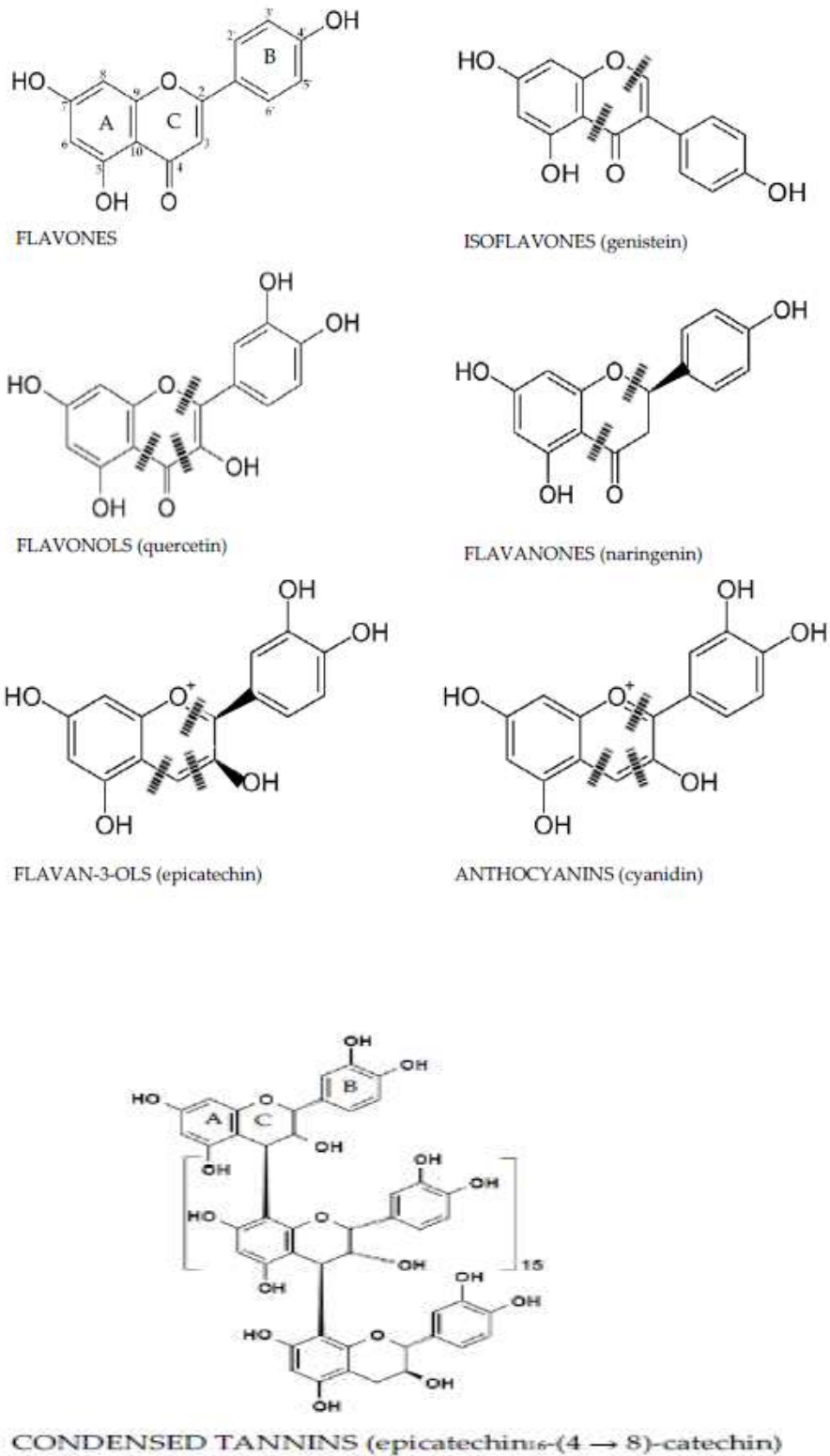


Figure 3 : Les flavonoïdes (Ozidal *et al.*, 2016).

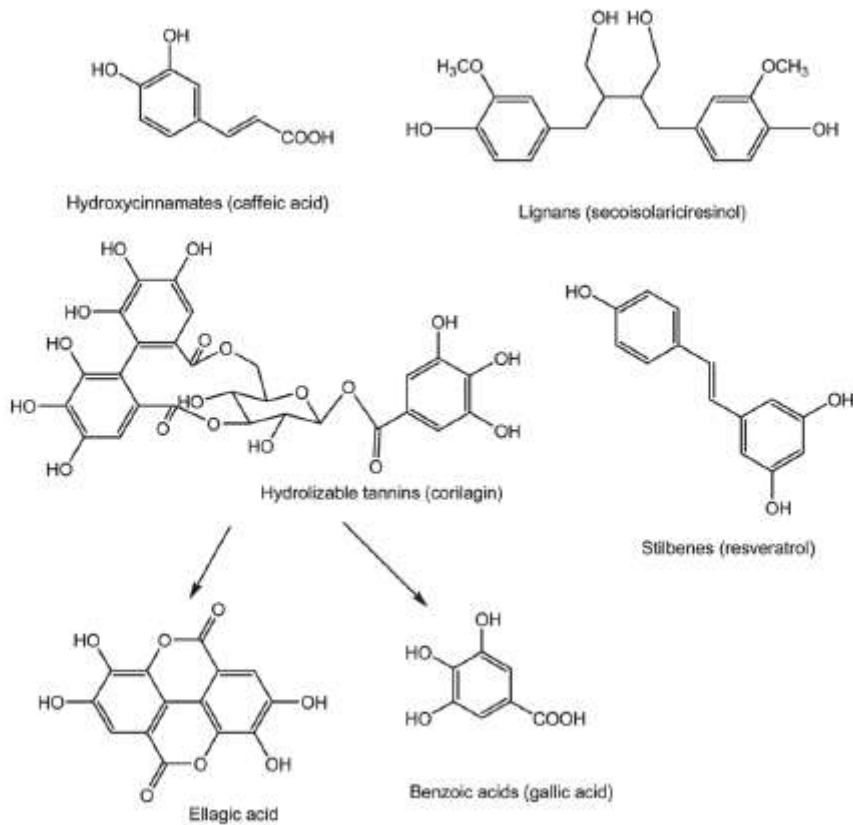


Figure 4: les polyphénols non flavonoïdes (Ozidal *et al.*, 2016).

II.2.3. Méthode d'Extraction des composés phénoliques par microonde (EAM)

Il existe plusieurs méthodes d'extraction tel que l'ultrason, macération. En 1986, en Hongrie, Ganzler et coll furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par microondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes la matière végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les microondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. Cette technique se présentait comme beaucoup plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire le temps d'extraction et donc les dépenses en énergies (Chemat et Lucchesi., 2005)

II.2.4. Avantages et inconvénients de la EAM

Par rapport aux techniques d'extraction classiques, les principaux avantages de la EAM sont sa rapidité, la réduction du volume de solvant utilisé, tout en ayant un rendement d'extraction amélioré. De plus, la EAM est simple d'utilisation et peu onéreuse. Néanmoins, c'est une technique d'extraction qui nécessite une étape de filtration et/ou de centrifugation

pour éliminer les particules solides après extraction. Par ailleurs, de faibles rendements d'extraction peuvent être obtenus lorsque des solvants apolaires ou volatils sont utilisés (Jones et Kinghorn, 2006).

II.2.5. Paramètres influençant l'extraction EAM

Lorsque la MAE est employée, cinq paramètres majeurs peuvent avoir une influence essentielle sur le rendement d'extraction et la qualité de l'extrait (Hosseinian *et al.*, 2007 ; Maheshwari *et al.*, 2011).

II.2.5.1. Nature et volume du solvant

Le choix du solvant d'extraction en EAM est fondamental pour obtenir un processus d'extraction optimal. Comme pour les autres techniques d'extraction ce choix est déterminé par la solubilité des molécules d'intérêt et par les interactions solvant-matrice. Cependant, en MAE le choix du solvant est surtout relié à sa capacité à absorber les micro-ondes. Le volume de solvant doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction (Thomas, 2012).

II.2.5.2. Temps d'extraction

Le temps d'extraction est l'un des avantages de la MAE, car il est généralement court: quelques secondes à plusieurs minutes (Thomas, 2012).

II.2.5.3. Température d'extraction

La température est l'un des paramètres les plus importants. Le rendement est meilleur à des températures élevées car la désorption des molécules d'intérêt est augmentée. Il convient de souligner que dans les systèmes fermés des températures supérieures au point d'ébullition des solvants peuvent être utilisées, améliorant ainsi le rendement d'extraction (Thomas, 2012).

II.2.5.4. Puissance d'irradiation

La puissance d'irradiation est choisie en fonction de la température et du temps d'extraction que l'on veut appliquer. Elle est généralement minimisée pour éviter d'atteindre des températures d'extraction trop élevées et à l'inverse, augmentée pour diminuer le temps D'extraction (Garnero, 1996).

II.2.5.5. Nature de la matrice

La teneur en eau de la matrice a une grande importance dans le processus d'extraction, car les molécules d'eau, qui ont une forte capacité à absorber les micro-ondes, jouent un rôle important dans le processus d'échauffement. En conséquence, l'obtention de résultats reproductibles exige le contrôle préalable de la teneur en eau de la matrice à extraire (Thomas, 2012).

II.2.6. Principe du plan d'expériences

La technique des plans d'expérience, basée sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux, consiste à faire varier simultanément les niveaux de un à plusieurs facteurs à chaque essai. Par rapport à une optimisation classique qui peut conduire à un nombre considérable d'expériences, cette méthodologie va permettre de diminuer le nombre d'expériences à réaliser, tout en augmentant le nombre de renseignements obtenus sans altérer la qualité des résultats (Goupy et Creighton, 2006). Outre l'influence de chaque facteur, il est possible d'obtenir des informations sur les interactions entre facteurs étudiés, et sur les paramètres optimaux par rapport à une réponse qui est une grandeur caractéristique de l'étude réalisée (Faucher, 2006).

II.2.7. Optimisation d'extraction par les plans d'expériences

Les plans d'expériences sont issus de méthodes mathématiques et statistiques appliquées à l'expérimentation. Cette théorie assure les conditions pour lesquelles on obtient la meilleure précision avec le minimum d'essais et de coût (Goupy et Creighton, 2006). Elle possède un vocabulaire qui lui est propre :

- Les facteurs qui sont l'ensemble des paramètres expérimentaux, contrôlables qui influencent sur un ou plusieurs critères caractéristiques du phénomène étudié.
- Les réponses, elles sont des grandeurs physiques mesurables.

La méthode des plans d'expériences cherche à déterminer et à faire établir les liens existants entre les deux variables précédemment citées, plus exactement elle vise à comprendre les relations liant la réponse avec les facteurs, que les facteurs entre eux (Goupy et Creighton, 2006).

II.3. Les alcaloïdes

Les composés azotés se divisent en deux groupes: les acides aminés et les alcaloïdes. se sont des substances organiques d'origine végétale, azotée et à caractère alcalin, douées des propriétés physiologiques prononcées même à faible dose. Les alcaloïdes les plus connus sont : la colchicine, l'atropine, le tubocurarine, la théine, la cocaïne, la mescaline, l'acide lysergique et l'aconitine, les structures de deux imino-sucres ayant des propriétés Antibiotiques appartenant à la famille des alcaloïdes (Muanda ,2010).

III.1. Activité antibactérienne des He.s et des polyphénols

De nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissantes activités antiseptiques des Hes agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus (Belletti *et al.*, 2008 ; Safaei-Ghomi et Ahd, 2010 ; Li *et al.* , 2014), leur conférant ainsi diverses indications thérapeutiques.

Les composés des Hes possédant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols, le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Le carvacrol est utilisé comme agent de conservation (Belletti *et al.*, 2004) à démontré que les He.s de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella Thyphimurium*.. Les Hes de plusieurs plantes se sont révélées efficaces contre les bactéries multirésistantes, notamment les *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3ème génération (C3GR).

L'Épigallocatechine-3-gallate et la catéchine ont montré des effets antimicrobiens contre un certain nombre d'agents pathogènes bactériens, tels que *Clostridium thermoaceticum*. La résistance à la chaleur de ces spores bactériennes a été plus rapidement diminuée par l'ajout de polyphénols de thé à haute température (Li *et al.*, 2014).

Les polyphénols réduisent les facteurs de virulence microbiens, tels que les adhésines, l'inhibition de la formation de biofilms, la neutralisation des toxines bactériennes. la combinaison des polyphénols avec des antibiotiques montre une synergie efficace réduisant ainsi la dose d'antibiotiques, et leur réactions indésirables (Li *et al.*, 2014).

De plus, il a été démontré que les combinaisons des composés phénoliques flavonoïde et non flavonoïde présentent une synergie ayant un effet antibactérien important sur les viandes (Li *et al.*, 2014).

III.2. Mécanisme d'action

Des études menées sur l'action antibactérienne des Hes et les polyphénols ont démontré la complexité de ce phénomène et la variété des sites d'actions. Les mécanismes semblent être nombreux. Toutefois, ils restent encore moins élucidés (Carson *et al.*, 2002).

Certains composés phénoliques et les Hes interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Pavel *et al.*, 2009).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides (Malechy, 2007).

D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (Khayour, 2002).

L'étude de l'influence de galangine sur *Staphylococcus aureus* a démontré que ce dernier favorise l'entrée du potassium intracellulaire en entraînant une lyse cellulaire par la pression osmotique.

Une étude menée par Cushine et ses collaborateurs (2005) sur l'activité antibactérienne de licochalcone A et C (flavonoïdes) a révélé que ces composés sont capables de réduire la consommation d'oxygène chez *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* par la détérioration du NADH-cytochrome-réductase.

Les flavonoïdes connus pour leur pouvoir antioxydant puissant pourraient avoir potentiellement un effet dans la chélation de fer et empêcher ainsi la pénétration intracellulaire du cofacteur Ca²⁺ à la cellule bactérienne, ce qui provoque l'inhibition de leur Activité (Basli *et al.*, 2012).

III.3.Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

L'efficacité antimicrobienne des Hes et les polyphénols dépend de deux principaux paramètres : leur composition chimique et le microorganisme ciblé (type, Structure...) (Kalemba et Kunicka, 2003).

III.3.1. Activité liée à la composition chimique

Le mode d'action des Hes et les polyphénols dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane puis la mort cellulaire.

Il est connu que ce sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui confèrent aux Hes leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées.

L'activité antibactérienne des polyphénols est directement liée à leur structure chimique. L'efficacité d'un composé phénolique dépend de son poids moléculaire et de son hétérogénéité (Hagerman et Bulter, 1981). La toxicité microbienne des polyphénols semble être relative à la position et au nombre de groupements hydroxyles du cycle phénolique; une augmentation de l'hydroxylation augmente la toxicité et l'activité antimicrobienne (Cowan, 1999).

III.3.2. Activité liée à la composition au microorganisme

La structure de la paroi des microorganismes intervient dans la résistance naturelle, ainsi, l'activité antibactérienne varie selon que la bactérie en question soit Gram⁻ ou Gram⁺. D'une manière générale, les polyphénols sont plus actifs sur les bactéries Gram⁺ que les bactéries Gram⁻. Cela revient au fait que la paroi des bactéries Gram⁻ limite la diffusion des composés hydrophobes par sa couche de lipopolysaccharides (Lambert *et al.*, 2001 ; Tian *et al.*, 2009). La résistance bactérienne aux Hes et aux polyphénols, liée à la formation du biofilm.

En effet, un isolat clinique récent peut montrer une Résistance augmentée, pouvant provenir des interactions avec les cellules de l'hôte (Alviano D., Alviano C., 2009). Tandis que les microorganismes évoluant sous forme planctonique sont plus susceptibles (Fine *et al.*, 2001).

IV. Notion sur les plantes étudiées

Les plantes aromatiques sont utilisées comme tous les végétaux en médecine, en agroalimentaire, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire. Elles font partie de notre quotidien sans que nous le sachions. Il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes des terpènes, stéroïdes et des composés polyphénoliques.

IV.1. *Rosmarinus officinalis* L

IV.1.1. Classification botanique

| | |
|-----------------------------|--|
| Règne : | plante |
| Embranchement : | Spermaphytes. |
| Sous-embranchement : | Angiospermes. |
| Classe: | Dicotyledones. |
| Famille : | Lamiaceae |
| Genre : | <i>Rosmarinus</i> |
| Espèce : | <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Quezel et santa, 1963) |

IV.1.2. Habitat et description

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires (Boullard, 2010).

Le *Rosmarinus officinalis* L. (Figure 5) dont le nom rose de mer vient simplement du fait qu'il pousse spontanément au bord de la mer (Iserin *et al.*, 2007) . Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'une bleue pale, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (Gonzalez-trujan0 *et al.* 2007et Atik bekkara *et al.* 2007). Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace (Delille, 2007).



Figure 5: *Rosmarinus officinalis* L. Djebel Antar, Béchar (Makhloufi, 2009)

IV.1.3. Composition et utilisation et propriétés thérapeutiques:

Le composé majoritaire des Hes du Romarin varie d'une région à l'autre. On trouve le 1-8 cinéole, le camphre, α -pinène, β -pinène, le pinène, le linalool, le limonène (Atik Bekkara *et al.*, 2007). Le Romarin est souvent cultivé pour son Hes. Dans la médecine traditionnelle, ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour traiter les céphalées et les migraines et les coliques. Il améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs. C'est un hypoglycémique, il soigne les affections oculaires (Heinrich *et al.*, 2006).

L'huile du romarin a été largement utilisée pendant des siècles, comme un des ingrédients en produit de beauté, savon, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (Arnold *et al.*, 1997).

IV.2. *Phoenix dactylifera* L

IV.2.1. Taxonomie et systématique

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* L. *Phoenix* dérive de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phoéniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus* dérivant du grec *dactulos* signifiant doigt, en raison de la forme du fruit. C'est une plante dioïque, c'est-à-dire existe des dattiers mâles (Dokhar) et des dattiers femelles (Nakhla). La classification du palmier dattier est comme présentée comme suit :

| | |
|-----------------------------|--|
| Embranchement : | <i>Phanérogames</i> |
| Sous embranchement : | <i>Angiospermes</i> |
| Classe : | Monocotylédones |
| Groupe : | <i>Phenocoides</i> |
| Ordre : | <i>Palmale</i> |
| Famille : | <i>Areacaceae (Palmaceae)</i> |
| Sous-famille : | <i>Coryphoideae</i> |
| Genre : | <i>Phoenix</i> |
| Espèce : | <i>Phoenix dactylifera</i> L (Laouini, 2014) |

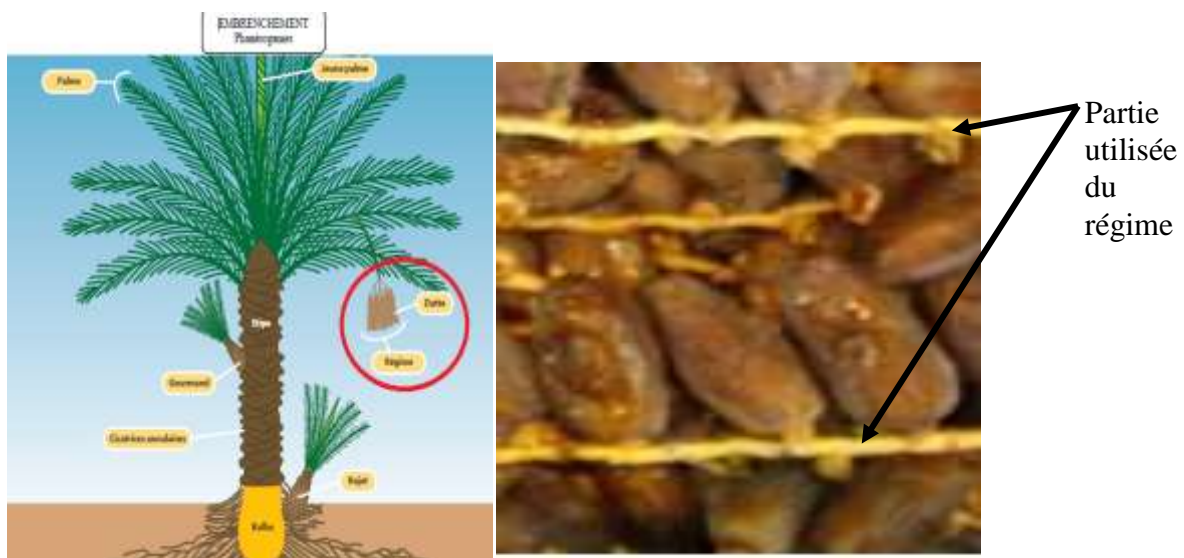


Figure 6: Les dattes et le régime du palmier *Phoenix dactylifera* L (Laouini, 2014).

IV.2.2. Répartition géographique du *Phoenix dactylifera* L

IV.2.2.1. Dans le monde

La culture du palmier dattier est concentrée dans les régions arides au Sud de la Méditerranée et dans la frange méridionale du proche Orient de puis le Sud de l'Iran à l'Est Jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest. L'Espagne reste le seul pays d'Europe à produire des dattes principalement dans la palmeraie d'Elche, située à l'Ouest d'Alicante. Le palmier dattier est aussi cultivé au Mexique, en Argentine et en Australie à L'Etats-Unis d'Amérique (Laouini, 2014).

IV.2.2.2. En Algérie

La culture du palmier dattier occupe toutes les régions situées sous l'Atlas saharien depuis la frontière Marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière Est Tuniso-libyenne. Du Nord au

Sud du pays, elle s'étend depuis la limite Sud de l'Atlas saharien jusqu'à Reggane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est. Le palmier dattier est cultivé principalement au niveau de quatre wilayas: Biskra 23 %, Adrar 22 %, El-Oued 21 % et Ouargla 15 %. En Algérie, les dattes les plus populaires sont : Hamraya (Deglet Hamra), Ghars et La Deglet Nour / Deglet-En-Nour qui veut dire « doigts de lumière » a été ramenée en Algérie vers le 8^{ème} siècle. Elle est qualifiée de « le renne des dattes » et l'un des produits phares de l'agriculture algérienne (Ben Abbes, 2011).

IV.2.3. Utilisation du *Phoenix dactylifera* L

Des travaux ont porté surtout sur les transformations biologiques en utilisant la pulpe de datte comme source de carbone. On cite à ce titre les produits obtenus par les conversions microbiennes qui sont des métabolites secondaires tels que l'alcool, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide lactique, l'oxytétracycline et la levure. D'autres travaux ont étudié les transformations technologiques de dattes pour produire des pâtes, des comprimés, des farines, vinaigre ou des sirops de dattes (Mrabet *et al.*, 2008; Acourene *et al.*, 2008, Benamara *et al.*, 2004). Les noyaux de dattes sont aussi utilisés pour la production d'une huile à haute capacité antioxydante ou pour la préparation des extraits à activité anti-rides (Bausa *et al.*, 2002). Dans ce même contexte de valorisation des dattes, certains aspects thérapeutiques ont été aussi évalués. L'activité immunostimulante, anti-tumeur, antioxydante, antimutagène, anti-inflammatoire, stimulatrice du transit gastro-intestinal, antibactérienne et antifongique sont vérifiées chez plusieurs extraits de datte (Laouini, 2014).



Deuxième partie

Partie pratique

I. Matériels et méthodes

Ce travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne de Hes de *Romarinus officinalis L* et l'extrait de *Phoenix dactylifera L*, a été réalisé au Laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia. L'extraction de l'He du romarin est effectuée au laboratoire BELAQ de DBK.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériels végétal

Le matériel végétal est constitué de :

- Régime de *Phoenix dactylifera L* a été récolté en Mai, 2016 dans la région Tébessa. Après nettoyage à l'eau distillée, la tige est séchée à l'air libre jusqu'à stabilité du poids, puis broyée et tamisée. La poudre ayant un diamètre inférieur à 125µm est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité) (figure7).

- Feuilles de *Romarinus officinalis L*: Les feuilles de *Romarinus officinalis L* ont été récoltées au mois de Mai 2016 à Tiaret. Les échantillons ont subi un séchage à l'ombre pour faciliter leur stockage.

I.1.2. Matériel biologiques

I.1.2.1. Les souches bactériennes

Deux souches psychrotrophes à savoir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas Sp.* isolée de l'espadon congelée sont utilisées pour cible. Les souches sont entretenues par repiquages successifs sur gélose nutritive à 37 °C.

I.2. Méthodes



Figure 7: Les étapes suivies pour la préparation de la poudre de *P. dactylifera*

I.2.1. Extraction des composés Phénolique

I.2.1.1. Principe d'extraction par micro-onde (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». Le principe de l'extraction par micro-ondes est d'apporter, très sélectivement, une grande quantité d'énergie à l'intérieur de la cellule végétale ou biologique pour provoquer sa rupture sans dégrader les produits libérés. En absorbant, l'énergie des microondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules, facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Kaufmann *et al.*, 2001).



Figure 8 : Photographie du dispositif d'extraction des composés phénolique par EAM

I.2.1.2. Etude préliminaire

Une étude préliminaire a été effectuée dans le but de sélectionner les conditions optimales d'extraction des composées phénoliques. La méthodologie consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un. L'effet de chaque paramètre est évalué en déterminant la teneur en polyphénols totaux. Nous avons adopté pour une optimisation par plan d'expériences (plan factoriel). Les résultats obtenus sont utilisés dans le but d'optimiser les conditions d'extraction à l'aide de surface de réponse.

Tableau I : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire

| Type de solvant | Temps d'irradiation (s) | Puissance d'irradiation (w) | Acidité (pH) |
|-----------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Eaux | 30 | 100 | 2 |
| Acétone | 60 | 200 | 2.5 |
| Ethanol | 90 | 300 | 3.5 |
| Méthanol | 120 | 400 | 4 |
| | 150 | 500 | 5 |
| | 170 | 600 | 7 |
| | 210 | 700 | |
| | | 800 | |

I.2.1.3. Paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)

Différents facteurs peuvent influencer la qualité d'EAM. Dans notre étude, les paramètres expérimentaux qui seront pris en compte dans l'optimisation sont le type du solvant, le temps d'extraction, la puissance d'irradiation de micro-ondes, le pH du meilleur solvant extracteur. Il a été décidé de couvrir toute la gamme de puissance disponible sur l'appareil micro-ondes dont nous disposons (100-900W) (Thomas, 2012).

I.2.1.4. Extraction des composées phénoliques assistée par micro-ondes

L'extraction par micro-ondes des composés phénoliques de la poudre du régime de datte a été réalisée comme suit :

Dans un ballon d'extraction, 0,12 g de la poudre est mélangé avec un 10mL de solvant. Les échantillons sont placés dans une micro-onde, par la suite, les extraits obtenus sont soumis à une filtration à l'aide d'un papier filtre.

I.2.1.5. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué en utilisant le réactif de folin–Ciocalteu (Boudjellal, 2009). Le réactif est formé d'acide phosphotungstique H₃PW₁₂O₄₀ et d'acide phosphomolybdique H₃PMo₁₂O₄, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₃), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à 760 nm.

60µl de l'extrait sont mélangés avec 1ml du réactif FC et 800 µl de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 10mn et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe D'étalonnage de l'acide gallique (annexe 04).

I.2.1.6. Modélisation du plan d'expériences

Afin d'étudier l'influence des facteurs sur les réponses choisies, nous nous sommes orientés vers la réalisation d'un plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux. Toutes les combinaisons des différents niveaux de facteurs sont réalisées au cours de l'expérience. Les trois facteurs choisis ont été étudiés entre un niveau inférieur (-1) et un niveau supérieur (+1): le temps d'irradiations micro-ondes (90<T<210 sec), la puissance micro-ondes (500<P<600 W) et le pH du meilleur solvant extracteur (2<pH<7). La matrice expérimentale du plan d'expériences est donnée dans le tableau 1. L'effet des facteurs et de leurs interactions de premier ordre (TP, TpH, pHP) ont été modélisés par l'équation suivante:

$$Y = \beta_0 + \beta_T \times X_T + \beta_P \times X_P + \beta_{pH} \times X_{pH} + \beta_{TP} \times (X_T \times X_P) + \beta_{TpH} \times (X_T \times X_{pH}) + \beta_{pHP} \times (X_P \times X_{pH})$$

- Y est la réponse
- β_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, noté 0
- β_i est l'effet du facteur i
- β_{ij} est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j
- X_i est le niveau attribué au facteur i

Les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire afin de minimiser des contraintes extérieures inconnues.

Tableau II : Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les trois facteurs étudiés : Les niveaux -1, 0 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur, le centre, et le niveau supérieur du domaine d'étude

| Expérience | X1(pH) | X2(Temps) | X3(W) |
|------------|--------|-----------|-------|
| -1 | 2 | 90s | 500 |
| 0 | 4.5 | 150s | 600 |
| +1 | 7 | 210s | 700 |

I.2.1.7. Analyse statistique

Chaque essai d'extraction et toutes les analyses ont été effectuées 3 fois et toutes les données ont été rapportées en moyenne \pm E.T.L'influence de chaque facteur sur le rendement de PT dans l'expérience a un seul facteur pour le EMA a été statistiquement évaluée par le test post hoc ANOVA et Tukey's a un niveau de confiance de 95% 2. $P < 0,05$ a été pris comme niveau significatif le logiciel JMP (version 7.0, SAS) a été utilisés pour analyser toutes les

Résultats et pour la réalisation du RSM (Dahmoune *et al.*, 2013).

I.2.2. Extraction des Hes

I.2.2.1. Description du dispositif d'extraction

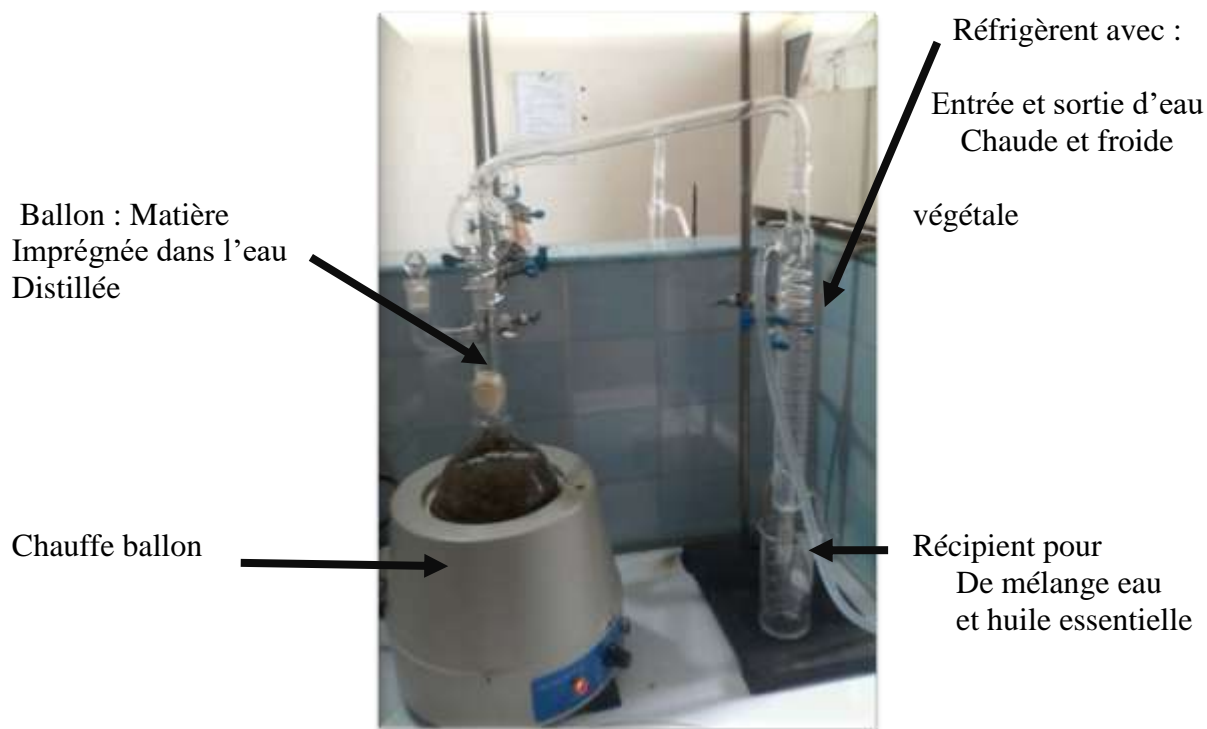


Figure 9: Dispositif utilisé pour l'extraction des H.E par hydrodistillation

I.2.2.2. Procédé d'extraction

100 g des feuilles sèches sont mises dans un ballon à fond rond, additionnées de 600ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 4 heures, l'He est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le Condensateur (Amarti *et al.*, 2009). Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la Surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'He obtenue est gardée au réfrigérateur à 6° C et à l'obscurité.

La récupération de cette huile est réalisée dans une ampoule à décanter de 250ml, dans laquelle, le mélange précédent, se sépare en deux phases non miscibles.



Figure 10: Séparation des H.es par décantation

I.2.2.3. Détermination du rendement des huiles essentielles extraire

Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné Par la formule suivante :

$$\boxed{R = (M - M_0 / M_T) \times 100}$$

RHE : rendement en huile essentielle des fleurs sèches % ;

M : masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches g ;

M₀ : masse de bicher vide g ;

M_T : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme g ;

I.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

I.2.3.1. Préparation de l'inoculum

I.2.3.1.1. Préparation de pré-culture

Les tests antibactérienne doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB). Après incubation pendant 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis incubées à 37 °C pendant 18 heures.

I.2.3.1.2. Préparation des suspensions bactériennes

A Partir de la culture bactérienne jeune (sur GN), quelques colonies sont prélevées et dissoutes dans de l'eau physiologique stérile dans un tube stérile, on agit au vortex pendant quelques secondes.

Ensuite, nous avons standardisé la charge de l'inoculum en mesurant la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre en partant du principe que, la densité optique (DO) comprise dans l'intervalle allant de 0.08 à 0.1, est équivalente à une charge bactérienne de 10^7 UFC/ml à 620nm (Gachkar *et al.*, 2007).

L'activité antibactérienne d'huile de romarin, des polyphénols de *P. dactylifera L.*, l'acide acétique (dilué à 1/8) et de leurs combinaisons a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose.

I.2.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion

L'ensemencement de gélose Muller Hinton a été fait avec écouvillonnage à partir de la suspension 10^7 UFC/mL. Des disques stériles de 6 mm sont imprégnés de 20 µl d'extrait (Gülçin, 2004). L'extrait peut être de L'He supplémentée de 10% de DMSO, de l'acide lacétique (1/8), de l'extrait brut de *P. dactylifera L.* L'effet antimicrobien est apprécié par la mesure de la zone d'inhibition autour du disque. Le témoin négatif consiste en un disque imprégné de 20 µl de DMSO. Après 2h d'incubation à 4 °C, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18h-24h,

Avec cette méthode, est déterminé l'effet antibactérien des polyphénols extraits de régime de dattes, d'huile essentielle de Romarin, à différentes concentrations (le 100% est l'He sans dilution, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%). De la même manière, nous avons étudié l'effet de l'acide acétique avec plusieurs concentrations allant de 25%, à 1.56% sur les deux souches testées.

Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des d'extraits (Ponce *et al.*, 2003).

Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

I.2.3.3. Etude la synergie entre l'extrait phénolique, l'huile essentielle et l'acide acétique

Dans le but d'avoir un meilleur effet antibactérien, les trois agents antibactériens testés individuellement ont été mélangés et les différentes combinaisons (tableau III) ont été testées selon le protocole préétabli.

Tableau III : La série des dix mélanges employé dans le test de l'activité antibactérienne

| Extrait Combinaison | L'acide acétique (1/8) | Extrait phénolique 100% | He.s (95%) |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------|
| E1 | 0 | 0 | 100 |
| E2 | 0 | 100 | 0 |
| E3 | 100 | 0 | 0 |
| E4 | 33 | 33 | 33 |
| E5 | 66 | 16 | 16 |
| E6 | 16 | 16 | 66 |
| E7 | 16 | 66 | 16 |
| E8 | 0 | 50 | 50 |
| E9 | 50 | 0 | 50 |
| E10 | 50 | 50 | 0 |
| E11 | 25 | 75 | 0 |
| E12 | 0 | 25 | 75 |
| E13 | 75 | 0 | 25 |

I. Résultat et discussion

I.1.Extraction des polyphénols de Palmier dattier du *Phoenix dactylifera* L

I.1.1.Etude préliminaire pour la sélection des conditions d'extractions appropriées

L'extraction est l'une des étapes essentielles de la recherche des métabolites secondaires végétaux. L'efficacité générale d'extraction des composés phénoliques est influencée par de nombreux paramètres (Dahmoun *et al.*, 2013). L'étude préliminaire a été réalisée afin de déterminer les champs expérimentaux appropriés à prendre en considération au cours du processus d'optimisation (un rendement maximal en polyphénols totaux (PT). Dans cette étude, les effets de la puissance micro-ondes, le temps d'irradiation, le type du solvant et l'acidité du solvant ont été systématiquement étudiés séparément. Les résultats sont Présentés dans le (tableau IV).

I.1.1.1.Effet du solvant

Les solvants testés (éthanol 99%, acétone 99%, le méthanol 99% et l'eau) sont les solvants les plus couramment utilisés dans l'extraction phénolique des matériaux botaniques (Dahmoun *et al.*, 2013). Le type de solvant influence de façon significative sur le rendement de PT dans le régime de datte. L'eau et l'acétone (de 6.32 mg EAG/g MS et 6.17 mg EAG/g MS respectivement). Et l'eau a été fixée comme solvant d'extraction pour le reste des expériences.

En outre, la constante diélectrique de l'eau est de ($\epsilon' = 80,4$) ce qui le rend adéquat pour l'extraction des composés phénoliques. Vu que la méthode d'extraction utilisée est celle assistée par micro-onde, des études ont démontré que l'eau est un bon absorbant de l'énergie de microondes, pour une telle méthode d'extraction, L'eau possède une constante diélectrique la plus élevée et le facteur de dissipation faible ($\tan \delta = 1,570$), par conséquent, la vitesse par laquelle l'eau absorbe l'énergie des micro-ondes est supérieure à la vitesse à laquelle le système peut dissiper la chaleur, ces phénomènes expliquent l'effet "sur chauffage " qui se produit lorsque l'eau est utilisée (Prestos et Komaitis, 2008).

Selon la loi de polarité, l'eau qui a permis d'extraire le maximum de composés phénoliques peut s'expliquer par le fait que le régime de datte est riche en polyphénols de polarité élevée.

Tableau IV : Les résultats des expériences à un seul facteur par micro-ondes assisté extraction. Les résultats sont présentés comme des moyennes ± E.T. Mêmes lettres dans la même colonne se réfèrent à des moyennes non statistiquement différentes selon le test d'ANOVA et Tukey. TPC, le rendement des phénols totaux visés en poids sec (MS) Du régime de datte; EAG, équivalents d'acide gallique.

| Solvant | | Acidité | | Temps d'irradiation | | Puissance d'irradiation | |
|--------------|--|---------|--|---------------------|--|-------------------------|--|
| Type | TPC (mg _{EAG} /g _{ES}) | pH | TPC (mg _{EAG} /g _{ES}) | (s) | TPC (mg _{EAS} /g _{ES}) | (W) | TPC (mg _{EAG} /g _{ES}) |
| Eau distillé | 6.325 ± 0.182 ^a | 2 | 7.812 ± 0.03 ^{ab} | 30 | 6.147 ± 0.649 ^b | 100 | 6.04 ± 0.195 ^b |
| Acétone | 6.175 ± 0.084 ^a | 2.5 | 7.692 ± 0.057 ^{ab} | 60 | 6.327 ± 0.183 ^b | 200 | 6.148 ± 0.254 ^b |
| Méthanol | 5.138 ± 0.173 ^b | 3.5 | 6.382 ± 0.286 ^c | 90 | 8,239 ± 0.03 ^a | 300 | 5.996 ± 0.320 ^b |
| Ethanol | 4.836 ± 0.045 ^b | 4 | 6.429 ± 0.309 ^c | 120 | 8.071 ± 0.441 ^a | 400 | 6.30 ± 0.388 ^b |
| | | 5 | 7.458 ± 0.176 ^b | 150 | 8.471 ± 0.062 ^a | 500 | 6.765 ± 0.198 ^b |
| | | 7 | 8.475 ± 0.265 ^a | 180 | 7.724 ± 0.644 ^a | 600 | 8.456 ± 0.035 ^a |
| | | 210 | 8.109 ± 0.092 ^a | 700 | 6.561 ± 0.660 ^b | | |
| | | 800 | 4.113 ± 0.098 ^c | | | | |
| | | | | 900 | 3.741 ± 0.398 ^c | | |

I.1.1.2. Effet des fréquences

La puissance des micro-ondes émises influencent de façon significative le rendement en PT (Tableau IV). Le rendement maximal en PT obtenu à différente puissance a été significativement différent, le rendement augmente avec la puissance micro-ondes de 100 à 600 W. Le résultat obtenu est probablement dû à une amélioration de la récupération des composés phénoliques en raison d'un effet de chauffage avec une augmentation conséquente des phénomènes de transfert de masse (Dahmoun *et al.*, 2013). En effet, l'élévation de la température augmente la solubilité et la diffusivité de la solution et réduit sa viscosité et, par conséquent une meilleure diffusion du solvant dans les parties internes de la matrice. Le rendement diminue de 700 à 900, ce qui peut être traduit par une dégradation des composés phénoliques.

La puissance 600w a été utilisée pour les prochains essais à un seul facteur.

1.1.1.3. Effet du temps d'irradiation

Le temps d'extraction est un autre paramètre important influençant l'extraction des composés phénoliques. Le rendement est meilleur quand le temps est compris entre 90-150s. Sachant que c'est le chauffage des traces microscopiques d'humidité qui va conduire à un meilleur transfert de matière intracellulaire, d'où un meilleur rendement. En effet, l'augmentation du temps d'extraction accroît les chances d'un chauffage total de ces traces microscopiques. De plus, l'augmentation de temps assure un meilleur contact solvant/matrice, ce qui donne effectivement un meilleur rendement (Ghafoor *et al.*, 2009). Le temps d'extraction qui a donné le meilleur rendement en composés phénoliques 150s, avec dégradation thermique apparente des composés phénoliques à plus longs temps d'irradiation (Proestos et Komaitis, 2008). Une diminution du rendement est marqué au-delà de 150s, cela peut s'expliquer par la prolongation de temps susceptible d'augmenter le risque de décomposition et l'oxydation des composés phénoliques en raison de leur longue exposition à des facteurs environnementaux défavorables telles que la température, la lumière et l'oxygène (Naczki et Shahidi, 2004). Cette réduction peut, également, être bien expliquée par la loi de la diffusion de Fick, qui démontre qu'un équilibre final entre les concentrations de soluté dans la matrice solide (matrice végétale) et dans la solution en vrac (solvant) peut être atteint au bout d'un certain temps, ce qui conduit à la décélération dans le rendement d'extraction (Silva *et al.*, 2007).

D'autre part, le temps d'extraction prolongé peut augmenter la perte de solvant par évaporation qui affecte directement la perte de taux solvant-solide de l'extraction. Sur la base de ces résultats, 150s a été sélectionné pour le prochain facteur, tandis que la gamme 90-210s a été choisie pour les essais MSR.

I.1.1.4. Effet du pH

Le pH est un des facteurs qui joue un rôle très important dans la procédure d'extraction. Les phénols insolubilisés au niveau des parois pectocellulosique et dans la cutine ou la suberine ne peuvent être facilement extraits, d'où l'intérêt d'hydrolyses chimiques des parois cellulaires. Le (tableau IV). Montre que le pH influence de façon significative le rendement de PT. La teneur en ces composés augmente avec l'élévation du pH 2 ; 2,5 ; 5 et atteint le meilleur rendement à pH 7. Il a été rapporté qu'à pH <3, les anthocyanes sont plus stables, alors qu'à pH 7, les polyphénols sont sous forme quinonique ou chalcone, les proanthocyanidines sont obtenus à un pH de 3,5. Le terme «proanthocyanidines» est dérivé du fait qu'ils sont clivés en anthocyanidines lors d'un traitement thermique à pH acide. (Zam *et al*, 2012).

La diminution du pH à 3.5 et 4 peut être expliquée par l'estérification du COOH libre des anthocyanosides acylés par un diacide ou leur oxydation (Zam *et al*, 2012).

Sur la base de ces résultats, le pH 7 a été sélectionné pour le prochain facteur et la gamme de pH entre 2 et 7 a été choisie pour les essais MSR.

I.1.2. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, la faible spécificité du réactif est l'inconvénient principale du dosage colorimétrique, le réactif est très sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles (Vuorela, 2005).

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage et exprimées en milligrammes par grammes de la matière sèche équivalent en acide gallique en utilisant l'équation :

$$y = 9.4488x + 0.0263 \text{ avec } R^2 = 0.999$$

Les différents dosages ont mis en évidence la présence des polyphénols en (mg EAG/g MS) dans quatre solvants différents. La plus faible valeur est enregistrée par l'éthanol 4.83 mg EAG/g MS et 4.13, 6.17 mg EAG/g MS sont les valeurs enregistrées respectivement par le méthanol et l'acétone ce qui peut être expliqué par la faible solubilité des polyphénols dans les solvants organiques purs due au renfermant des liaisons hydrogènes entre les polyphénols et les protéines qui s'y trouvent. Le solvant qui donne un dosage en polyphénols le plus élevé est l'eau dont la polarité est élevée par rapport aux autres solvants avec une valeur de 6.32 mg EAG/g MS., ce qui est en concordance avec l'étude réalisée par (Dahmoun *et al.*, 2013) sur Citrus limon avec une valeur enregistrée 7.38 mg EAG/g MS.

La polyphénol oxydase peut être responsable d'une baisse du taux de polyphénols totaux. Lors de l'extraction et qu'une concentration de 70 % de solvant est nécessaire pour inhiber l'activité de cette enzyme (Lapornike *et al.*, 2005). Plusieurs facteurs peuvent affecter l'extraction et la teneur des polyphénols, notamment l'origine de la plante sa provenance géographique la saison de la récolte, l'âge de la matière. Les teneurs en composés phénoliques sont élevées lorsque les conditions de vie ne sont pas adéquates, il s'agit d'un mécanisme d'adaptation et de survie qui pousserait la plante à synthétiser des métabolites secondaires dans un but protecteur.

I.1.3.Optimisation de l'extraction assistée par microondes

I.1.3.1.Modélisation et optimisation en utilisant CCD-MSR dans le processus

d'extraction

Les résultats de la modélisation de l'extraction des polyphénols ont été réalisés à l'aide du logiciel JMP 7. Il est utilisé pour le traitement des résultats de modèles expérimentaux. Toutes les expériences effectuées ont été répétées trois fois pour évaluer la qualité du modèle établi.

D'après la conception des composés centraux (CCD), des expériences ont été réalisées afin de connaître les conditions de combinaisons optimales. Trois variables indépendantes (puissance micro-ondes, le temps, et le pH du solvant) ont été optimisés en utilisant CCD.

Le rendement d'extraction par micro-ondes a été estimé par la mesure de PT. A la conception expérimentale par le CCD, 17 essais de l'extraction dont trois répétitions du point central ont été réalisées.

I.1.3.2. Evaluation de la qualité du model

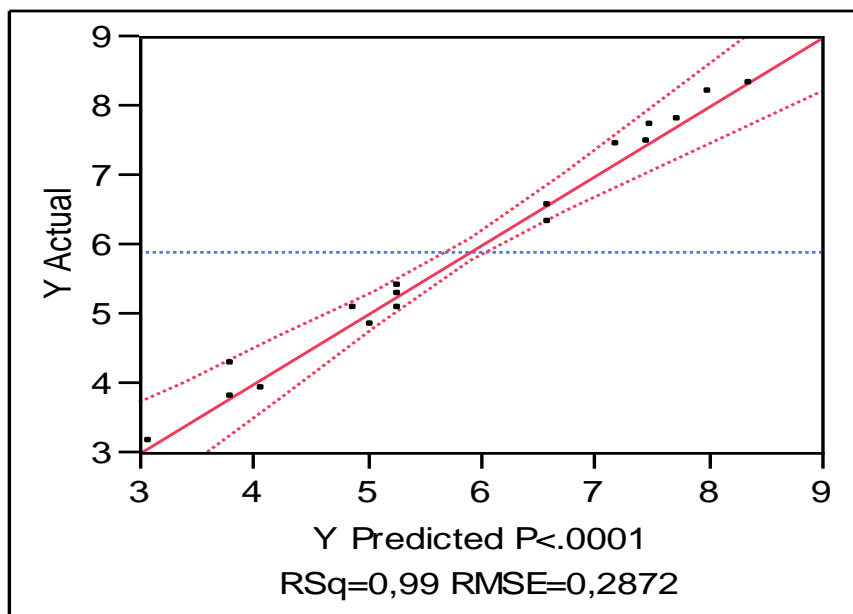


Figure 11 : Régression linéaire du model quadratique

L'évaluation de la qualité estimée du modèle quadratique choisi pour modéliser les conditions d'extraction des polyphénols a été effectuée à l'aide d'outils statistiques: la régression linéaire et la régression ajustée ces deux derniers ont été déterminés par le logiciel de conception expérimentale JMP7.

La régression linéaire du modèle, a permis d'évaluer graphiquement la qualité du modèle mis en place. Il est représenté par la linéarité des points mesurés par le modèle réel en fonction des points considérés par l'équation quadratique. La validité du modèle est déterminée si le coefficient de la régression linéaire ou de détermination est égal ou supérieur à 0,80. L'analyse de régression linéaire est représentée sur la (Figure 11). Le coefficient de détermination R^2 est égal à 0,99. Et Le coefficient de la régression ajusté R^2_A est égal à 0,97 (tableau VI). Ceci montre que plus de 97% de variation observée est expliqué par les effets directs des facteurs. Le coefficient ajusté du modèle permet d'évaluer la qualité de l'ajustement du modèle établi Les résultats du coefficient de détermination et de détermination ajusté R^2 et R^2_A (0.99 ,0.97 respectivement) sont des coefficients très proches à 1. Ce qui montre que le model quadratique est adéquat (Rhazi *et al*, 2015).

I.1.3.3. La validation du modèle quadratique pour la modélisation d'EAM

Le (tableau VI) montre les résultats d'une analyse de variance pour la validation du modèle adéquat. Les valeurs de probabilité ($P > F$) inférieure à 0,05 et 0,01 indiquent que le modèle est respectivement significatif et très significatif, et les valeurs supérieures à 0,05 indiquent que le modèle n'est pas significatif. D'après le (tableau VI), l'analyse de la variance montre que le modèle était hautement significative avec une valeur $p < 0,0001$, ce qui signifie que le modèle représente les données de manière satisfaisante. En outre, les valeurs de l'erreur pure est très faible 0.054, ce qui indique une bonne reproductibilité des données. la valeur prédite ($8,80 \pm 0.56$ mg EAG /g MS), qui est très proche de la valeur expérimentale (8.25 ± 0.03 mg EAG /g MS) (figure 12), ce qui implique un degrés de corrélations élevé entre les données observées et les valeurs prédites du modèle de régression (Dahmoun *et al.*, 2013 ; rhazi *et al.*, 2015). (Tableau V) ceci est encore démontré par les coefficients de détermination R^2 et les coefficients ajustés R^2_A qui sont proches de 1. Le défaut d'ajustement n'est pas significatif ($P > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme la validation du modèle (Chin *et al.*, 2010). Dans un model, si la P -value du défaut d'ajustement est significative, ce model sera rejeté (Granato *et al.*, 2011).

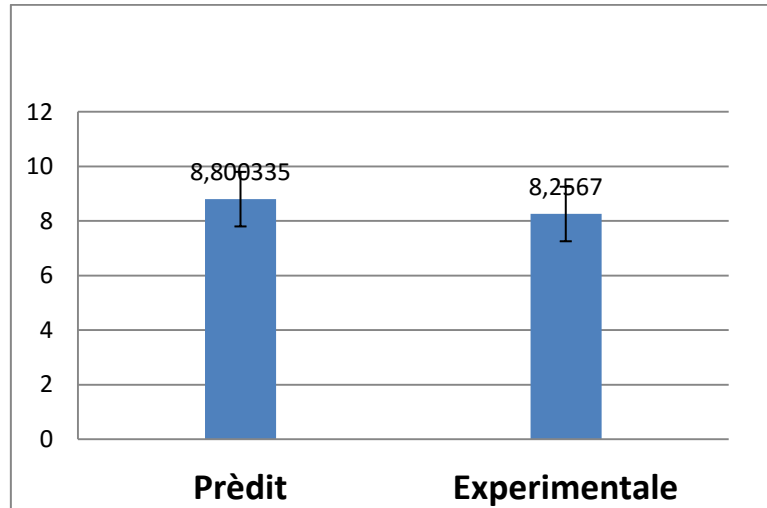


Figure 12 : Les valeurs expérimentale et prédite (optimum).

Tableau V: L'analyse de variance (ANOVA) pour des résultats expérimentaux obtenus en utilisant MAE.

| Source | Sum of squares | Rapport F | P-value Prob>F |
|---------------------|----------------|-----------|----------------|
| Model | 44,479807 | 59.9116 | <0.0001 |
| Défaut | 0, 52322825 | 3, 8606 | 0, 2184 |
| D'ajustement | | | |
| Erreur Pure | 0, 05421267 | / | / |
| R2 | 0,987184 | | |
| R2 adj | 0,970707 | | |

I.1.3.4.Détermination de l'équation du model

Après avoir validé le modèle quadratique établi des polyphénols, l'équation de ce modèle peut être déterminée. Les coefficients sont estimés par la méthode des moindres carrés. Ils sont dits significatifs si la valeur p était inférieure à 0,01. Les effets significatifs sont présentés sur la (Figure13). L'effet linéaire, des trois facteurs (temps d'extraction et pH du meilleur solvant extracteur et la puissance des micro-ondes), l'effet quadratique de ces facteurs et leurs interactions sont très importantes ($P < 0, 0001$), pour améliorer les rendements des polyphénols extraits par micro-ondes. L'équation du modèle quadratique est utilisée pour la modélisation les conditions d'extraction des polyphénols, déterminée selon les résultats du logiciel JMP 7 (Rhazi *et al*, 2015), les effets non significatifs ($P > 0,01$) ont été négliger (Dahmoun *et al.*, 2013). L'équation de prédiction suivante a été obtenue:

$$\text{équation: } Y = 5.28 + 0.70X_1 - 1.39 X_2 - 0.55 X_3 + 0.63 X_1X_2 + 0.36 X_1X_3 - 0.32 X_2 X_3 + 2.02 X_1^2 - 0.06 X_2^2 - 0.92 X_3^2 \quad (1)$$

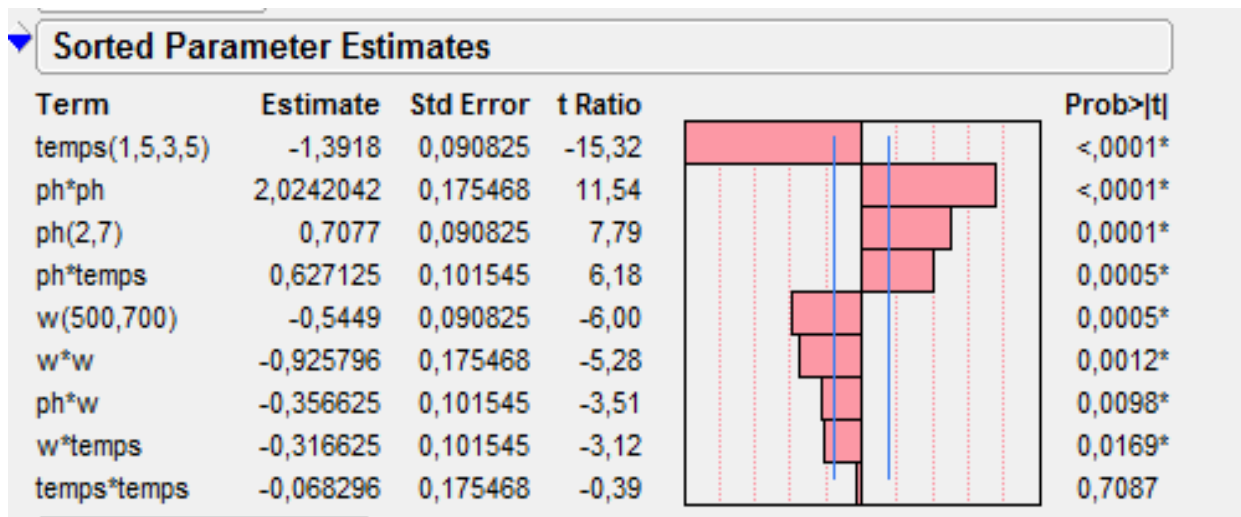


Figure 13: Effets significatifs des coefficients du modèle d'équation établie de polyphénols

L'équation montrent que le facteur qui possède une influence significative positive sur l'extraction des PT de la poudre du régime de datte est le pH (X1), avec une probabilité $P=0,001$ et un coefficient de l'ordre de $\alpha= 0.70$.

Par contre, le temps d'irradiation (X2) et la puissance d'irradiation (X3) possèdent une influence significative négative avec les probabilités $P=0,001$, $P=0,005$ et des coefficients de l'ordre de $\alpha= -1.39$, $\alpha= -0.55$, respectivement

L'effet quadratique le plus prononcé est représenté par l'effet X1X1(pH*pH) avec une probabilité de l'ordre de $p<0.0001$, suivi par l'effet quadratique de X3X3 (W*W) avec une probabilité de l'ordre de $p=0.0012$, les deux sont inférieurs à 0.05. Contrairement à l'autre effet quadratique X2X2(temps*temps) qui est non significatif avec une probabilité $P>0.05$ (0.7087).

I.1.3.5. Analyse de la réponse de surface

Après validation du modèle établi des polyphénols, les conditions d'extraction optimales ont été déterminées en utilisant le profil de prédiction (figure 14) et la méthode de surface de réponses.

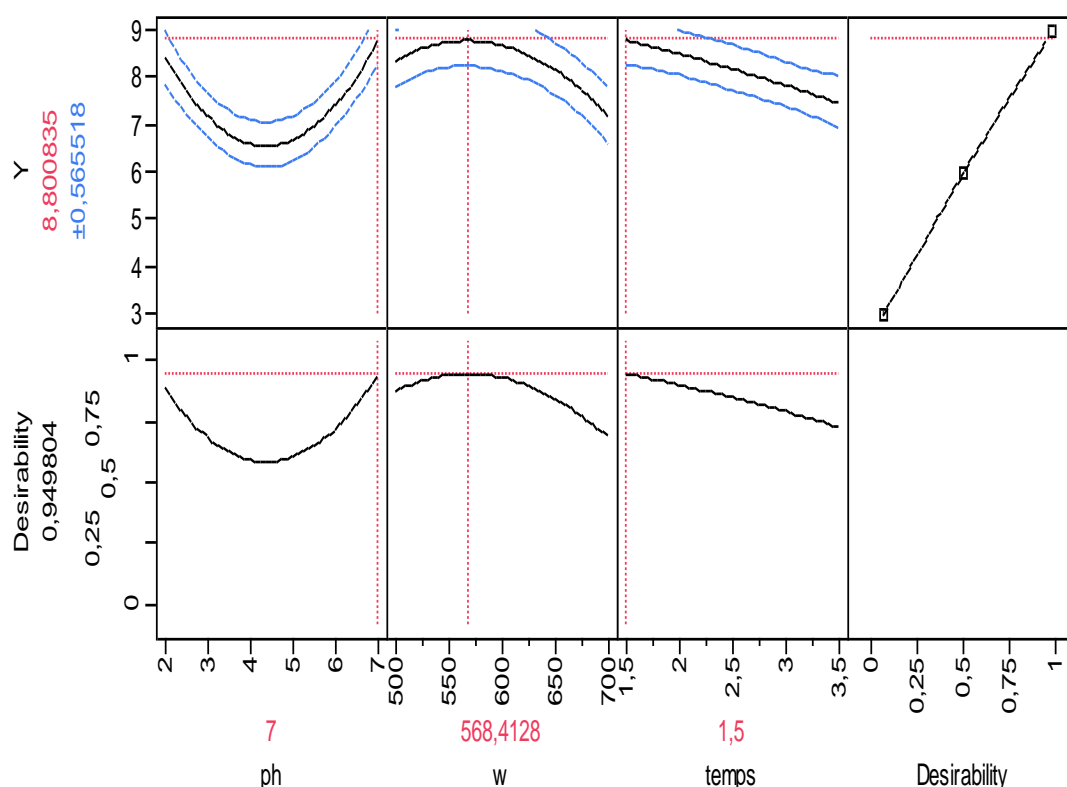


Figure 14 : Profil de prédiction déterminant les conditions optimales d'extraction pH (X1)=7, temps d'irradiation (X2)=1.5min et la puissance d'irradiation(X3)=600W. 8,800335 ±0.565518 mg EAG /g MS est l'optimum d'extraction.

Le profil de prédiction permet de visualiser les conditions optimales de trois facteurs lorsque l'un des facteurs a été fixé et déterminer le meilleur rendement d'extraction. Elle permet également, de comparer la valeur estimée (prédite) avec la valeur réelle (expérimentale). Les conditions optimales pour extraire les polyphénols, déterminées à l'aide du logiciel JMP7 sont représenté sur la (figure14). Indiquant que la teneur maximale en polyphénols est de 8,80 ±0.56 mg EAG /g ES, dans les conditions suivantes: puissance d'irradiation 600 W, temps d'irradiation a 1min 30s, pH 7 du meilleur solvant extracteur.

La meilleure façon de visualiser l'influence des variables indépendantes sur une variable dépendante est le modèle de réponse de surface (Wei *et al.*, 2009), qui joue un rôle clé dans l'identification de la valeur optimale des variables indépendantes pour que la variable dépendante pourrait atteindre le maximum (Sun *et al.*, 2011).

Les tracés 3D de la réponse de surface sont des représentations graphiques de l'équation de régression (1). Ils proposent une méthode pour visualiser la relation entre la réponse et les niveaux expérimentaux de chaque variable et le type d'interaction entre deux

variables. La conception du MRS avec 17 expériences a été utilisée pour optimiser les trois variables (puissance d'irradiation, temps d'irradiation et le pH), visant à maximiser le rendement du TPC.

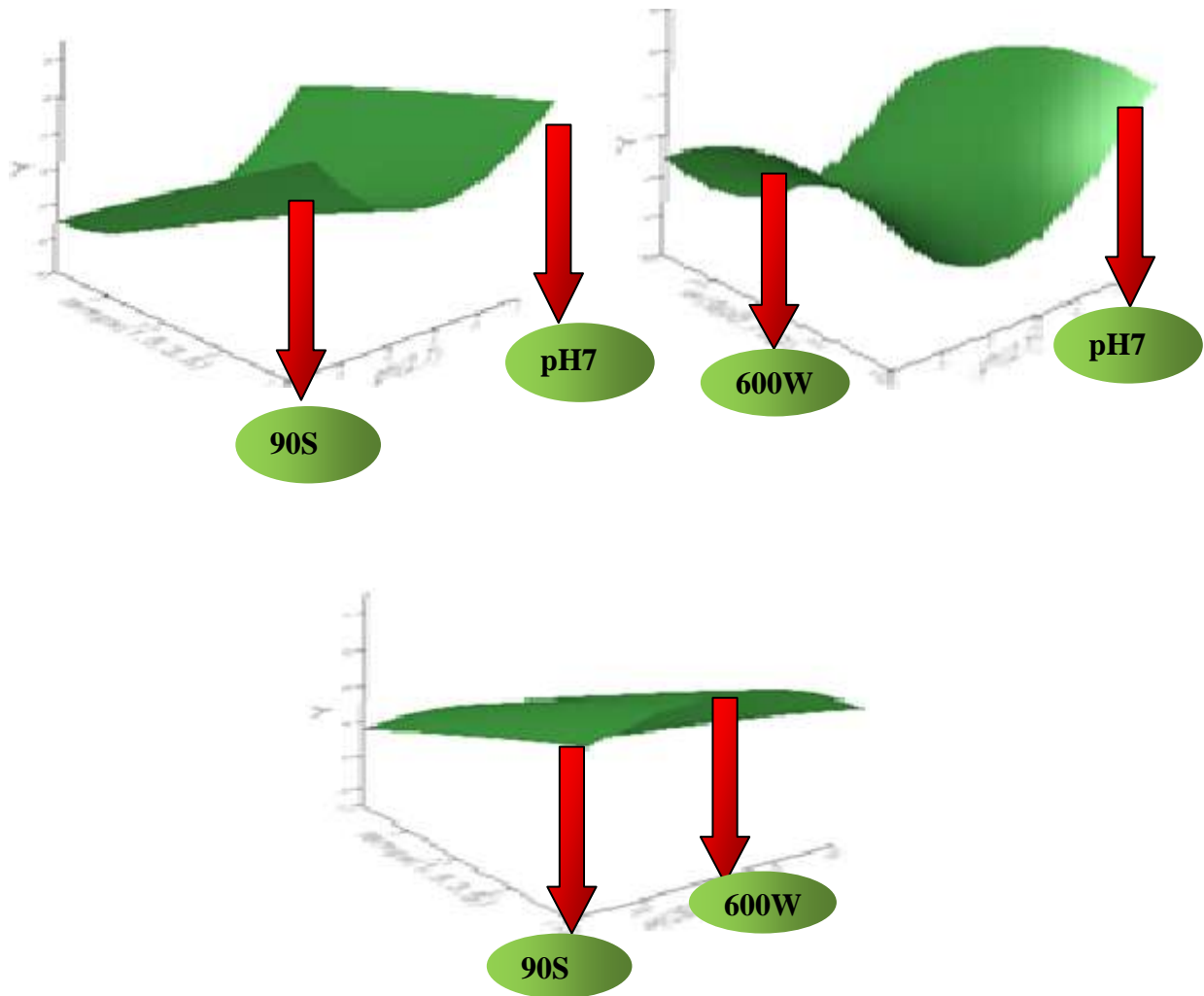


Figure 15: l'effet des interactions : (pH*temps), (temps*puissance),(puissance* pH)

Les résultats de l'étude montre des interactions des trois variables (X1, X2, et X3) présentent L'existence d'une interaction significative sur l'extraction des polyphénols du régime de datte. L'interaction X1X3 (pH*temps) est la plus significative avec une probabilité d'ordre $P=0.0005$. La meilleure valeur d'extraction est atteinte pendant 90s à pH7.

La figure montre que la teneur en PT augmente avec l'augmentation de la variable indépendante X_3 (puissance) et diminue avec l'augmentation X_2 (temps) et la meilleure valeur d'extraction est atteinte pendant 90s à 600W.les interactions significatives de $X_2 X_3$ (temps*puissance) et de $X_1 X_3$ (pH * puissance) ont été démontrées avec des probabilités d'ordre ($P=0.0169$, $P=0.0098$).

I.1.3.6.L'extraction finale

L'extraction finale par microonde assisté en utilisant la méthode solide –liquide a été faite après détermination des conditions optimales pour une extraction maximale de composé phénolique à l'aide du logiciel JMP7, les conditions optimales sont : puissance d'irradiation 600W, temps d'irradiation 90s et pH 7 du meilleur solvant extracteur. En utilisant 5 g de poudre végétale avec 40 ml d'eau on a obtenu un rendement de 18.6 %.

II.2.Rendement en Hes

Le rendement en Hes de *R. Officinalis* est de taux de 0.76%. Selon les travaux (Atik Bekkara *et al.*, 2007) ont obtenu un taux proche (0,8%). (Hilan et al 2006) et (Biljana *et al* 2007) ont des taux supérieurs (1,52% et 1,18%) respectivement (Makhloufi, 2009).

Malgré que la technique d'extraction est la même ; cette différence peut être expliqué variation des facteurs suivants : le stade de croissance, les conditions pédoclimatique, la période du récolte, le temps du récolte, séchage (Edward *et al.*, 1997 ; Russo *et al.*,1998).

Plusieurs travaux relatifs au séchage des plantes aromatiques et médicinales influence, particulièrement sur le plan quantitatif, au niveau des Hes. Or, dans de mauvaises conditions de séchage la plante risque de se dégradée et par suite, la perte de la totalité de ses Hes. Dans ce sens, ont trouvé que la teneur en Hes des feuilles du romarin séché à l'ombre pendant une semaine est quatre fois supérieure que celle de feuilles fraîches. Selon le même protocole, le séchage au soleil donne un effet similaire à celui observé à l'ombre mais avec deux différences importantes. Tout d'abord, l'optimum est atteint plus rapidement. Par contre, le rendement est moins important qu'à l'ombre (Makhloufi, 2011).

II.3. Analyse microbiologique

II.3.1. Evaluation de l'activité de l'huile essentielle de *R. officinalis*

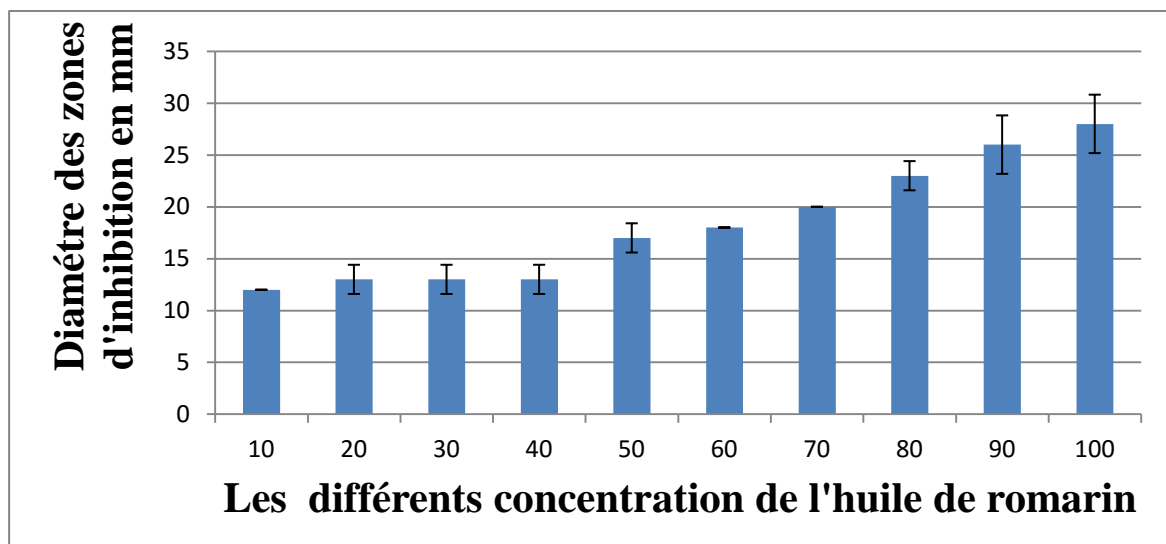


Figure 16 : Histogramme présentant des zones d'inhibition pour *pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa est sensible pour toutes les concentrations de l'huile de Romarin avec des zones d'inhibition très importante variée de 12 à 28 mm (figure 16).

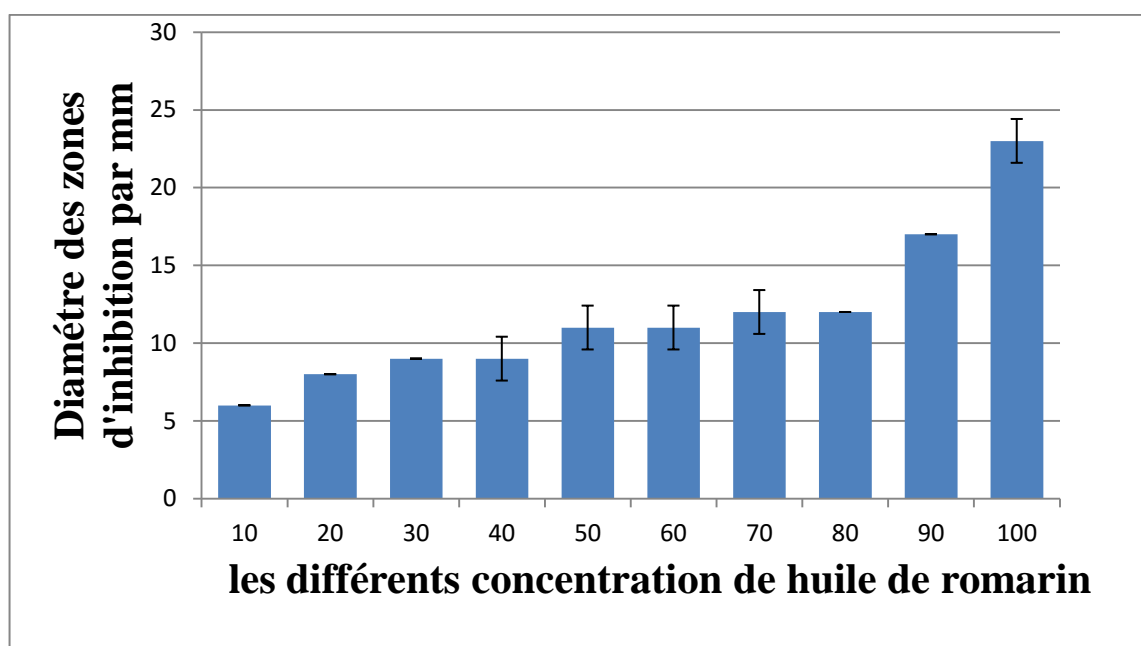


Figure 17: Histogramme présent des zones d'inhibition pour *pseudomonas Sp.*

Les résultats indiquent que la sensibilité de *Pseudomonas Sp* sensibilité vis-à-vis les dilutions de l'extrait de 30% à 100% et dont on marque un diamètre d'inhibition variée de 9 à 23 mm, et moins sensible pour les dilutions de 10% et 20% avec des zones d'inhibition variée de 6 à 8 mm, respectivement (figure 17) .

Après incubation, les résultats obtenus ont permis de constater que les boîtes de Pétri (Figure 19) contenant des disques imbibés de DMSO ne montrent aucune zone d'inhibition, ceci indique donc l'absence totale de l'activité antibactérienne. Ainsi, l'effet antibactérien additionnel éventuel du DMSO se trouvant dans les échantillons n'est pas considéré.

Le résultat de l'effet de l'huile de Romarin sur les deux souches testées après incubation à 37 °C pendant 24 heures, ont révélé une appréciable activité antibactérienne avec des diamètres des zones d'inhibition de 23 ± 1.41 mm et 28 ± 2.81 mm pour *Pseudomonas Sp* et *pseudomonas aeruginosa* respectivement ce qui confirme la sensibilité de ces souche à cet antibiotique naturel. Les zones d'inhibition ont tendance à diminuer à fur et à mesure que la concentration de l'extrait diminue, l'extrait manifeste donc une activité antibactérienne selon une relation dose dépendant. Plusieurs auteurs confirment le fait que le diamètre des zones d'inhibition des extrait végétaux est fonction de la concentration (Moroh *et al.*, 2008 ; Ksouri *et al.*, 2009 ;Yakhlef, 2010 ; Bouzid *et al.*, 2011).

La corrélations entre les dilution de l'extrait de huile de romarin et les zones d'inhibition sont illustrées dans la figure (Figure 18).

l'effet antibactérien des huile de romarin a révélé de très bonnes corrélations positives (R^2 varié de 0.8 et de 0.93) entre les differente dillution de L'extrait de romarin et les zones d'inhibition.

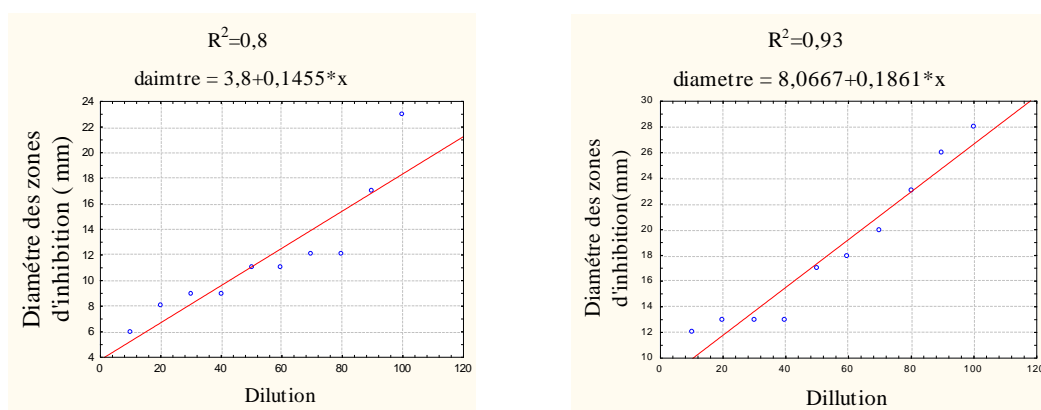


Figure 18 : Corrélations entre le diamètre des zones d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas .Sp* et les concentrations d'huiles de romarin.

Par ailleurs, on remarque que nos résultats montrent une grande variabilité de l'activité de l'huile essentielle de Romarin vis-à-vis des deux souches ; il s'est avéré que *Pseudomonas aeruginosa* est plus sensible que *Pseudomonas Sp.*

En général, l'activité antibactérienne des H.es pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants des H.es avec la paroi des bactéries, ce qui provoque de profondes lésions. En outre, Dans le domaine agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Kurita et Koike, 1982 ; Mangena *et al.*, 1999).



Figure 19 : Activité antibactérienne d'huile essentielle de romarin testée à différentes concentrations sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas .Sp.*

II.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des polyphénols.

Les deux souches se sont révélées résistantes aux extraits testés. Certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des bactéries Gram (+) ou Gram (-) (Guesmi et Boudabous, 2006). La résistance des deux souches peut être attribuée à l'incapacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans la gélose (Hayouni *et al.*, 2007).



Figure 20: Activité antibactérienne des polyphénols à différentes concentrations sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas .Sp.*

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. (Natarajan *et al.*, 2005) et (Fazeli *et al.*, 2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de l'*Euphorbia fusiformis*, hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora*, que la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, la tolérance des bactéries aux polyphénols dépend essentiellement de l'espèce bactérienne et de la structure des polyphénols (Almajano *et al.*, 2008).

Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens. La réduction de la perméabilité de la membrane externe, entourant la paroi cellulaire, aux agents antibactériens hydrophobes par la structure lipopolysaccharidique peut favoriser la résistance à ces agents (Vaara, 1992; Tepe *et al.*, 2004; Shan *et al.*, 2007). De plus,

l'hypothèse de la dégradation des polyphénols par certains microorganismes n'est pas à écarter (Shan *et al.*, 2007; Almajano *et al.*, 2008)..

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* est largement observée (De Billerbek *et al.*, 2002 ; Derwich *et al.*, 2010 ; Bari *et al.*, 2010). Cela pourrait être expliqué par la présence de l'enzyme qui hydrolyse les polyphénols.

II.3.3.Evaluation de l'activité antibactérienne de l'acide acétique

De la même manière, nous avons étudié l'effet de l'acide acétique avec plusieurs concentrations allant de 1.5% à 25% sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de ce test sont groupés dans les (figures 21 et 22).

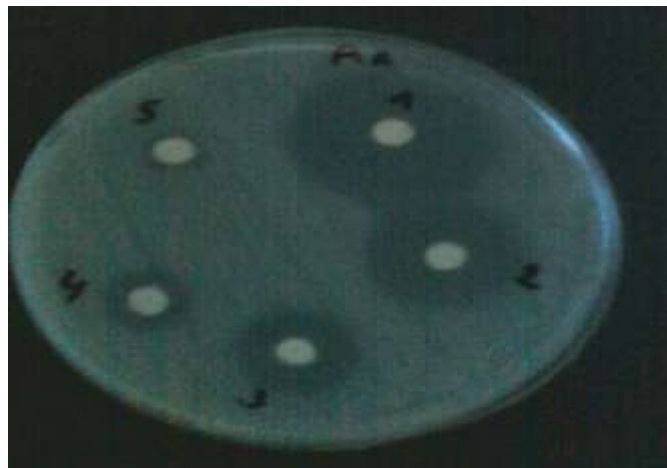


Figure 21 : Les diamètres des zones d'inhibitions de *Pseudomonas aeruginosa* obtenues avec l'acide acétique

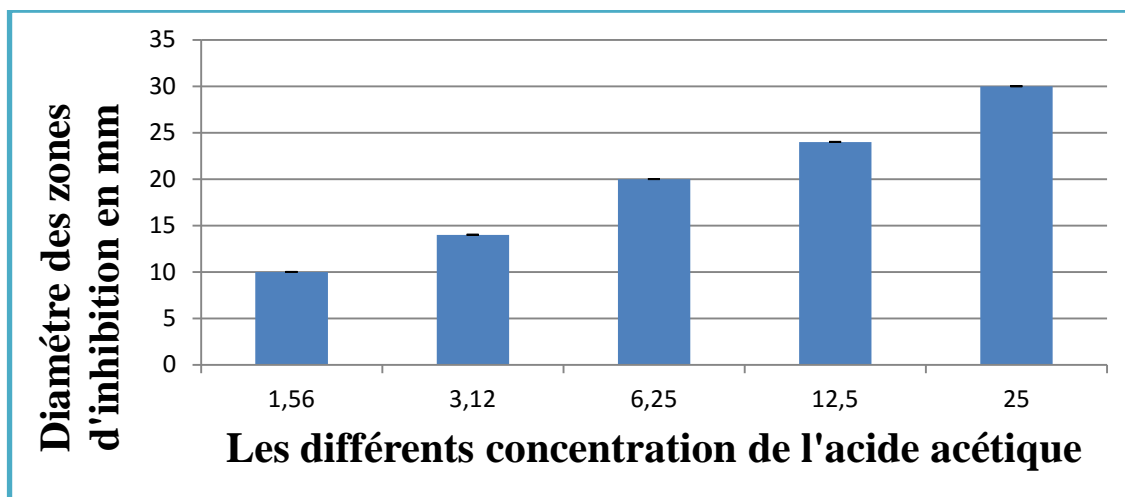


Figure22: Histogramme présentant la variation du diamètre de la zone d’inhibition (mm) de *Pseudomonas aeruginosa* selon la concentration d’acide acétique.

Le diamètre de la zone d’inhibition varie proportionnellement avec la concentration de l’acide acétique.

l’effet antibactérien de l’acide acétique a révélé de très bonnes corrélations positives ($R^2=0,89$) entre les différentes concentrations de l’acide acétique et les diamètres des zones d’inhibition (figure 23).

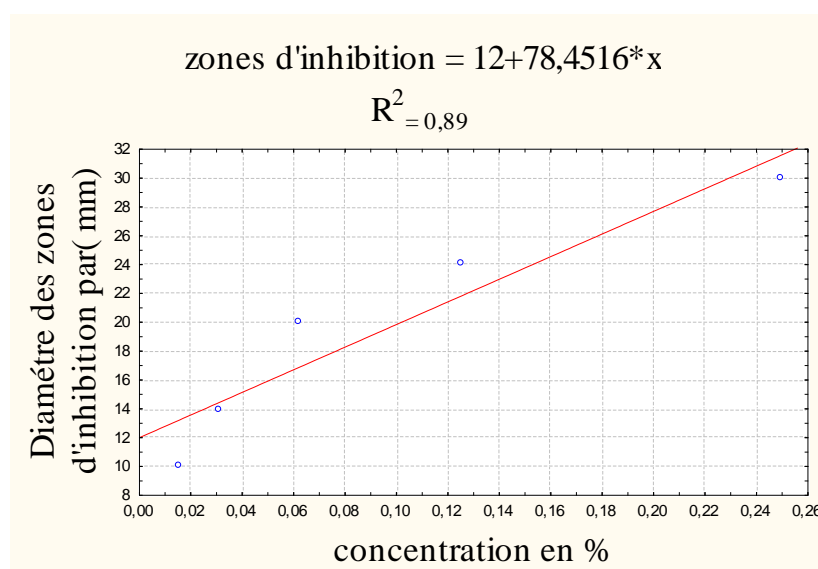


Figure 23 : Corrélations entre le diamètre des zones d’inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* et les concentrations de l’acide acétique.

D'après ces résultats, nous constatons que l'acide acétique possède un effet très appréciable contre *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité exercée, la dose dépendante et le diamètre des zones d'inhibition varient de 30 mm à 10 mm.

L'acide acétique renforce l'activité de nombreux antioxydants, mais n'est pas en lui-même un antioxydant. Il est principalement utilisé comme correcteur d'acidité pour que le pH du produit fini soit inférieur à 4.5 au cours de la fabrication. Et joue un rôle de conservateur pour s'opposer au développement microbien, mais également comme arôme (Steinman, 2013)

Acide acétique, produits par les bactéries lactiques, participent à l'inhibition de *Staphylococcus aureus*. Ils ont démontré aussi que la *Salmonella* pouvait être inhibée par le pH inférieur à 4.4 pour l'acide lactique et à 5.4 pour l'acide acétique (Huttunen *et al.*, 1995).

II.3.4. Evaluation de l'effet de combinaison de l'extrait phénolique, l'huile de Romarin et l'acide acétique.

Cette opération est établie sur un plan d'expérience regroupant plusieurs combinaisons entre l'extrait phénolique de *P. dactylifera* L, l'H.es du Romarin et l'acide acétique. Contrairement à la méthode classique, celle-ci permet de varier les possibilités de rapports programmés au préalable de chaque agent antibactérien.

Tableau VI : Résultat des diamètres des halos d'inhibition de la série 13 mélanges de substances bioactives à 37°C sur *Pseudomonas aeruginosa*.

| Test | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
|------|-------------------------------|--------------|
| | 37 °C | 4 °C |
| E1 | 14± 0 mm | 16 ± 0mm |
| E2 | 0 mm | 0mm |
| E3 | 26 ± 2.12 mm | 16 ± 0mm |
| E4 | 22 ± 0mm | 22 ± 1.41mm |
| E5 | 28 ± 0mm | 20 ±1.41mm |
| E6 | 25 ± 0mm | 20 ± mm |
| E7 | 14 ± 1.41mm | 18 ± 1.41mm |
| E8 | 10 ± 0mm | 15 ± 1.41mm |
| E9 | 24 ± 0mm | 26 ± 1.41mm |
| E10 | 20 ± 0mm | 18 ± 1.141mm |
| E11 | 16 ± 0mm | 14 ± 1.41mm |
| E12 | 11 ± 1.41mm | 14 ± .41mm |
| E13 | 24 ± 0mm | 23 ± 1.41mm |

Les résultats de cette expérience sont représentés dans le (Tableau VI), ainsi que l'aspect des halos sont montrés dans la (Figure 24).

Ces résultats nous ont permis de classer l'efficacité de ces substances sur *Pseudomonas. aeruginosa* selon l'ordre suivant : E5> E3> E6> E13> E9 >E4> E10> E11> E1= E7> E12

Toutes les combinaisons ont un effet antibactérien plus ou moins efficace, avec un seul plus important diamètre d'inhibition enregistrées par la combinaison E5 (28 mm).

Le test E8 n'apporte aucune amélioration car, avec une valeur de diamètre de 10 mm : ce qui montre qu'il n'ya pas de synergie extrait du *P.dactylifera L* et l'huile essentielle de romarin, elle montre même un effet antagonisme. Le test E11, avec une valeur de diamètre 16 mm montre qu'il n'ya pas de synergie entre les polyphénole et l'acide acétique car cette valeur est moins importante que celle de l'acide acétique testé individuellement.

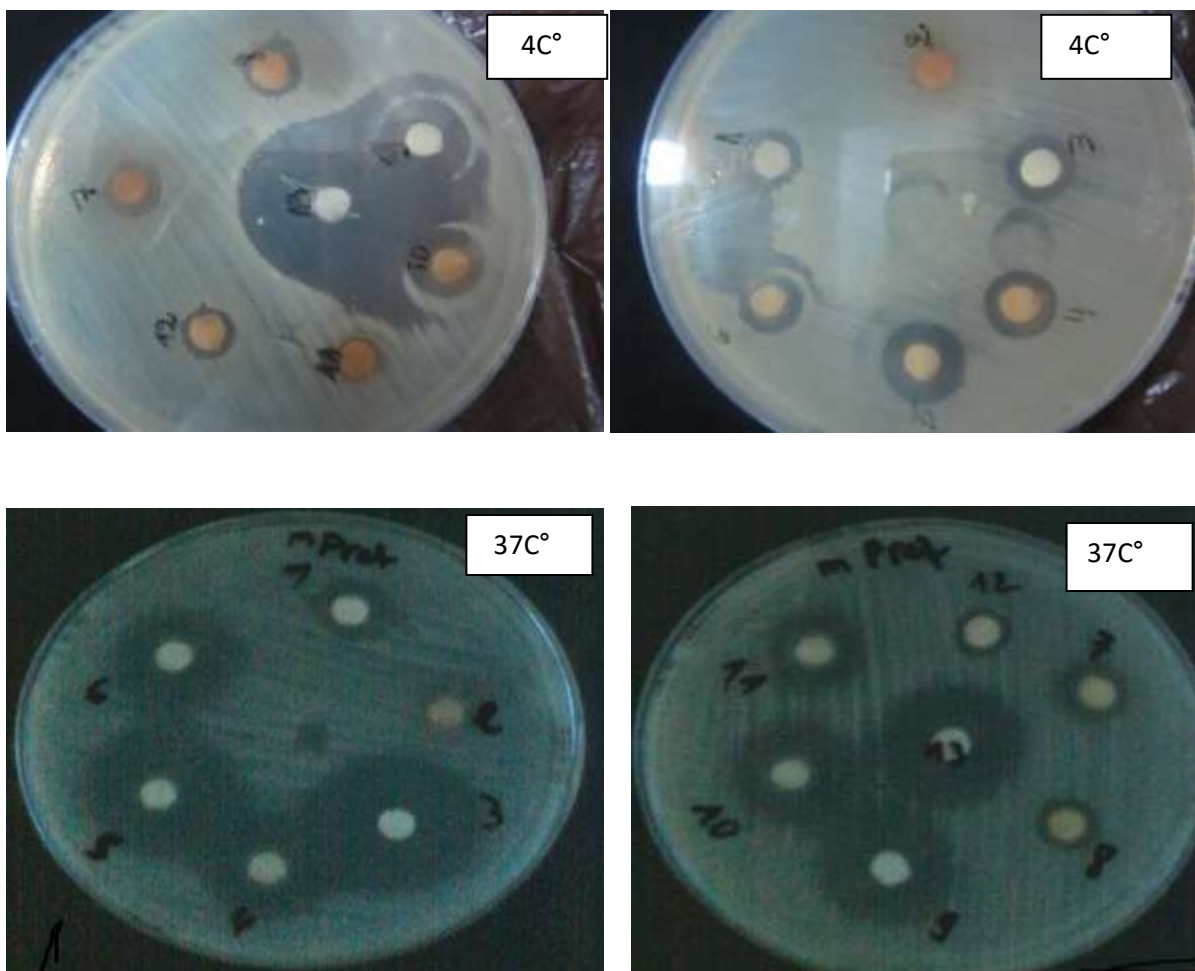


Figure 24 : Photos du diamètre des zones d'inhibition par les différents mélanges des agents antibactériens à 37 C° et a 4 C° pour *Pseudomonas aeruginosa*.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* exerce une résistance vis-à-vis des polyphénole du palmier dattier.

Selon la (Figure 24) ainsi que (Tableau VI), il est clairement démontré que l'importance des zones d'inhibition correspond à la présence de l'acide acétique et à un rapport important par rapport à l'huile essentielle. On observe aussi de très larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibition obtenues, allant de 10 mm à 28 mm.

L'activité antimicrobienne de deux agents antimicrobiens est due aux différents agents chimiques présents dans les agents antibactérien, y compris l'acide acétique en combinaison avec l'huiles qui jouerait un rôle de précurseur pour l'acide acétique (Rojas *et al.*,1992 ; Marjorie,1999).

De plus, il a été démontré que l'activité antibactérienne ne dépend pas d'un seul composé phénolique, plutôt, elle peut être la résultante d'effet synergique de deux ou de plusieurs composés. Le *p*-cymene associé au carvacrol exerce un effet synergique contre

certaines bacilles et cela en augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique et facilitant la pénétration du carvacrol (Ullree *et al.*, 2000). De même, l'association peut diminuer l'activité de l'un ou de l'autre, c'est l'effet antagoniste.

Les constatations de cette expérience à 4°C sont à priori les mêmes que celle à 37°C avec un effet synergétique important pour un rapport équivalent d'acide acétique à concentration minimales avec l'Essence de romarin.



***Conclusion et
perspectives***

Conclusion

L'effet antibactérien de l'extrait hydrauliques du régime de *P.dactylifera* L, de l'huile essentielle de *R.Officinalis* L et de l'acide acétique ainsi que leur combinaison ont été testés sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomans Sp* isolée de l'espadon congelé.

L'extraction assistée par micro-onde a été utilisée pour extraire les composés phénoliques. Les conditions optimales de EAM permettant d'obtenir un meilleur rendement en composés phénoliques sont ; 600W pour la puissance d'irradiation, 90s pour le temps d'irradiation et pH7.La valeur expérimentale 8.47mgEAG/g MS, et très proche de la valeur prédite (8.80mgEAG/g MS), ce qui confirme la validité du model.

Le rendement d'extraction des polyphénols obtenu est de 18.6% de 5 g de l'extrait sec.

Par contre le rendement obtenu de l'extraction d'huile essentielle. à partir des feuilles était de 0,76%. Ce rendement est conforme avec les normes internationales (0,5-2%),

L'estimation de l'activité antibactérienne de l'extrait phénolique du régime de datte, de huile essentielle de romarin et de l'acide acétique, a été effectuée avec la méthode de diffusion sur disque sur deux souche bactériennes, ainsi que leurs combinaison a été effectuée de la mémé manière sur *Pseudomonas aeruginosa*, et les résulta montre que :

L'extrait de *R.Officinalis* L a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des deux souches testées. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25922 s'est montré plus sensible, avec un diamètre de 28 ± 2.81 mm pour une concentration de 95mg/ml.

L'extrait phénolique de *P. dactylifera* L n'exerce aucune activité sur les deux souches.

L'acide acétique possède un effet très appréciable contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre de 30 ± 0 mm.

La combinaison des trois agents antibactériens est plus efficace sur *Pseudomonas aeruginosa* avec une moyenne de 28 ± 0 mm pour la combinaison de l'huile et de l'acide acétique.

En termes de perspective et dans le but de compléter ce travail dans à l'avenir, il serait Intéressant de :

✓ Optimiser d'autres facteurs influençant le taux d'extraction des composés Phénoliques tel que le pH du solvant notamment alcalinisation de l'eau la granulométrie de la poudre, la concentration du solvant)

- ✓ Déterminer les concentrations minimales d'inhibition de l'huile de Romarin ainsi que celle de l'acide acétique.
- ✓ Evaluer l'activité antibactérienne des polyphénole du régime de datte contre d'autres souches
- ✓ Additionner le mélange de l'huile de Romarin et l'acide acétique à une matrice alimentaire expérimentalement inoculé avec les souches bactériennes
- ✓ Optimisation de l'extraction des polyphenols par d'autre méthodes notamment ultrason.



Références

A

Alviano DS., Alviano CS., (2009). Plant extracts: search for alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotech.* 10: 106-21.

Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S.A., Boti J.B., Casanova J., (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *J Biologie & Santé* vol. 7, p 1, 6,11.

Almajano M., Pilar C. R., Angel L., Jimenez M. H., & Gordon H., (2008). Antioxydant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, 55-63.

AFNOR., (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et Méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.

Amarti F., (2009).Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*14 (1), 141-148

An-Na Li ., Sha Li ., Yu-Jie Zhang ., Xiang-Rong Xu ., Yu-Ming Chen et Hua-Bin Li. (2014) . Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols .*Nutrients*, (6), 6020-6047.

Acourene S., Ammouche A., Djaarfi K., (2008).Valorisation des rebuts de dattes par la production de la levure boulangere, de l'alcool et de vinaigre, pp. 39-45

Arnold N., Valentini G., Bellomaria B., Laouer H., (1997) Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. Officinallis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res.* 9: 167-175.

B

Boullard., (2010). Boudjemaa Nour elyakin et Ben guegua Hadjer, L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*, Université Kasdi Merbah Ouargla.

Boughendjioua H., (2014). Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydant et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de doctorat, Université Baji-Mokhtar-Annaba .

Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F., (2008). Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *J Food Sci*, 73: 331-8.

Bornert G., (2000). "Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires." Service Central d'Études et de Réalisations du Commissariat de l'Armée de Terre, B.P. 309, 00447 Armées

Bari M.A., Islam W., Khan A.R. et Mandal A., (2010). Antibacterial and antifungal activity of *Solanaceae*. *Int.j.Agric.biol*, 12, 386-390.

Boudjella K., (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. Mémoire de Magister, Université de Batna. p 9-29-30.

Bouzaïd W., Yahia M., Abdeddaïm M., Aberkane M., C et Ayachi., (2010). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubépine Monogy. *Lebanese Science Journal*, 12(1), 119-125.

Ben Abbes F., (2011). Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques d'extraits de dattes « *Phoenix dactylifera* L. ». Thèse de Doctorat, p,6-20.

Basli A., Chibane K., Madani., et Oukil N., (2012) .Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* ,2-8.

Benamara S., Chibane H., et Boukhlifa M., (2004). Essai de formulation d'un yaourt naturel aux dattes. *Revue Industrie Agricole et Alimentaire. Actualités techniques et scientifiques*, N°1. 11-14p.

Bausa E., C.Dal Fara A.,Berghi G.,Oberto D., Peyrouel et Domlogue N., (2002). Date palm kernel exhibits antiaging properties and significantly reduces skin wrinkles.*Int..J.Tis.React*, 24, 131-136.

Bonnailli C., Salacs M., Vassiliova E., et Saykova I., (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*. 7 : 35-45.

C

Carson C.F., Mee B.J. et Riley T.V., (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1914–1920.

Chin Y F., Jumat S et Mamot S. (2010). Optimisation of area complexation by Box- Behnken design. *Sains Malaysiana* 39: 795-803.

Charpentier B., (2008). [New therapeutic targets for antibodies and recombinant proteins in organ transplantation]. *Bull. Académie Natl. Médecine* 192, 883 –893; discussion 893–894.

Cushine T. P., & Lamb J., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.

Cowan M. M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 564-582.

Chemat F., Marie E., Lucchesi., (2005). Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des extraits aromatiques. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie J. Soc. Ouest-Afr. Chim* (020) 77-100.

D

Dahmoune F., Boulekbache L., Moussi K., Aoun O., Spigno G., Madani K., (2013). Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants :Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction .*Industrial Crops and Products* 50,77-87.

Delille L ., (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, 122 1,
Dorman H. J. D. et Deans S. G., (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*; 88(2): 308-16.

Derwich E., Benziane Z. and Boukir A., (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity.*Int. J. Agric. Biol.*, 12,199-204.

De Billerbeck V.G., Roqes C. Vaniere P. et Marquier P., (2002). Activite antibacterienne et antifongique de produits à bas d'huiles essentielles. *Revue hygiene*, X(3),248-254.

E

Edward P.C., Varro E.T., et Lynn R.B., 1997. *Pharmacognosy*, sixth edition. LEA et Febiger (ed), 184-187.

F

Francis K. P. et Stewar G., (1997). "Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19(4): 286-293.

Fine D.H., Furgang D., Barnet M.L., (2001). Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of actinobacillus actinomycetemcomitans. *J Clin Periodontol*; 28: 697-700.

Faucher J., (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, 198p.

Fazeli M. R., Amin G., Ahmadian-Attari M. M., Ashtiani H., Jamalifar H., Samadi N., (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*, 18: 646-649.

Franck P., (2010). Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus* : rôle des hélicases à ARN. *Agricultural sciences*. Université d'Avignon, French, p15.

G

Gonzalez-trujano M. E. et al., (2007). Evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Jtheopharmacol.* 111:476-482.

Gounot A.M., (1991). Bacterial life at low temperature; physiological aspects and biotechnological implications. *J. Applied Bacteriol*, 71, 386-397.

Granato D., Favalli Branco G. et de Araújo Calado V M., (2011). Experimental design and application of response surface methodology for process modelling and optimization: A review. *Food Research International*, in press, doi: 10.1016/j.foodres.2010.12.008.

Guba R., (2001). Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potentiel. *International journal of Aromatherapy*, 11, 76-83.

Guesmi A., Boudabous A., (2006). Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles Associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, p. 224-230.

Garnéro J., (1996). Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques, Edition paris. K 345-1, 39p

Goupy J., et Creighton L., (2006). Introduction aux plans d'expériences. Edition Dunod, Paris, 336p

Ghafoor K., Choi Y H., Jeon J Y et Jo I., (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phénolic compounds, antioxydants and anthocyanins from grape (*vitis vinifera*)seeds. *Jornal Agricole and food chemistry*. 57; 4988-4994.

Gülçin I., (2004). Evaluation of the Antioxydant and Antimicrobial Activity of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk Journal Agriculture*, 28, 25- 33.

Ganzler K., SALGO A., VALKO K.J., (1986). Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 371, 229-306.

H

Hagerman A. E., & Butler L. G., (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The journal of Biological Chemistry*, 256 (9), 4494- 4497.

Hayouni E.A., Abedrabba M ., Bouix M., Hamdi M., (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *FoodChem.*, (in press).

Hebraud M., Dubois E., (1994). "effect of growth temperatures on the proteinlevels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas-fragi*." *Journal of Bacteriology* 176(13): 4017-4024.

Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.*107:157-160.

Hernandez Ochoa L.R., (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine "solvant/actif" d'origine végétale.

Hosseinian F.S., Li W., Hydamaka A.W., Tsopmo A., Lowry L., Friel J. and Beta T., (2007). Proanthocyanidin profile and ORAC values of manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6970- 6976.

Huttunen E., Nora k et Yang Z., (1995). Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal* 5:503-13.

I

Iserin P., Masson M et Restellini J.P., (2007). *Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins*. Ed Larousse, pp1436.

Inouye S., (2003). Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International journal of Aromatherapy*. 45.p :22-35.

J

Jones W.P., et Kinghorn A.D., (2006). Extraction of plant secondary metabolites. In *Natural Products Isolation*, Humana Press, 2ème éd., Totowa, pp. 323-351.

K

Kalemba D., Kunicka A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curren Med Chem* 2003; 10(10): 813-29.

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

Ksouri R., falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamedi B., Chaieb K., Bakrouf A., Magné C. et Abdelly., (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medical halophyte *Tamarix gallica* L. And related polyphénolic constituents. *Food Chemical Toxicology*. 47, 2083-2091.

Kurita N et Koike S., (1982). Systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils component. *Agric. Biol. Chem.*, P46-159-165.

Kaufmann B., and Christen P., (2001) recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.

Krief S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. *Muséum national d'histoire naturelle* p.17-37, P, 347.

L

Lakhdar L., (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Thèse de doctorat*. Faculté de médecine dentaire de rabat centre d'étude doctorale des sciences de la vie et de la nature.

Laurent D., (2012). Les huiles essentielles à l'officine. *Thèse de doctorant en pharmacie URF de médecine et de pharmacie de Rouen*.

Lardry J.M., Haberkorn V., (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*; 61: 14-7.

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., et al., (2001). A study of the minimum inhibitory Concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J App Microbiol*; 91(3): 453-62.

Latif Gachkar a, Davood Yadegari a, Mohammad Bagher Rezaei b, Masood Taghizadeh c, Shakiba Alipoor Astaneh c, Iraj Rasooli , (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102 898–904

Lapornik B., Prosék M., Wondra A.G., (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engeneering*, 71, 214-222.

Laouini S.E., (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) . Thèse de Doctorat,p,22-92.

M

Marjorie M.C., (1999). Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.

Mansilla M.C., Cybulski L.E., Albanesi D et de Mendoza D., (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol*. 186: 6681-6688.

Malecky M., (2007) Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris, 2007 30-35pp.

Mayr B., Kaplan T., Lechner S et Scherer S., (1996). Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol*. 178: 2916-2925.

Marquesin R., & Miteva V., (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisme. *Research in Microbiology*, 162(3), 346-361.

Makhloufi A., (2009). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar(*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de Doctorat. Université Aboubaker Belkaid.

Metpally R. P. R. et Reddy B. V. B., (2009). "Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins." *Bmc Genomics* 10.

Moroh J.L. A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G., & Guede-Guina F., (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la société royale de Liege*,77,44-61.

Mangena TNYO et Muyima L., (1999). Application. Microbiologique, 28-291.

Maheshwari D.T., Yogendra Kumar M.S., Verma S.K., Singh V.K. and Singh S.N., (2011) Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2422-2428.

Muanda F.N., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques .Thèse de doctorat Ecole doctorale SESAMES p.47-49,P,294.

Mrabet R., (2008). Conservation agriculture in Morocco: a research review. In: Stewart, B.I., Fares Asfary, A., Belloum, A., Steiner, K., Friedrich, T. (Eds.), Proceedings of the International Workshop on Conservation Agriculture for Sustainable Land Management to Improve the Livelihood of People in Dry Areas. 7–9 May 2007, ACSAD and GTZ, Damascus, Syria, pp. 183–208.

Maihebiau P., (1994). La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635.

Makhloufi, A. (2011) Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de Doctorat. Université Aboubaker Belkaid.

N

Nauciel, C. (2000) Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p.

Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal, G., (2005). Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J. Ethnopharmacol.*, 102: 123-126.

O

Oikawa T., Yamanaka K., Kazuoka T., Kanzawa N. and Soda K., (2001). Psychrophilic valine dehydrogenase of the antarctic psychrophile, *Cytophaga* sp. KUC-1. *European journal of biochemistry*, 268(16), pp4375-4383.

Ozidal T., Sela D., A., Xiao J ., Boyacioglu D., Chen F., Capanoglu E., (2016). The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*, 8(78), 2-36

P

Pavel M., Ristić M., et Stević T., (2009). Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc.*, 75: 27-34.

Ponce A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.

Prestos C., komaitis M., (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compound. *LWT-Food Science and Technology* 41,652-659.

Q

QUEZEL P., SANTA S., (1963): Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, (1963) : pp 600.

R

.Rhazi N., Hannache H., Oumam M., A Sesbou ., Charrier B ., Pizzi A.. Charrier-El Bouhtoury F., (2015). Green extraction process of tannins obtained from Moroccan Acacia mollissima barks by microwave: Modeling and optimization of the process using the response surface methodology RSM. *Arabian Journal of Chemistry*, 1, 17.

Robert T.A., (1999) predictive microbiology applied to chilled food preservation. In: *La Microbiologie prévisionnelle appliqué à la conservation des aliments réfrigérés*, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg.

Ruberto G., Baratta M.T., (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167–174. doi:10.1016/S0308-8146(99)00247-2.

Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crud.

Russo M., Galletti G.C., Bocchini P., et Carnacini A., (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* sp. *Hirtum* (Link)): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. *J Agric Food Chem*, 46, 3741-3746.

S

Shan B., Cai Y.Z., Brooks J. D., & Corke H., (2007). The in vitro antibacterial activity of diet ary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112-119.

Safaei-Ghomi J., Ahd A.A., (2010) Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag*; 6:172-5.

Shahidi F., et Nacz M., (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press, 558pp.

Silva E M., Rogez H., et Larondelle Y., (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* Leaves using response surface methodology. Separation and purification technology. 55: 381-387.

Spiwok V., Lipovova P., *et al.*, (2007). "Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation." *Journal of Molecular Modeling* 13(4): 485-497. Sparr

Steinman H › Allallergy.net › Databases › Additives & Preservatives › Acetic acid ; 03-2013.

Sun Y., Xu W., Zhang W., Hu Q., Zeng X., (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J.T seng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 78, 311-320.

T

Tepe B., Donney E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Unlu G. V., Polissiuo M., & Sokmen A., (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha*. *Food Chemistry*, 84, 519-525.

Tian F., Li B., Ji B., Yang J., Zhang, G., Chen Y., & Luo Y., (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Gallachinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, 173-179.

Thomas M., (2012). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). Thèse de doctorat, Université d'Orléans p 299.

U

Ultee R., Slump A., Steging G., & Smid E. J., 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 620-624.

V

Vaara M., (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews*, 56, 395-411.

Vuorela S., (2005). Analysis, isolation and bioactivities of rapessed phenolics. Ed. University of Helsinki, p.76.

W

Wei Z.J., Liao A.M., Zhang H.X., Liu J., Jiang S.T., (2009). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology. *Bioresource Technology* 100, 4214-4219.

Wendakoon C.N., Sakaguchi M., (1995) Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prote.*, 58: 280-283.

Y

Yakhlef G., (2010). Etude de l'activité biologique des extraits des feuilles de thymus vulgaris L. Et laurus nobilis L. Mémoire de Magister. Université El Hadj lakhdar. Batna. Algerie.

Z

Zam W., Bashour G., Abdel W.W., Khayata W., (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel .*International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (3), 675-682



Annexe

Annexe

Annexe 01 : les milieux de culture

Gélose nutritive

| | |
|--|--------|
| Macération de viande..... | 1L |
| Extrait de viande + eau distillée..... | 15 |
| Peptone tryptique NaCl ou Kcl | 05 |
| Agar..... | 15à 20 |
| PH..... | 7,2 |

Gélose Mueller Hinton (milieu de culture déshydraté)

| | |
|----------------------------------|------|
| Extrait de viande | 3 |
| Hydrolysat acide de caséine..... | 17,5 |
| Amidon | 1,5 |
| Agar..... | 20 |
| pH..... | 7,3A |

Annexe 02 : généralité sur l'acide acétique

Acide acétique est un acide organique leur formule chimique CH_3COOH utilisée comme additif alimentaire dans la conservation des aliments pour son activité antimicrobienne. L'acide acétique renforce l'activité de nombreux antioxydants, mais n'est pas en lui-même un antioxydant. Il est principalement utilisé comme correcteur d'acidité pour que le pH du produit fini soit inférieur à 4.5 au cours de la fabrication. Et joue un rôle de conservateur pour s'opposer au développement microbien, mais également comme arôme (Steinman, 2013)

Annexe 03: La courbe d'étalonnage

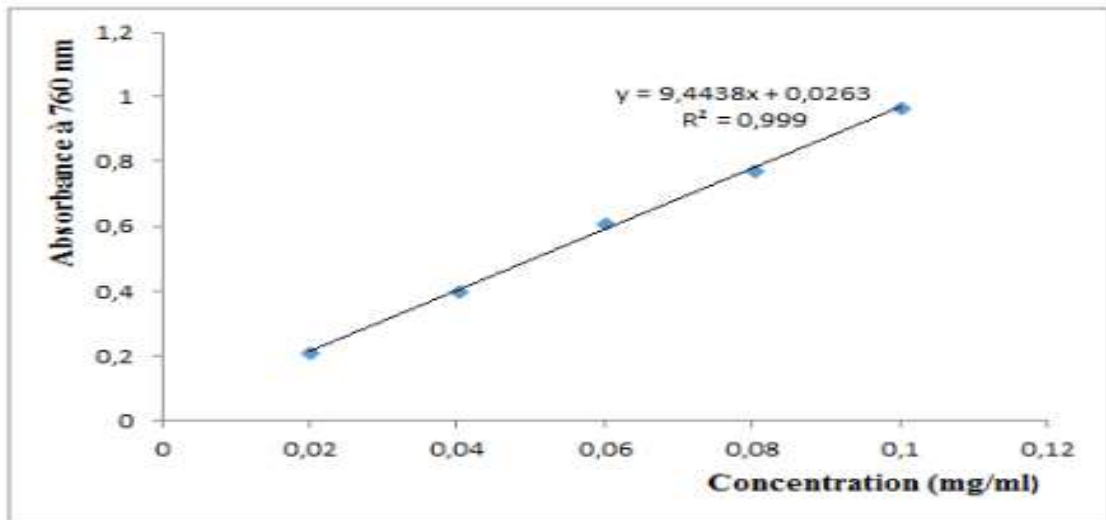


Figure 25 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

Annexe 04: STRUCTURE ET MORPHOLOGIE BACTERIENNES

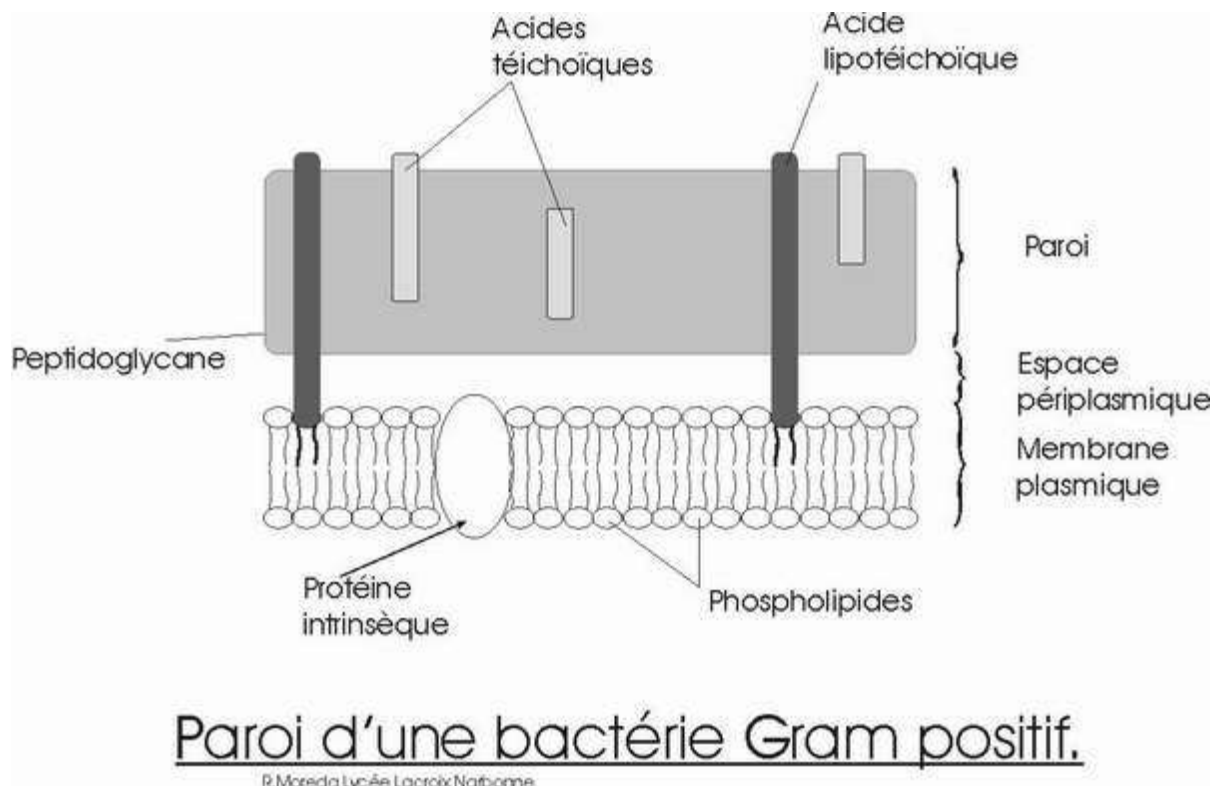
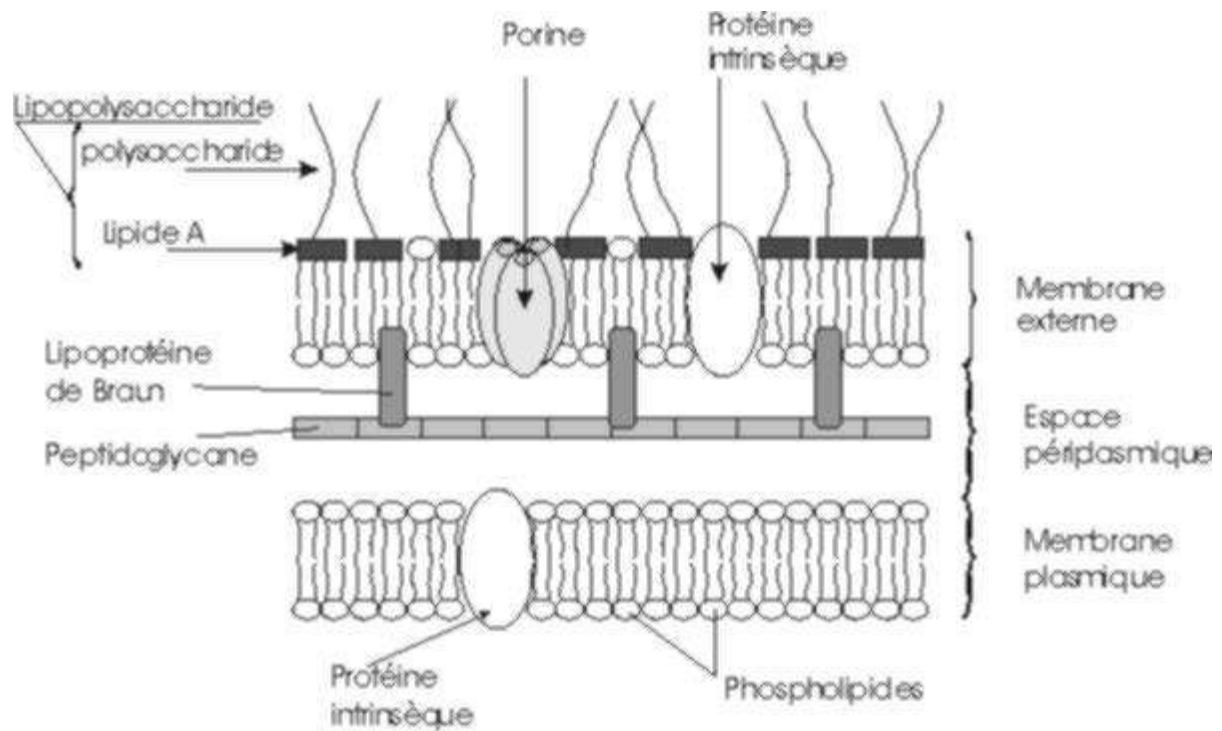


Figure26: Structure de la paroi des bactéries à Gram positif (Site n° 07).



Paroi d'une bactérie Gram négatif.

©Mokada lycée Sarah Nazoune

Figure 27: Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (Site n° 07).