

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 de Biochimie et microbiologie

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du Diplôme de master académique

Option : Microbiologie appliquée

Thème

Contribution à l'évaluation de la qualité microbiologique des produits de la
pêche surgelés et activité antimicrobienne des huiles essentielles de trois plantes :
Mentha spicata, Mentha pulegium et Thymus fontanesii

Réalisée par : M^{elle} GUAIRAD Nawel

Devant le jury composé de :

Président jury : M ^{me} HELLALE Z.	Maitre assistante	UMMTO
Promotrice : M ^{elle} OUSSAID S.	Maitre assistante	UMMTO
Examineur : Mr CHERGUI A.	Maitre assistant	UAMOB
Examinatrice : M ^{elle} MASBAHI N.	Maitre assistante	UMMTO

Année universitaire 2014-2015

Remerciement

Au terme de ce travail, Nos vifs remerciements et nos profondes gratitudes s'adressent à notre promotrice mademoiselle oussaid, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour son dévouement, ses précieux conseils, ses encouragements, sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse.

Nous présentant aussi un remerciement à tous le personnel du laboratoire commun de microbiologie qui nous a facilités la tâche, on cite Sonia et Malika.

Nos vifs remerciements vont aussi particulièrement aux membres du jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner et juger notre travail.

Nous meilleur remerciement vont aux enseignants de l'université mouloud Mammeri Tizi-Ouzou qui ont contribué à notre formation.

Ce rapport n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien et les encouragements de nos familles et nos proches, nous les remercions du fond de nos cœurs.

Et nous souhaitons également de remercier chaleureusement nos amies Benmessaoud Amel, et Chabane chaouch Fatima Zohra qui, jusqu'au bout nous ont soutenus, ainsi que toutes les personnes qui nous ont aidées à réaliser ce projet.

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques de quelques composés extraits d'huiles essentielles...	3
Figure 2 : schéma de la technique de l'hydrodistillation ou distillation simple.....	4
Figure 3 : schéma de distillation par entraînement a la vapeur d'eau.....	5
Figure 4 : schéma l'extraction par micro-onde.....	6
Figure 5 : photos des résultats obtenus de l'analyse la qualité microbiologique.....	25
Figure 6 : Effets inhibiteur des H ES (<i>Thymus fontanesii</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Mentha pulegium</i>).....	28
Figure 7 : histogramme représente les résultats du teste de sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des huiles essentielles.	28
Figure8 : résultats obtenue avec les antibiotiques synthétiques (FOX ³⁰ .I ¹⁰ .O ³⁰ .K ³⁰)...	29
Figure9: résultats de la diffusion sur gélose (CMB).....	31
Figure 10 : représentation graphique de la combinaison entres les huiles essentielles <i>thymus fontanesii</i> , <i>Mentha spicata</i> et <i>Mentha pulegium</i>	32
Figure 11 : représentation graphique de l'évolution de la croissance de souche de <i>streptococcus sp</i> en fonction du temps.....	34
Figure12 : représentation graphique de l'évolution de la croissance de souche de <i>streptococcus Pyogène</i> en fonction du temps.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : les différentes combinaisons testé avec des concentrations différentes.....	23
Tableau II : Résultats de dénombrement des différents germes	26
Tableau III : résultats du diamètre d'inhibition en (mm) des antibiotiques utilisés	30
Tableau IV : les valeurs de CMI de l'huile essentielle testée sur streptocoque sp.....	30
Tableau V : les valeurs de CMI de l'huile essentielle testée sur streptocoque de pyogène...30	
Tableau VI : résultats des combinaisons entre les huiles essentielles testés sur <i>streptocoque sp</i> et <i>streptocoque pyogène</i>	33

Liste des abréviations

BEA : Gélose bile Esculine

BN : bouillon nutritif

CMB: concentration minimale inhibitrice

CMB : concentration minimale bactéricide

DMSO : Diméthyle sulfoxid

DO: densité optique

FPT : Flore psychrophile totale

H HS : huile essentielle

MRS: Géloses de man Rogosa Sharpe

PCA: Plate count Agar

PH : potentiel hydrogène

UFC/ml: unité formant colonie par millilitre

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

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

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie bibliographique

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Définition de l'huile essentielles2

I.2. Localisation et lieu de synthèse2

I.3. Propriétés physico-chimiques.....2

I.4. Rôle physiologiques.....2

I.5Composition chimique.....2

I.6. Procèdes d'extraction de l'huile essentielle.....3

I.6.1. La distillation3

I.6.1.1. Hydrodestillation..... 4

I.6.1.2. Distillation par entrainement a la vapeur d'eau4

I.6.1.3 .L'hydrodeffusion5

I.6.2. L'extraction par micro-onde..... 5

I.6.3. Extraction a froid..... 5

I.6.4.L'extraction par les solvants et les graisse..... 6

I.7. Activité biologiques des huiles essentielles..... 6

I.7.1. activité antimicrobienne..... 6

I.7.1.2 Mode d'action des huiles essentielles..... 6

I.7.2. Activié antifongique.....7

I.7.3 Activité antioxydante7

I.7.5. Activité antiviral.....7

I.8domaine d'utilisation de l'huile essentielles.....	7
I.8.1.Industrie alimentaire.....	7
I.8.2.Desinfection des locaux	8
I.8.3.Aromathérapie.....	8
I.9.toxicité des huiles essentielles.....	8
I.10 Conservation des huiles essentielles	9
II.Description des plantes	10
II.1 <i>thymus fontanesii</i>	10
II.1.2. Définition	10
II.1.3.La systématique DE <i>thymus fontanesii</i>	10
II.1.4. Description botanique	10
II.1.5. Milieu et répartition.....	10
II.1.6. L'huile essentielle de <i>thymus fontanesii</i>	10
II.2. <i>Menthe Spicata</i>	11
II.2.1. Définition.....	11
II.2.2. Systématique de la <i>Mentha Spicata</i>	11
II.2.3. Description botanique.....	11
II.2.4. L'huile essentielle de la <i>Mentha Spicata</i>	11
II.3. <i>Mentha pulegium</i>	12
II.3.1. Définition	12
II.3.2. La systématique de <i>Mentha pulegium</i>	12
II.3.3.Description botanique.....	12
II.3.4. L'huile essentielle de la <i>Mentha pulegium</i>	13
III. les microorganismes psychrophiles	14
III.1.Définition	14
III.2.Stratégie d'adaptation au froid.....	14
III.2.1.Production de molécules protectrices.....	14

III.2.2. Adaptation des enzymes.....	14
III.2.3. Optimisations structurales.....	14
III.2.4. Adaptation des membranes cellulaires	15
III.3. Les psychrophiles dans les produits de pêche.....	15
III.3.1. Altération bactérienne.....	15

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes	17
I.1 Matériels	17
I.1.1 Les microorganismes testés	17
I.1.3 Les antibiotiques utilisés.....	17
I.1.4 L'huiles essentielles	17
I.2 Méthodes.....	17
I.2.2. Evaluation de la qualité microbiologique de produit de pêche.....	17
I.2.2.1. traitement des échantillons.....	18
I.2.2. Etude de l'activité antimicrobienne des huiles.....	21
I.2.2.1. Teste de sensibilité des souches bactérienne ou huiles essentielles	21
I.2.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	22
I.2.2.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	22
I.2.2.3. L'étude de l'effet de la combinaison des huiles essentielles.....	22
I.2.2.4. Effet inhibiteur des H.E de <i>thymus fontanesii</i> sur streptocoque inoculé à la soupe de poisson.....	23
I.2.2.5.1 Mode opératoire	23
II. résultats et discussion.....	25
II.1. Résultats d'analyse microbiologique.....	25
II.2. Résultats du teste de sensibilité des souches aux huiles essentielles (<i>thymus fontanesii</i> , <i>Mentha sp</i> et <i>Mentha pulegium</i>).....	27
II.3. Résultats du teste de sensibilité des souches aux antibiotique synthétique (antibiogramme).....	29

Introduction

II.4. Résultats de la Concentration minimal inhibitrice et la concentration minimale bactéricide.....	30
II.5.Résultats de la combinaison des huiles essentielles.....	32
II.6.Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thymus fontanesii appliqué à la soupe de poisson	34
Conclusion.....	37
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Les produits de pêches occupent une place de choix dans notre alimentation. La richesse du poisson en eau, acide gras oméga-3 en protéines de haute valeur biologique fait de lui un aliment indispensable pour une alimentation équilibrée (CLINQUART et al. 1999). Cependant, ces mêmes raisons le rendant un milieu favorable à la prolifération et l'altération microbienne.

Une grande partie des germes qui contaminent la peau du poisson suite à différentes étapes de transformation est les saprophytes responsables d'altération qui provoquent la putréfaction. Par ailleurs, la présence de germes pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires est possible. Elle est souvent liée à des défauts d'hygiène (COTTIN et al, 1985).

Dans le but de réduire ces altérations, l'industrie de transformation utilise plusieurs méthodes telles que la congélation ou encore l'addition de conservateurs synthétiques comme agent antimicrobien et antioxydant (HELLAL, 2011). Toutefois, le maniement abusif de ces conservateurs dans les produits alimentaires a conduit à l'apparition de souches bactériennes multi résistantes, ce qui menace la santé du consommateur.

La tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation naturelle sans conservateurs a poussé les industries à envisager l'introduction de substances naturelles telles que les huiles essentielles. Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir un intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

Le présent travail est constitué de deux parties dont la première consiste en une synthèse bibliographique sur les psychrophiles, les huiles essentielles et leur activité antibactérienne. La deuxième partie consiste à évaluer la qualité microbiologique des échantillons de poissons congelés importés ainsi que l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes à savoir *thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* sur *streptococcus pyogènes* et *streptococcus Sp* isolée d'espadon congelé et in vitro et sur une matrice alimentaire (soupe de poisson).

Première partie :
Synthèse
bibliographique

I. Généralités sur les huiles essentielles

I.1. Définition de l'huile essentielle

Les huiles essentielles, appelées également essences végétales, sont des produits renfermant des principes actifs très volatils à température ambiante en particulier en présence de vapeur d'eau. C'est à ces composés volatils que les plantes doivent leur odeurs (BENBOUALI, 2006).

I.2. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles N'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élabores des essences certaines familles se caractérisent par un grand nombre d'espèce au elles regroupent en particulier dans une famille : *poeceae*, *zingiberaceae* (MOHAMMADI, 2006)

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (roses..) les feuilles (citronnelle....) racines, rhizomes, le bois et les fruits ou les graines (muscade ...) (BRUNETON.1999 et *al* ANTON et *al*, 2005).

Selon, OSSALAH et *al*, (2006), plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez les mêmes espèces, voire dans un même organe.

Les plantes aromatiques synthétisent naturellement des huiles sous forme de métabolisme secondaire par des cellules sécrétrices, elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties, le bois, les fruits, graines et les racines et conservées dans des cellules sécrétrices, les cavités, les canaux cellules épidermiques Quantativement, les teneurs en huiles essentielles sont Excréments faibles (BAKKALI, 2008).

I.3. Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles (HEs) sont en général liquides à température ambiante, volatiles, avec une odeur très forte, incolores, jaune pale, ou quelque fois bleue. Leur densité est inférieure à 1 sauf pour certaines plantes comme le clou de girofle, la cannelle. Elles sont insolubles dans l'eau et solubles dans la vapeur et les solvants organiques (hexane benzène..), les huiles et les vaselines sont Très altérables, elles s'oxydent en contact de l'air et de la lumière (CHARPENTIER, 2008).

I.5.Composition chimique

Une huile essentielle contient souvent 50 à 100 molécules biochimiques différentes. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier et de quantifier chacune de ces molécules et ainsi d'obtenir la composition précise des huiles essentielles (BACHELOT et *al*, 2005).

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits aromatiques, en raison de leurs caractères odoriférants. A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un nombre de constituants sous forme de traces. Il existe quelques huiles dites mono-moléculaires, tel le bois de rose (*Aniba raseodora*), la

Menthe pouliot (*Mentha pulegium*), La sauge sclarée (*Salvia sclarea*), le clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*) sont bi- et tri-moléculaires (Figure1).

Les huiles essentielles sont aussi homogènes ou hétérogènes dans leur composition. Prés de 10000 composants sont chimiquement définis, on peut les regrouper dans les différentes familles de composés chimiques dont la masse moléculaire est relativement faible (terpènes : 136 u.m.a, terpénols : 154 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (PIBIRI, 2005).

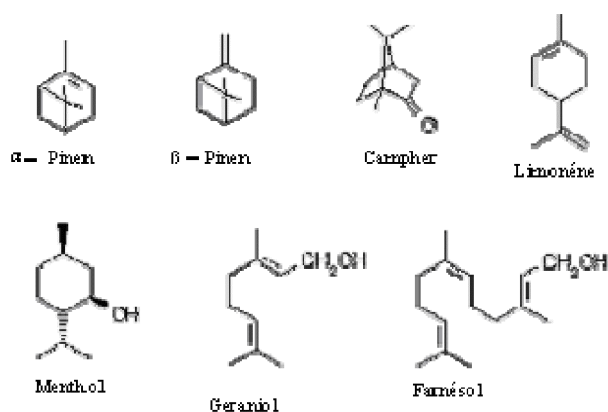


Figure 1 : Structures chimiques de quelques composés extraits d'huiles essentielles.

(PIBIRI 2005).

D'après les travaux de FRANCHOU (1990), la structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O), pour quelques groupes fonctionnels azotés (N) ou soufrés (S).

1.6. Procèdes d'extraction de l'huile essentielle

Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient de façon déterminante sur la composition chimique. Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est liée à la variété de la matière première et de la sensibilité considérable de certaines de leurs constituant.

1.6.1. La distillation

Selon SILOU et al, (2004) il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : hydro-distillation, hydro-diffusion et entraînement à la vapeur d'eau.

I.6.1.1. Hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce faite la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est directement émergée dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Le vapeur hétérogène est condensée dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité : l'huile essentielle étant la plus légère que l'eau, elle surnage ou dessus de l'hydrolat (BRUNETON, 1999).figure 2

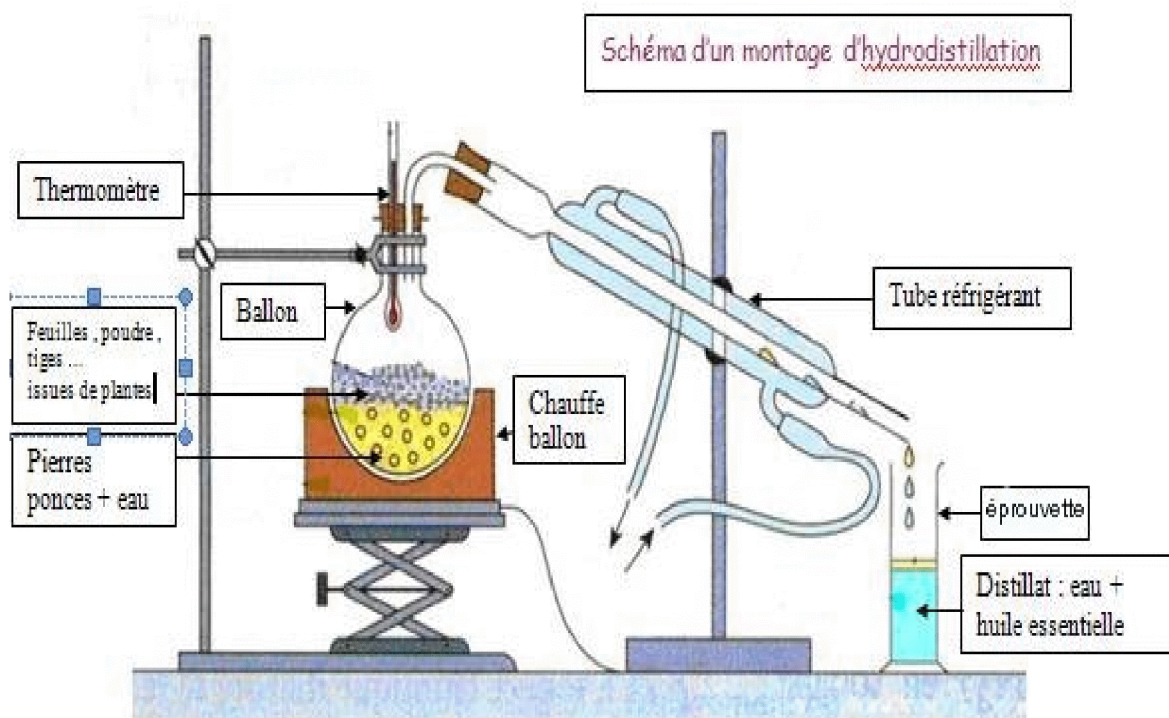


Figure 2 : schéma de la technique de l'hydrodestillation ou distillation simple
LUCCHESI, (2005)

I.6.1.2. Distillation par entrainement a la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau il est placée sur une grille perforée à travers la quelle passe la vapeur d'eau FRANCHOMME et PENOEL (1990). La vapeur endommage la structure des cellules végétale et libère la molécule volatiles, qui ensuite entraînée vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration à la qualité de l'huile et minimise l'altération hydrolytique, le matériel végétal ne baigne pas directement dans l'eau bouillante. (figure 3).

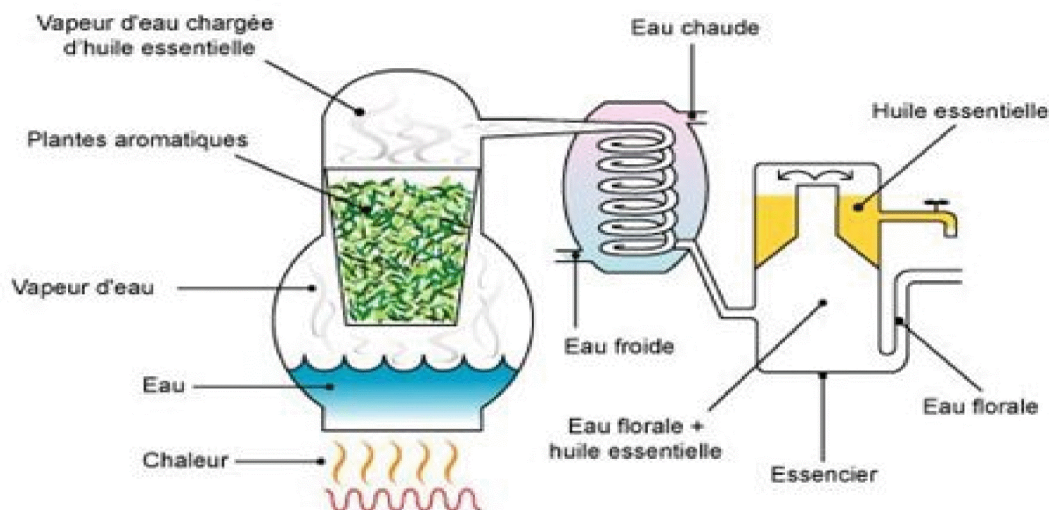


Figure 3 : Distillation par entraînement à la vapeur d'eau FRANCHOMME et al (1990).

I.6.1.3 .L'hydro-diffusion

Cette technique est relativement récente, elle consiste à faire passer l'eau du haut vers le bas et à pression réduite la vapeur d'eau travers la matière végétal, l'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins endommageant pour les composés volatils (NAIT-ACHOUR, 2012).

I.6.2. L'extraction par micro-onde

Dans ce procédé la matière végétal est chauffée par une micro-onde dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formés à partir de l'eau à la propre plante ils sont ensuite récupérés à l'aide d'un procédé classique de condensation refroidissement et décantation ce procédé émet un gain de temps et d'énergie (PIOCHON, 2008).

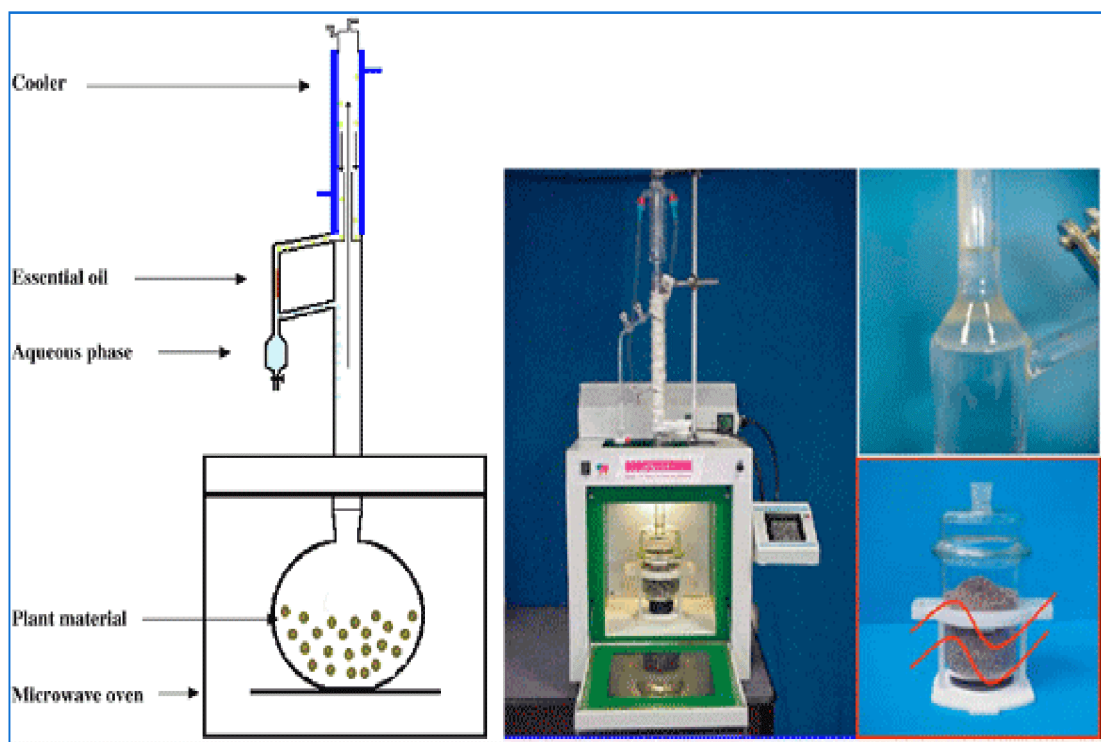


Figure 4 : l'extraction par micro-onde NAIT-ACHOUR (2012)

I.6.3. Extraction a froid

D'après ROUX (2008), Il constitue le plus simple des procédés mais s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essence. Ce procédé consiste à broyer à l'aide d'un presse les zestes frais pour détruire les poches à fin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique.

I.6.4.L'extraction par les solvants et les graisses

Selon RBERT, (2000), Il s'agit d'extraire de la plante obtenue au moyen des solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants (hexane, ether de petrol) mais aussi des graisses, des huiles même encore du gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevés que l'eau.

I.7. Activité biologique des huiles essentielles

I.7.1.Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Une étude a été menée par MEBARKI (2010), afin d'examiner l'activité des huiles essentielles *thymus fontanissi*, le thymol extrait, une pâte à base de l'huile essentielle de thym, et une pâte à base de thymol extrait, contre cinq bactéries (*staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *bacillus subtilis*, *enterococcus fecalis* et *E.coli*) Deux levures, (*candida albican* et *saccharomisse cerevaceae*), et deux dermatophytes (microsporne canis, trechophyton mentagrophyte) .l'objectif était également de déterminer les composés présents dans l'huile essentielle, susceptible d'être responsable de son activité antimicrobienne et

antifongique. les resultats ont mis en evidence une activité bacteriocide et fongicide. cette activié microbienne est due principalement a la présence des monotérpenes phynolique (le thymol et le carvacrol), qui était fortement actif contre les microorganismes testés.

GILLE et *al*, (2009) , ont etudies activité antibacterienne des huiles essentielles de trois espèces d'eucalyptus : *eucalyptus dive*, *eucalyptus olida*, et *eupalyptus staigereana*, sur *staphylococcus*, *pseudomonas aerugenosa*, *bacillus sbtilis*, et *enterococcus facalis*, *E coli* et *candida albican*. Les resultats obtenues est que tout les micro-organisme ont été hiniber a l'exeption de *pseudomonas aerugenosa* qui présnte une résistance pour les trois huiles essentielles. l'activité antibacterienne differt selon les espèces d'eucalyptus, cette activité est contribué à la composition chimique des huiles.

I.7.1.2 Mode d'action des huiles essentielles

Du faites de la varieté quantitatives et qualitatives des composants des huiles essentielles, plusieurs théories ont été proposé pour expliquer les mécanisme par la quel elles exerce leurs activité antimicrobienne. la composition complexe des huiles essentielles tend a prouver que l'activié serais due a plusieurs mécanisme d'action differents, liée a la nature chimique de ces composés. la plus par de ces mécanismes ont des interactions des composés des l'huiles avec la membrane cellulaire. les huiles essentielles sont constituées de molécule lipophiles, capable de pénétrer la bicouche phospholipidique, leurs accumulation entaine alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainssi le tranport membranaire des substances nutritives (MEBARKKI, 2010, KHENAKA ,2011).

Le mode d'action des huiles essentielles et leurs principaux constituants décrit jusqu' a présent, semblent tous affecté la paroi de la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécule pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

Pour mieux interpréter le type d'endommagement causé sur l'enveloppe, GUINOISEAU (2010), a procédé a l'analyse et la purification de grosse molécule absorbante qui est ADN, dont la libération temoigne la lyse complète de la paroi cellulaire.

Ce resultat a été complété par une observation au microscope électronique a baleage.

I.7.2. Activié antifongique

BOUAZIZ et al (2009), ont montrés une activité fongicide de l'huile *salivia officinalis*, Cultivé en tunisie sur *aspergillus niger*, et *candida albican*, avec une concentration minimal hinibitrice qui varie de 0.125- 0.250µ /ml.

D'après les resultats de DEKBAS, et *al* (2011) et OULHADJ et *al*, (2011), les substances naturelles telle que les huiles essentielles peuvent être une source non négligeable d'antifongique utilisable même dans la conservation des fruits.

I.7.3 Activité antioxydante

Les huiles essentielles possèdent des propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires qui améliore la durée de vie des aliments. Ainsi l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments sous forme de vapeur ou sous forme d'emballage actif contribue à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydations (DJENANE et *al* 2001 et CAILLET, LACROIX, 2007).

DJENANE et *al*. (2012), ont rapportés que les produits carnés traités avec deux l' H Es de *lavandula angustifolia* et de *mentha piperita* ont montrés une stabilité chimique et microbiologique durant une longue période par rapport aux produits non traités.

L'étude de HELLAL (2011). a montré que les huiles essentielles constitueraient une solution alternative ou conservateurs synthétiques dans le domaine agro-alimentaire. ou les résultats ont montrés sans ambigu, L'H ES de *citrus aurantium* comparativement à l'huile sur sardine.

I.7.5. Activité antiviral

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques, de nombreuses pathologies virales montrent des améliorations importantes avec utilisation principalement des monotérpènes et des monoterpènes. ZHIRI (2006).

I.8 domaine d'utilisation de l'huile essentielles

I.8.1. Industrie alimentaire

D'après CAILLET et LACROIX (2007), les huiles essentielles et leurs composants, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. ces substances naturelles sont très riches en composés antimicrobiens et anti oxydants. elles pourraient donc servir d'agent de conservation d'alimentaire.

Plusieurs travaux ont montrés que les huiles essentielles de thym, de la cannelle, d'origan et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxogénèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infection alimentaire.

D'après MONTES, CARAVAJAL.(1998), NEILSON et ROIX,(2000), Pour choisir l'huile essentielle comme agent de conservateur alimentaire il convient de connaître le seuil d'efficacité (la concentration la plus faible en huile essentielle capable d'inhiber toute la croissance bactérienne) car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées la concentration ne sera pas la même chaque l'huile essentielles possède une activité variable selon les microorganismes, les conditions de stockages de l'aliment (température, PH, pression d'oxygène..ect) et la nature des aliments peuvent avoir l'influence sur l'action des huiles essentielles.

I.8.2.Desinfection des locaux

Grace a leurs pouvoire antiseptiques les huiles essentielles peuvent permettre d'assainir l'air ambiant ou le système de ventilation, notablement dans les milieux hospitalier, entrainant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'aire et limité ainsi la probagation des germes microbiens (BILLERBECK, 2007).

I.8.3.Aromathérapie

L'aromatherapie est une branche de phytotherapie qui utilise l'huile essentielle pour traité certain nombres de maladies. Beaucoup d'ouvrages décrivent des préparations a basse des huiles essentielles diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies. cependant, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratique empiriques (VALNET, 1990).

Actuellement, plusieurs publications fondées utilisent des huiles essentielles ou leurs composés majoritaires pour tester leur effets in vitro VIOLLON et CHAUMONT,(1994).ces effets sont également testés in vivo sur les modèles animaux afin de traiter certaines infections expérimentales d'origine bactérienne provoquer par *helicobacter pylori* chez les souris par exemple BERGONZELLI et al,(2003).

I.9.Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être sans risque. certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées directement sur la peau, en raison de leur pouvoir irritants (les huiles essentielles riches en thymol, et carvacol), allergène ou photo-toxique l'huile de *citrus*, d'autre huiles ont un effet neurotoxique (les cétones ont un effet toxique pour les tissus nerveux .(GUBA ,2001). toute fois, la toxicité de l'huile essentielles est mal connue. Il manque des données sur une éventuelle propriété mutagène et cancérigène. la plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que présente leur emploi.

Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation du cancer. c'est le cas par exemple d'allylbenzène comme le safron et l'estragon. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs. le safron et l'estragon, sont métabolisés au niveau des foies des rats en dérivés hydroxylés puis en ester sulfurique électrophiles qui sont capables d'interagir avec l'acide nucléique et les protéines.ces résultats sont controversés, car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. le safron par exemple est métabolisé dihydroxysafron et trihydroxysafron non cancérigène (GUBA, 2001).

I.10. Conservation des huiles essentielles

La relative instabilité des molécules constitutives des huiles essentielles implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses par exemple, la photo-isomérisation, et la photo-cyclisation, coupure oxydative, peroxydation en alcool et cétone, thermo-isomérisation, hydrolyse,

transestérification. Ces dégradations peuvent modifier les propriétés ou/et mettre en cause l'inocuité de l'huile essentielle, il convient de les éviter, par : utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier, inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque entièrement remplis et fermé de façon étanche (l'espace vide étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte), le stockage à l'abri de la lumière et de la chaleur. Dans certains cas, un anti-oxydant approprié peut être ajouté à l'huile dans ce cas, cet additif est à mentionner sur l'étiquette de la vente ou l'utilisation de l'huile essentielle (LAURENT, 2012).

II. Description

Des plantes

II.1 *Thymus fontanesii*

II.1.2. Définition

Le thym est une des quelques espèces véritablement emblématiques des garrigues du pourtour méditerranéen. En plus d'être une plante aromatique très recherchée par l'homme, le thym est l'une des premières plantes mellifères de la garrigue (abeille et fleurs, 2012).

II.1.3. La systématique DE *Thymus fontanesii* (KABOUCHE ,2005)

Embranchement	Phanérogames
Classe	Dicotylédones
Ordre	Tribu florales
Famille	<i>Lamiacée</i>
Tribu	Satureies
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus fontanesii</i>

II.1.4. Description botanique

Le thym appartient a la famille des *lamiacée*, Calice à 5 dents toutes longuement subulées, bien plus longue que le tube, à lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur. Tige dressée robuste. Feuilles oblongues de 288 lancéolées entières et glabres, rarement hispides. Inflorescence plus ou moins interrompues vers le bas. Fleurs blanches ou pâles à peine plus longues que le calice (KABOUCHE, 2005).

II.1.5. Milieu et répartition

Le thym commun est une espèce héliophile (fait parti des végétaux qui ne poussent de manière optimal quand en pleine lumière), et résistante à la sécheresse originaire d'Algérie et de Tunisie. Sa faible résistance au gel limite sa répartition en altitude : il ne se développe guère au-delà de 1 500 mètres, thym commun à une aire de répartition méditerranéenne (THOMAS ,2012).

Les principaux pays producteurs de thym sont l'Espagne, la Pologne et le Maroc avec des prix plus faibles qu'en France, d'où une bonne pénétration du marché français. (GARCIA , 2008).

II.1.6. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii*

Comme les autres membres de la famille des labiées les feuilles de thym sont couverte de glande a l'huile .L'abondante production de l'huile est une caractéristique importante de ce genre, commercialisé dans le monde trouvent les applications divers en fonction de leurs compositions (anonyme).

Il existe de nombreuses variétés de thym mais, en aromathérapie, c'est le thym commun qui est le plus employé. Son huile essentielle est riche en principe actif et s'avère très efficace pour les problèmes pulmonaires. Conseillée pour les infections liées aux poumons, l'huile essentielle de thym est également reconnue pour ses propriétés antivirales, anti-infectieuses et ses actifs toniques, énergisants et stimulants. Ses effets sont particulièrement appréciés des personnes âgées car ils calment et soignent les articulations fatiguées

II.2. *Menthe Spicata*

II.2.1. Définition

Les menthes sont des plantes vivaces herbacées de 40 à 60 cm appartenant à la famille des labiées. Elles sont vigoureuses et leurs racines sont souterraines envahissantes gênant les plantes aromatiques voisines. Les espèces de menthes s'hybrident très facilement d'où l'existence de nombreuses variétés (BENBOUALI, 2006).

II.2.3. Systématique de la *Mentha Spicata* (ISERIN.P et *al*, 1997)

Embranchement :	phanérogame
Classe	angiospermes
Ordre	dicotylédones
Famille	gamopétales
Tribu	lamiacées
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha Spicata</i>

II.2.4 Description botanique

Les menthes sont des plantes herbacées ne dépassant pas 1 m quadrangulaire, à feuille pétiole ou sessile. Arrondie ou ovale, plus ou moins dentée à fleur presque régulière mauve, rose ou blanche. Les quatre parties des fruits d'ovaire, parfois verruqueuse, l'odeur est forte et agréable, plus ou moins fine, à tige fortifiée terminée par les fleurs inflorescences en tête arrondie (BEAUQUENSE et *al*, 1980).

II.2.5. L'huile essentielle de la *Mentha Spicata*

Selon SYLVAIN (2011), Les huiles essentielles de Menthe font partie des huiles les plus produites dans le monde dont la valeur commerciale s'élève à plus de 400 millions de \$US/an. Les États-Unis occupent une position dominante et sont les plus grands producteurs d'huile essentielle de Menthe, suivi par l'Inde et la Chine. L'industrie agroalimentaire est le principal consommateur : liquoristerie, confiserie ainsi que l'industrie des tabacs et la parfumerie. La valeur commerciale des huiles essentielles de menthes, leurs facilités de

propagations et de clonages a poussé les recherches vers une meilleure connaissance des voies de biosynthèse des mono terpènes caractéristiques des menthes. Cette étude a permis de favoriser la production des constituants (SYLVAIN.S, 2011).

D'après le guide l'utilisation de l'huile essentielle et bio et chémotypée l'huile essentielle de la menthe est utilisée comme étant :

- Anesthésique, analgésique, antiprurigineuse
- Anti-inflammatoire urinaire et intestinale
- Antibactérienne
- Antivirale
- Cholagogue et cholérétique
- Tonique et stimulante générale : digestif : stomachique, carminative, anti-nauséuse

II.3. *Mentha pulegium*

II.3.1. Définition

Pouliot est l'une des menthes sauvages les plus agréablement parfumées, sa senteur citronnée persiste bien au séchage. Il est intéressant de souligner que le pouliot (ce nom viendrait de son pouvoir de chasser les puces, en latin *pulex*), également appelé herbe de saint Laurent, se développe dans les prés, les terres humides et inondées (GUIGNARD et al, 2004).

II.3.2. La systématique de *Mentha pulegium* (GUIGNARD et al, 2004)

Embranchement:	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe:	Eudicots
Sous-classe:	Astérides
Ordre:	Lamiales
Famille:	<i>Lamiacées</i>
Genre:	<i>Mentha</i> (Tourn.) L.
Espèce:	<i>Mentha pulegium</i>

II.3.3. Description botanique

vivace à feuilles aromatiques, de 10 à 55 cm, le pouliot fréquente les milieux humides. Ses tiges feuillées, quadrangulaires, étalées ou couchées émettent facilement des racines adventives à la face inférieure des nœuds. Ses feuilles, opposées, petites, ovales, sont munies d'un court pétiole (anonyme).

II.3.4. L'huile essentielle de la *Mentha pulegium*

L'huile essentielle de la menthe pouliot est utilisée traditionnellement en phytothérapie pour aider à la digestion et à soulager la dyspepsie flatulente et les coliques intestin, les Inflammations aiguës ou chroniques des muqueuses avec hypersécrétion des glandes de la région enflammée, expectorante et, calme la toux. Cependant, il a été constaté que cette l'huile essentielle présente une faible activité antimicrobienne. (DAFERERA et *al*, 2003)

D'après les études menées par CAILLET et *al*, (2007) à travers le monde, les huiles essentielles de thym peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments en tant qu'agent de conservation ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts. les huiles essentielles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons.

III. Microorganismes psychrophiles

III. Les microorganismes psychrophiles

III.1.Définition

Selon la classification la plus répandue les microorganismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C. Il existerait également des bactéries dites psychrotolérantes dont l'optimum serait entre 20°C et 35°C (D'Amico *et al*, 2006).

III.2.Stratégie d'adaptation au froid

III.2.1.Production de molécules protectrices

Les micro-organismes psychrophiles ont élaborés des stratégies multiples pour s'adapter au froid. La première adaptation au froid extrême concerne la composition du cytoplasme qui distingue les organismes psychrophiles de leurs homologues mésophiles et thermophiles. En effet, les Psychrophiles produisent des solutés (glycérol, sorbitol, tréhalose...) qui protègent les structures cellulaires et garantissent une osmolarité cellulaire élevée pour lutter contre la déshydratation.

De plus, les psychrophiles peuvent également produire des protéines spécifiques (cold-shock protéines (csp), protéines de Nucléation, protéines antigel...) qui permettent, entre autre, de limiter la croissance des Cristaux de glace et évitent la destruction des membranes et des structures macromoléculaires (Storey, 1988).

III.2.2.Adaptation des enzymes

D'après l'équation d'Arrhenius, toute baisse de la température entraîne une diminution Exponentielle de la vitesse de réaction. Cet effet est souvent exprimé par le rapport de constantes de vitesse mesurées à 2 températures séparées de 10°C : $Q_{10} = \frac{k_{T+10}}{k_T}$. Le comportement catalytique d'une enzyme et sa liaison avec le substrat dépendent des interactions non covalentes de type hydrophobe ou électrostatique. Les premières se forment en absorbant de l'énergie et sont défavorisées par les basses températures ; les secondes, par contre, s'établissent de façon exothermique et sont favorisées par une température faible dès lors, il est concevable que l'adaptation aux basses températures d'une enzyme fasse appel à de fins ajustements dans les proportions et la localisation de ces liaisons (FELLER *et al*, 1997).

III.2.3.Optimisation structurales

D'après les travaux d'ARPIGNY *et al*, (1994), on peut dire que l'évolution d'une enzyme est le résultat d'un compromis moléculaire entre la flexibilité, indispensable à son activité, et la nécessité déstabiliser son architecture par un réseau d'interactions assez ferme. L'un des caractères les plus souvent rencontrés chez les enzymes d'organismes psychrophiles ont certainement leur activité spécifique élevée. En effet, grâce à un affaiblissement du réseau

d'interactions moléculaires, ces enzymes réussissent à abaisser suffisamment le seuil d'énergie libre d'activation de la réaction et à accélérer la vitesse de la catalyse.

III.2.4. Adaptation des membranes cellulaires

Les enzymes ne sont pas les seules macromolécules dont on doit tenir compte pour Comprendre les psychrophiles. Les membranes biologiques jouent également un rôle physiologique capital étant donné qu'elles contrôlent les échanges moléculaires. Là encore, ce sont des protéines qui permettent à la cellule de capter et de transporter les nutriments et les signaux de natures diverses. Ces processus nécessitent de leur part une grande mobilité au sein de la structure lipidique. Or, aux basses températures, les phospholipides membranaires ont tendance à se figer ce qui a pour effet de réduire ces échanges vitaux SABRI.A, (2001).

III.3. Les psychrophiles dans les produits de pêche

Les produits de la pêche se caractérisent par leurs hétérogénéités, leurs variabilités, leurs extrêmes fragilités et leurs caractères altérables. Rien d'étonnant à ce que leur conservation, difficile, ne soit pas totalement résolue.

D'après KODO (1990), Les germes d'altération des produits de la pêche les plus souvent rencontrés aux températures de réfrigération sont des germes psychrophiles, Gram-, des genres *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.* On trouve aussi par ordre d'importance décroissante, les genres *Sarcina*, *Micrococcus*, et quelques cocci Gram +.

III.3.1. Altération bactériennes des produits de la pêche

Selon (KODO, 1990), l'autolyse aseptique des muscles du poisson favorise la diffusion des liquides biologiques et la progression des bactéries. L'altération bactérienne prend le pas sur les dégradations enzymatiques d'autant plus rapidement que la concentration microbienne est élevée dans les foyers normaux d'infections du poisson (peau, branchies, tube digestif). Sur la peau du poisson, un mucus (mucopolysaccharides, acides aminés libres...) constitue un milieu très favorable à la prolifération bactérienne. La diffusion des micro-organismes de contamination est lente à travers la peau mais facile par les vaisseaux sanguins et la cavité abdominale.

Les micro-organismes de contamination accélèrent la dégradation du poisson. En effet, les muscles étant normalement stériles (sauf chez certains poissons d'eau douce) et les réactions enzymatiques lentes, le poisson s'altérerait beaucoup moins vite en l'absence de la flore de contamination. La composition de cette flore est fonction du milieu ambiant, de la contamination intestinale, elle-même fonction de l'ingestat (*Clostridium botulinum*, entérobactéries...).

L'altération bactérienne des produits de la pêche débute par la disparition de l'odeur « d'algues marines » caractéristique du poisson frais, remplacée progressivement par des odeurs aigres ou acides puis aminées et soufrées, enfin ammoniacales et fécales (à l'état putride) KODO (1990). Ces modifications sont dues à la disparition de certaines substances et

à l'apparition des déchets du métabolisme bactérien. Les acides aminés peuvent être soit désaminés en acides gras inférieurs, soit dicarboxylés pour donner naissance à des aminés toxiques (tyramine, tryptophane, histamine...). L'intervention des micro-organismes rend les produits de la pêche rapidement inconsommables. Elle s'ajoute aux altérations enzymatiques et au rancissement.

Deuxième partie :
Etude
Expérimentale

I. Matériels Et méthodes

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériels

Les analyses microbiologiques effectuées au cours de notre stage, sont réalisées au niveau du laboratoire de Microbiologie, département de biologie de la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.

I.1.1. Les microorganismes testés

Le choix des bactéries a été porté sur 2 souches ; *Streptococcus Sp* isolé à partir de l'espadon congelé et *Streptococcus Pyogenes*

- Certaines souches de *Streptococcus* sont responsables de toxi-infection alimentaire (TIA) constituant ainsi un problème de santé publique.

I.1.2. Les antibiotiques utilisés

Les antibiotiques appartiennent à quatre familles différentes, proviennent de HIMEDIA laboratoire et sont fournis par le laboratoire de microbiologie de UMMTO.

- Céfoxitine (FOX³⁰) de la famille de beta-lactamine.
- Imipénème (I¹⁰) de la famille de la pénicilline.
- Kanamycine (K³⁰) de la famille des aminosides.
- Oxytétracycline (O³⁰) de la famille des cyclines.

I.1.3. L'huiles essentielles

Les huiles essentielles *Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* ont été très aimablement fournies par l'étudiante M^{elle} **Benmessaoud Amel**. L'extraction est réalisée au niveau du laboratoire de protection des végétaux, département de biochimie et de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie IBN KHALDOUN de TIARET.

I.2. Méthodes

I.2.2. Evaluation de la qualité microbiologique des produits de la pêche :

Huit produits de pêches surgelés ont été sélectionnés et transportés dans une glacière et analysés immédiatement.

I.2.2.1. Traitement des échantillons

Dans des conditions aseptiques (bec benzène allumé 15 min à l'avance et la paillasse est désinfecté à l'eau de javel) et après stérilisation de tout le matériel nécessaire, les huit produits de poisson de 25 grammes chacun ont été broyés l'aide d'un mixeur stérile.

I.2.2.2. Préparation des suspensions mères et de la série des dilutions décimale

La suspension mère est la première dilution à préparer à partir d'un produit solide. 25g de chaque produit broyé sont aseptiquement introduites dans un flacon stérile additionné de 225 ml de TSE (Eau physiologique peptonee) Après agitation pour homogénéiser le mélange, la solution obtenue correspond à la première dilution (10^{-1}) de chaque échantillon à analyser.

A partir de la suspension mère, 1ml est prélevé et aseptiquement introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'une pipette graduée c'est la dilution (10^{-2}) ; les autres dilutions sont préparées de la même façon précédente jusqu'à la dilution (10^{-6}).

▪ Recherche et dénombrement de la flore psychrophile totale

Les micro-organismes psychrophiles auraient un optimum de croissance entre 15°C et 20°C, certains pouvant se développer en dessous de 0°C. Le dénombrement de la FPT se fait par un ensemencement en masse qui consiste à pipeté 1 ml de la suspension mère et de chaque dilution décimale dans la boîte de Pétri. Contenant le milieu de culture PCA. Les boîtes sont incubées à +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

▪ Recherche et dénombrement des coliformes fécaux

Les coliformes fécaux font partie de la famille des entérobactéries vivant notamment dans l'intestin des humains et des animaux, dont la température optimale de développement est de 30°C à 37°C. Ces germes se rencontrent également très souvent dans le milieu extérieur et l'environnement de façon générale. Les coliformes totaux sont donc utilisés comme germes indicateurs d'hygiène, indices du bon respect des conditions de fabrication.

Le dénombrement des coliformes fécaux se fait par un ensemencement en masse qui consiste à pipeter 1 ml de la suspension mère et de chaque dilution décimale dans la boîte de pétrie. Contenant le milieu de culture VRBL. Lest boîtes sont incubées à une température de

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

▪ Recherche et dénombrement des entérobactéries

Les Enterobacteriaceae (ou entérobactéries) constituent une famille de bactéries très importante, qui regroupe plus d'une quarantaine de genres. Ces bactéries sont définies par sept critères différents. Bacilles à Gram négatif, mobiles avec ciliature péritriche ou immobiles, poussant sur milieux de culture ordinaires, aérobies-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites, oxydase négatif. On les trouve de manière très répandue aussi bien dans l'environnement que chez de nombreuses espèces animales et végétales.

Le dénombrement des entérobactéries se fait par un ensemencement en masse qui consiste à pipeter 1 ml de la suspension mère et de chaque dilution décimale dans la boîte de Pétri contenant le milieu de culture VRBG. Les boîtes sont incubées à +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

▪ Recherche et dénombrement des bactéries lactique

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires.

Le dénombrement des bactéries lactique se fait par un ensemencement en double couche qui consiste à pipeter 1 ml de la suspension mère et de chaque dilution décimale dans la boîte de Pétri contenant le milieu de culture MRS. Les boîtes sont incubées à une température de +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

▪ Recherche et dénombrement des *Pseudomonas*

Le *Pseudomonas sp* est un bacille à Gram négatif comportant un nombre important d'espèces, on trouve partout dans la nature, et en particulier dans les milieux humides et chauds. Habituellement, cette bactérie est peu agressive envers l'homme, mais elle peut devenir pathogène (responsable d'une maladie) dans certaines circonstances.

Le dénombrement des *Pseudomonas sp* se fait par un ensemencement en surface qui consiste à étaler 0.1 ml de la suspension mère et de chaque dilution décimale dans la boîte de Pétri contenant le milieu de culture cetrimed. Les boîtes sont incubées à +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

▪ Recherche et dénombrement des *staphylococcus aureus*

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

A partir de la suspension mère, on fait un ensemencement en strie à l'aide d'une anse à fil bouclé ou une pipete pasteur sur le milieu de culture Chapman. Les boîtes sont incubées à une température de +4°C pendant 10 jours. La lecture s'effectue sur les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 à 300.

▪ Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Streptocoque est un terme qui désigne un ensemble de bactéries du genre Streptocoques. Certaines de ces bactéries sont naturellement présentes dans le corps au niveau du tube digestif notamment. Les streptocoques sont responsables de très nombreuses infections .

Technique

La technique fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- Tests de présomption : qui se fait sur milieu Rothe
- Tests de conformation : qui se fait sur milieu Eva Litsky.

Test présomptif

On Ensemence 1ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml du milieu sélectif de Rothe. La lecture s'effectue. Le tube à essai est incubé au réfrigérateur à 4°C pendant 10 jours. Apparition de trouble dans le tube, suspicion présence de streptocoque.

Test confirmatif

On prélève 2 gouttes à partir du tube positif et on ensemence le milieu Eva Litsky. Homogénéiser parfaitement l'inoculum dans le milieu et incubé tube à 4°C pendant 10 jours

Lecture

Les tubes sont considérés comme positif, ils présentent un trouble microbien et une pastille violette au fond du tube.

I.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

I.2.2.1. Préparation de l'inoculum

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir de cultures jeunes de 18 à 24h en phase exponentielle de croissance. Un repiquage a été réalisé à partir du bouillon nutritif dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton puis incubées pendant 24 h à 37°C

I.2.2.2. Préparation de la suspension bactérienne

Quelques colonies, sont dissoutes dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne a été standardisée à une DO de 0.08-0.1 à l'aide d'un spectrophotomètre à 625 nm qui correspond à 10^7 UFC/ml.

I.2.2.3. Test de sensibilité des souches bactériennes aux huiles essentielles

L'aromatogramme consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes testés soumis au contact des huiles essentielles étudiées (*thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*). Cette méthode a été réalisée sur milieu Mueller Hinton. Chaque suspension standardisée 10^7 UFC/ml est ensemencée par écouvillon dans les boîtes. Des disques de papiers Wattman stériles imprégnés de 20µl de l'huile essentielle ont été déposés au centre de chaque boîte. En raison de l'hydrophobicité des huiles essentielles et pour avoir une meilleure diffusion de ces huiles dans le milieu un émulsifiant Diméthyle Sulfoxyde (DMSO) est additionné aux huiles essentielles à raison de 10%.

Un témoin négatif a été réalisé par un dépôt de 20 µl de DMSO sur un disque entreposé sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie testée

Un témoin positif a été réalisé par un dépôt d'un disque de chacun des quatre antibiotiques synthétiques sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie testée.

La lecture a été effectuée par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Selon PONCE *et al*, (2003) la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles est déterminée comme suite :

- ✓ Non sensible(-) ou résistante si le diamètre est inférieur à 8 mm
- ✓ Sensible (+) si le diamètre est compris entre 9 mm et 14 mm
- ✓ Très sensible (++) si le diamètre est compris entre 15 mm et 19 mm
- ✓ Extrêmement sensible (+++) si le diamètre est supérieur à 20mm

I.2.2.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne. Les CMI ont été déterminées suivant la technique de micro dilution en utilisant des épandoffs.

Une solution mère a été préparée 300µl, 150µl d'H.E additionné du DMSO (10%) placés dans un épandoff contenant 150µl du DMSO. Des dilutions de demi à demi ont été réalisées dans un milieu bouillon nutritif, (les mêmes dilutions ont été réalisées pour les 3 huiles essentielles) de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 300µl/ml et 0.01µl/ml

Ensuite 15µl de la suspension bactérienne standardisée à 10^3 UFC/ml sont ajoutées à chaque dilution. Deux témoins sont réalisés. Un témoin positif composé de 285µl et 5µl de l'inoculum bactérien et un témoin négatif composé de 150µl de bouillons nutritif et 150µl de l'H.E additionné du DMSO.

La lecture a été faite après 24 h d'incubation à 37° C. à l'œil nu par l'observation de la présence ou absence de trouble.

I.2.2.5. Concentration minimale bactéricide

Pour déterminer la concentration minimale bactéricide on ensemence à partir des épandoffs précédents n'ayant pas présenté de trouble sur la gélose nutritif. On ensemence un témoin positif (souches+BN) sur le quel on fait référence.

I.2.2.6. L'étude de l'effet de la combinaison des huiles essentielles

Afin de mettre en évidence l'effet synergique ou antagoniste entre les huiles essentielles, des combinaisons entre les huiles émulsifiées dans le DMSO ont été effectuées avec différentes concentrations

Tableau I : Les différentes combinaisons d'huiles essentielles testées

Test	<i>Thym fontanesii</i>	<i>Mentha spicata</i>	<i>Mentha pulegium</i>
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
5	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
6	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
7	1/3	1/3	1/3
8	1/6	1/6	2/3
9	1/6	2/3	1/6
10	2/3	1/6	1/6

1 : présence d'une seule huile

0 : absence de l'huile

Test 4: 50 % *Thymus fontanesii* + 50% *Mentha spicata* + 0% *Mentha pulegium*

Test 5: 50% *Thymus fontanesii* + 0 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.

Test 6: 0% *Thymus fontanesii* + 50 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.

Test 7: 33.3% *Thymus fontanesii* + 33.3 % *Mentha spicata* + 33.3% *Mentha pulegium*

Test 8: 25% *Thymus fontanesii* + 25 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.

Test 9: 50% *Thymus fontanesii* + 0 % *Mentha spicata* + 50% *Mentha pulegium*.

Test 10: 50% *Thymus fontanesii* + 50 % *Mentha spicata* + 25% *Mentha pulegium*.

Les disques imbibés de 20µl de chaque concentration sont déposés sur les boîtes de Pétrie préalablement coulés ensemencés.

D'après PIBIRI, (2005) il existe quatre effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles ainsi que pour les antibiotiques :

Indifférent : l'activité d'huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.

Addition : effet de l'association est égale à la somme des effets de chaque huile essentielle étudié.

Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque l'huile essentielle

Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre de l'huile.

I.2.2.7. Effet inhibiteur des H.E de *thymus fontanesii* sur les souches inoculées à la soupe de poisson

I.2.2.7.1 Mode opératoire

La soupe de poisson est achetée dans une grande surface. La composition est en annexe. Dans des conditions aseptiques, nous avons introduit de l'huile essentielle *thymus fontanesii* à raison de 0,8% dans la soupe inoculée de 10^3 UFC de chaque souche séparément. La préparation est conservée de +4°C pendant 5 jours.

Le dénombrement des deux souches en questions est effectué chaque 24h pendant 5 jours (J₁.J₂.J₃.J₄.J₅).par ensemencement en surface sur milieu sélectifs (BEA).

La lecture est réalisée par comptage direct des colonies caractéristiques pour l'espèce après incubation à 37°C pendant 24h.

II. résultats Et discussion

II. Résultats et discussion

1I.1. Résultats d'analyse microbiologique

1I.1.1. Recherche et dénombrement

Les résultats de la recherche et dénombrement des différents germes dans les produits de pêche congelés sont représentés dans la figure 5.

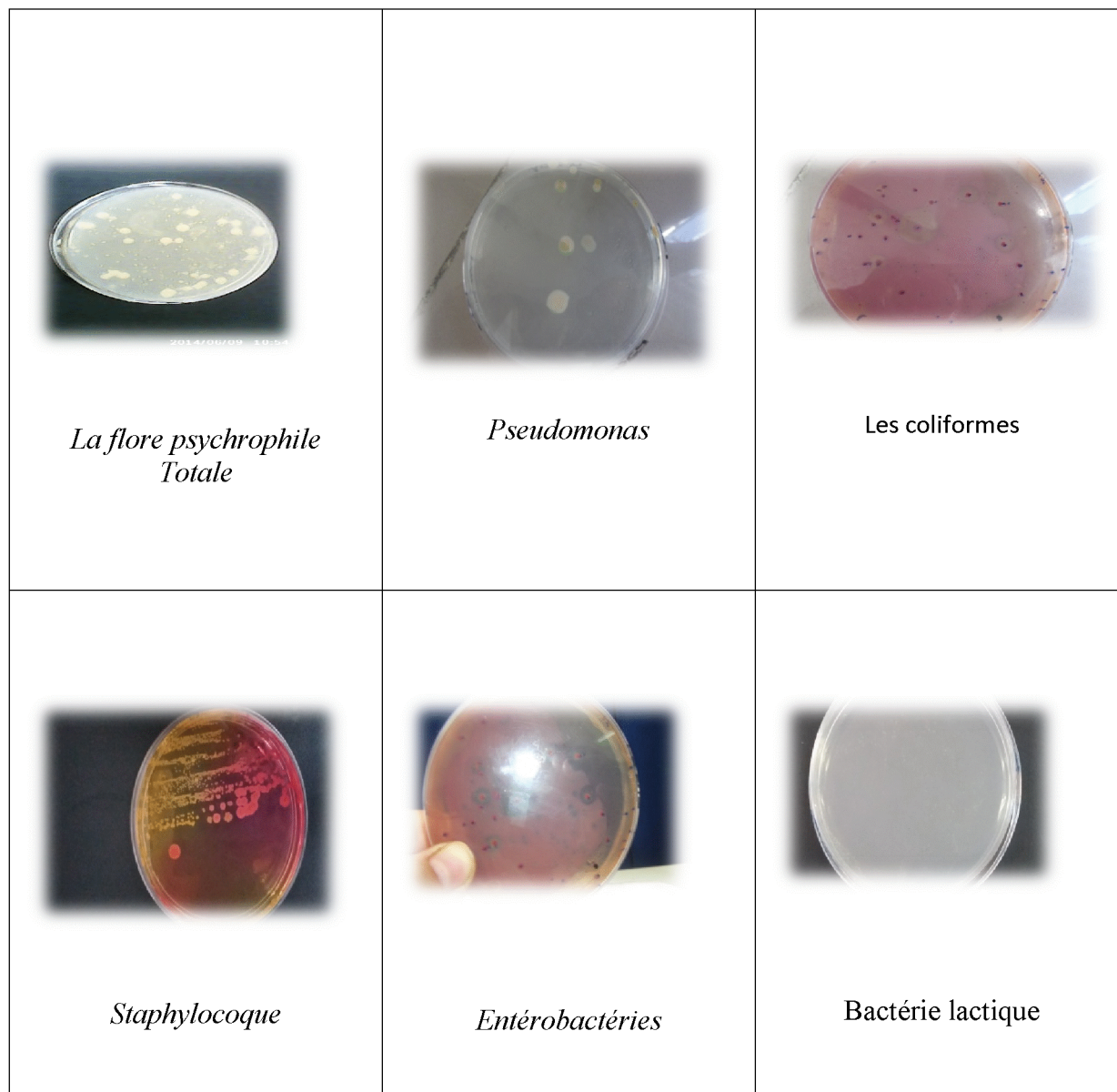


Figure 5 : photos représentantes des résultats obtenus de l'analyse la qualité microbiologique

Après la période d'incubation de 10 jour a +4°C, on procède au comptage des colonies

Caractéristiques pour chaque boîte contenant 15 à 300 colonies selon la formule :

$$N = C_1 + C_2/V(n_1 + 0.1n_2)d$$

N : La charge microbienne dans l'échantillon

C₁+C₂ : somme des colonies sur deux boîtes retenues.

V : volume de l'inoculum appliqué a chaque boîte.

D : taux de dilution correspondante à la première dilution retenue.

n₁ : nombre de boîte retenue à la première dilution.

n₂ : nombre de boîte retenue à la deuxième dilution.

Tableau II : Résultats de dénombrement des différents germes.

	Echantillon1 Calamar (Espagne) UFC/g	Echantillon2 Calamar (France) UFC/g	Echantillon3 Seiches (Inde) UFC/g	Echantillon4 Saumon (chine) UFC/g	Echantillon5 Saumon (Espagne) UFC/g	Echantillon6 Crevettes (Inde) UFC/g	Echantillon7 Crevettes (Espagne) UFC/g	Echantillon8 Chien de mer (Espagne) UFC/g
Flore psychrophile	5,3. 10 ⁶	1,39. 10 ⁷	8,99. 10 ⁶	1,02. 10 ⁷	1,55. 10 ⁶	2,1. 10 ⁶	2,1. 10 ⁶	8,18. 10 ⁵
Coliforme totaux	3,5. 10 ⁶	7,98. 10 ⁶	2,00. 10 ⁶	1,20. 10 ⁶	1,68. 10 ⁶	2,00. 10 ⁷	1,05. 10 ⁷	6,38. 10 ⁷
Entérobactéries	2,30. 10 ⁶	4,84. 10 ⁷	6,09. 10 ⁶	IND	3,2. 10 ⁷	1,95. 10 ⁷	3,9. 10 ⁷	3,23. 10 ⁷
Pseudomonas	1,95. 10 ⁶	1,2. 10 ⁸	4,81. 10 ⁵	3,09. 10 ⁵	4,6. 10 ⁶	3,4. 10 ⁸	5,9. 10 ⁵	8,9. 10 ⁵
Staphylocoque	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	présence	ABS	ABS
Bactérie lactiques	2,7. 10 ⁴	5,4. 10 ⁴	ABS	ABS	ABS	présence	ABS	ABS
Streptocoques	ABS	ABS	PRE	ABS	ABS	présence	ABS	ABS

-La flore psychrophile totale

Les résultats des analyses microbiologiques montrent que 100% des échantillons sont contaminés par la flore psychrophile totale avec une charge très élevée (1,39. 10⁷ UFC/g) obtenue dans l'échantillon 2.

-Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques font partie des microorganismes produisent de l'acide lactique, d'après les résultats, absence de ces bactéries dans tout les échantillons de poisson.

-*Pseudomonas sp*

Pour *Pseudomonas*, Il est présent dans tous les échantillons analysés avec une forte charge observée dans échantillon n°8 qui est de $8.9.10^5$ UFC/g et une plus faible charge dans l'échantillon n°2 avec une charge de $1.02.10^8$ UFC/g.

-Entérobactéries

Nous avons noté la présence des entérobactéries dans tous les échantillons étudiés avec une charge très variable et indénombrable dans l'échantillon n°4.

-Coliformes totaux

Nous avons remarqué une forte présence de ces germes dans tous les échantillons avec une charge qui varie de $1.2.10^6$ à $6.38.10^7$ UFC/g.

- Les Streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont rencontrés uniquement dans les échantillons 3 et 6. Leur présence se caractérise par une pastille violette sur milieu Litsky et des colonies noires sur milieu B.E.A.

- *Staphylococcus aureus*

D'après les résultats obtenus on a remarqué absence totale dans tous les échantillons analysés à l'exception de l'échantillon n° 6.

L'évaluation de la qualité microbiologique de poisson nous a permis d'apprécier leur niveau de qualité microbiologique et leur niveau d'hygiène général. La contamination des produits analysés est peut-être due aux:

- ❖ Manque d'hygiène du personnel en industrie de transformation.
- ❖ Interruption de chaîne du froid lors du transport, du stockage et de la découpe ; que se soit dans les ports ou dans l'industrie de transformation.
- ❖ Opérations de découpe à l'environnement (sol, l'eau, l'air) ainsi que l'outillage mal nettoyé.

II.2. Résultats du test de sensibilité des souches aux huiles essentielles (*Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*).

Lors de cette étude, nous avons testé les huiles essentielles de trois différentes plantes vis-à-vis de deux souches bactériennes *Streptococcus Sp* (isolé d'espadon congelé) et *Streptococcus pyogenes* en appliquant la méthode de diffusion sur disques (la plus rapide) pour tester leur l'activité antimicrobienne. Les résultats sont illustrés dans la figure 6 et 7

pour tester leur l'activité antimicrobienne. Les résultats sont illustrés dans la figure 6 et 7

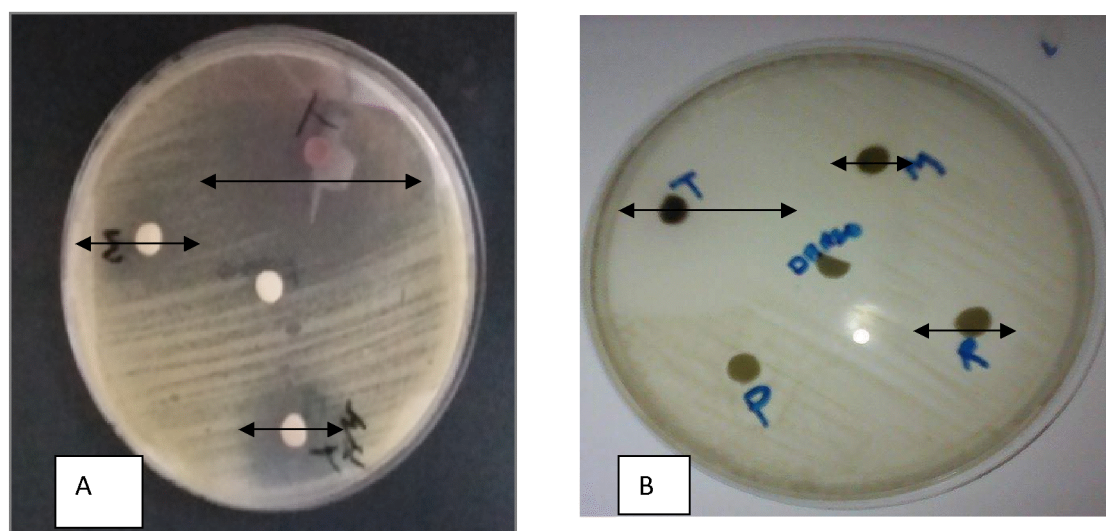


Figure 6 : Effets inhibiteur des H ES (*Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*) sur les deux souches A. *Streptococcus Sp* et B *streptocoques pyogène*.

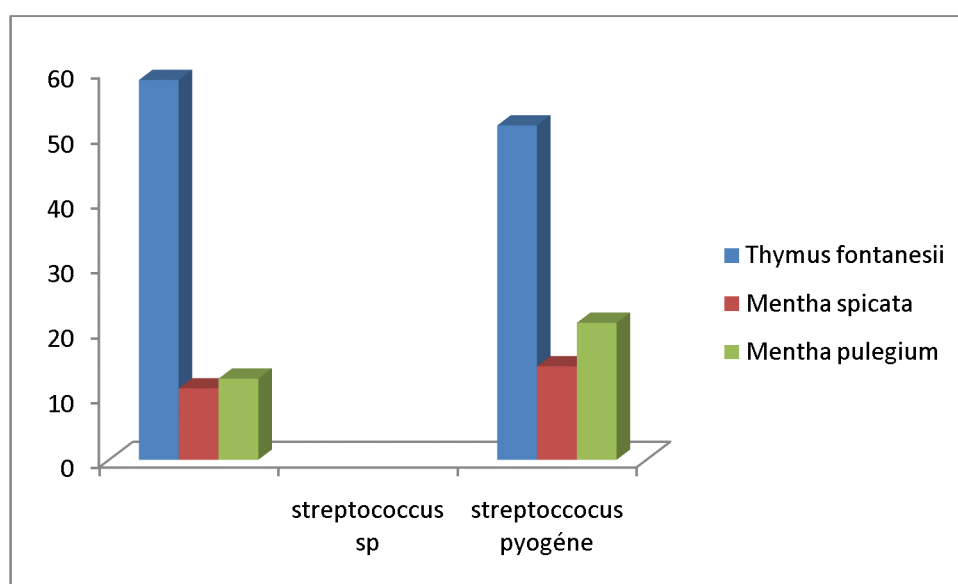


Figure 7 : Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles

D'après BOUDOUX et *al*, (2001), on considère qu'une l'huile essentielle a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm. Ainsi, d'après les résultats obtenus, les souches testées sont sensibles à l'ensemble des huiles essentielles étudiées.

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est nettement plus active sur les deux les deux souches.

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii*, riche en thymol et en carvacrol, agit de façon plus active que celle de *Mentha pulegium*, très riche en pulegone. Il a été prouvé que le pulegone présente une faible voire absence d'activité antimicrobienne lors de l'Eude de pouvoir antifongique des huiles essentielles caractérisées par une forte teneur en pulegone (ARAS et al, 2001, CHEBLI et al, 2003).

Selon KALEMBA et al, (2003), la sensibilité des microorganismes dépend des propriétés des huiles essentielles testés et du microorganisme lui-même. La plus part des études ont montré que les bactéries à Gram(+) sont généralement plus sensibles que les bactéries à Gram(-) (BEKHECHI et al, 2008).

11.3. Résultats du teste de sensibilité des souches aux antibiotique synthétique (antibiogramme)

Les résultats de l'effet des antibiotiques sur les deux souches sont présentés dans la figure 8 et tableau III

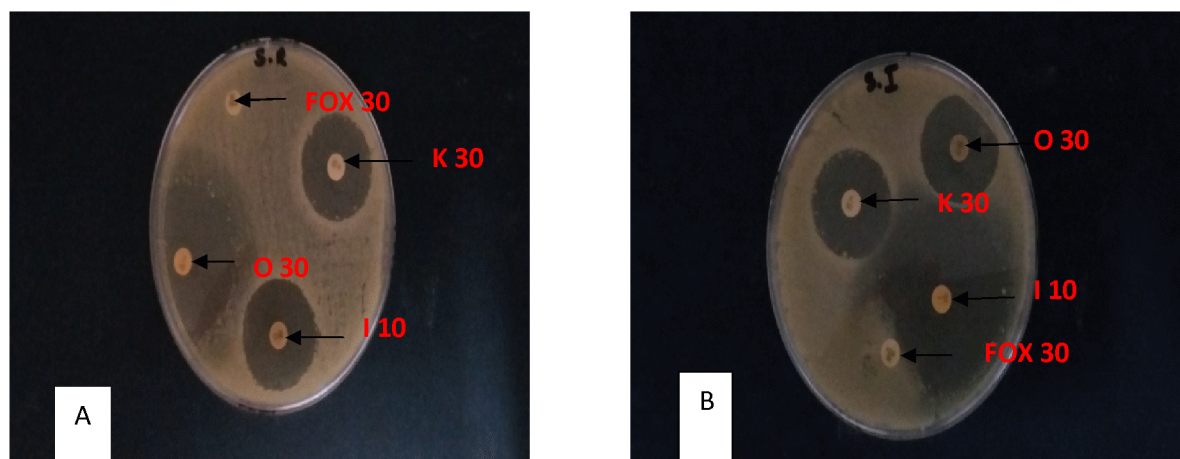


Figure 8 : résultats obtenue avec les antibiotiques synthétiques(FOX³⁰.I¹⁰.O³⁰.K³⁰)
A- *Streptococcus pyogène* B- *Streptococcus Sp*

Tableau III : résultats du diamètre d'inhibition en (mm) des antibiotiques utilisés :

	FOX ³⁰	I ¹⁰	K ³⁰	O ³⁰	
	Diamètre d'inhibition en mm, (moyenne et écart type)				Sensibilité
<i>Streptocoque sp</i>	0	39.2±0.7	25.1±0.1	25.2±0.3	(+++)
<i>Streptocoque pyogène</i>	0	25.1±0.1	25.3±0.3	26.5±	(+++)

D'après les résultats obtenue, nous remarquons que les souches présentent presque une même sensibilité vis-à-vis des antibiotiques testés. Les deux souches se sont montrées sensibles aux trois antibiotiques (I¹⁰, K³⁰, O³⁰), mais résistantes à FOX³⁰.

II.4. Résultats de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide :

II.4.1. Résultats de la concentration minimale inhibitrice de *Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*

Tableau IV : Les valeurs de CMI de l'huile essentielle testée sur *streptococcus sp*.

L'huile essentielle	CMI (µl/ml)	Pourcentage(%)
<i>Thymus fontanesii</i>	0.29	0.09
<i>Mentha spicata</i>	0.39	1.17
<i>Mentha pulegium</i>	9.37	3.12

Tableau V : les valeurs de CMI de l'huile essentielle testée sur *streptococcus pyogène*.

L'huile essentielle	CMI (µl/ml)	Pourcentage(%)
<i>Thymus fontanesii</i>	0.58	0.19
<i>Mentha spicata</i>	4.68	1.56
<i>Mentha pulegium</i>	18.75	6.25

II.4.2. Résultats de la concentration minimale bactéricide

D'après les résultats obtenus des CMB et CMI, on peut dire que les bactéries testées réagissent de la même manière vis-à-vis des huiles essentielles des trois plantes (figure 9)

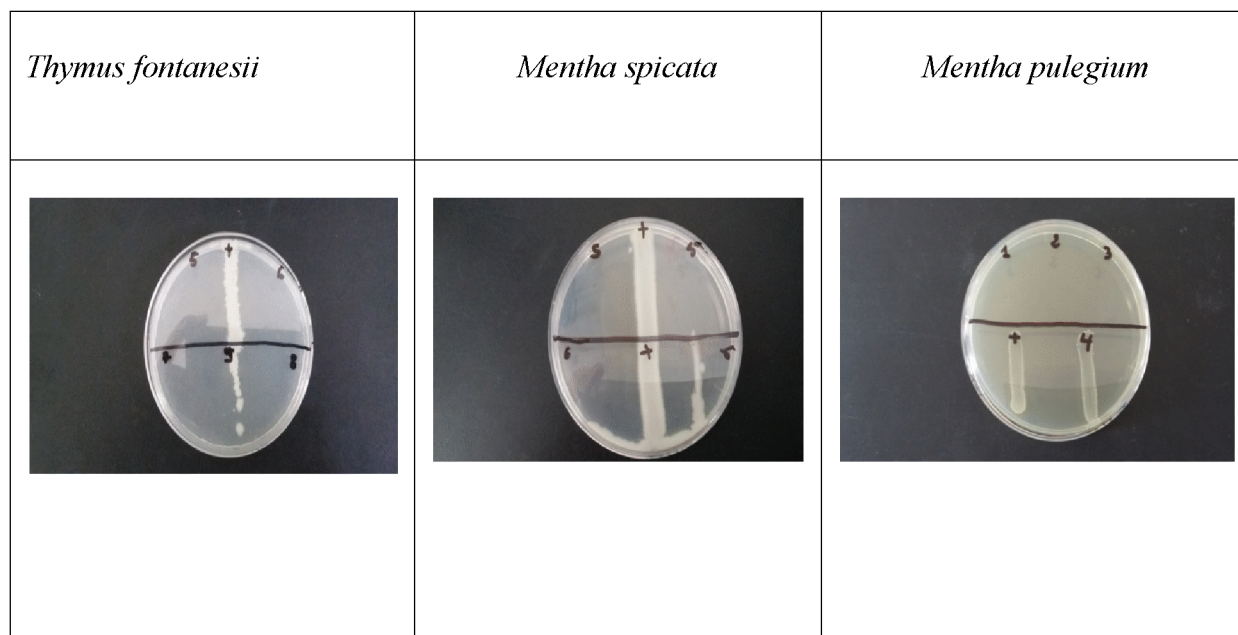


Figure 9: résultats de la diffusion sur gélose (CMB)

Les résultats de la diffusion sur gélose ont montré que parmi les huiles essentielles testées, l'huile essentielle de *Mentha pulegium* présente une faible activité antimicrobienne, contrairement à l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et de *Mentha spicata*. Les CMI ont été calculées pour les trois huiles essentielles

L'huile essentielle de *thymus fontanesii* a montré un effet inhibiteur à la dilution 0.09% et 0.19% ce qui correspond à la concentration de 0.29µl/ml et 0.58µl/ml sur *Streptococcus Sp. et isolé* et *Streptococcus pyogène*. Pour l'huile essentielle de *Mentha spicata* l'effet inhibiteur a été observé à la dilution 1.17% et 1.56%, ce qui correspond à 0.39µl/ml et 4.68µl/ml pour *streptococcus Sp et streptocoque pyogène*. D'après les résultats de la CMI, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* exerce une meilleure activité antimicrobienne par rapport à l'huile essentielle de *Mentha sp* vis-à-vis de *Streptococcus pyogène*

FARAH HADOUCHI et al, (2002) ont testé l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sur cinq souches différentes (*Bacillus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus aureus*, *enterobacter* et *E. coli*), la souche *Enterobacter* est la plus résistante avec une CMI comprise entre 614.6 et 9219µl/ml. la CMI de *bacillus* et *Staphylococcus aureus*

sont comprises entre 368.7 et 460.9 $\mu\text{l/ml}$ alors qu'*Acinetobacter* et *E. coli* ont des CMI_s plus faible qui sont comprises entre 184.3 et 368.7 $\mu\text{l/ml}$. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* est donc très active sur l'ensemble de souches testées à part *Pseudomonas* qui se révèle la moins sensible ayant une CMI_s très élevé (DUARTE et al, 2005).

II.5. Résultats de la combinaison des huiles essentielles:

Bien que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles soit attribuée à son composé majoritaire, l'effet synergique ou antagoniste de chacun des constituants présent en faible teneur est également pris en considération. (DAFERERA et al, 2003).

Les résultats de la combinaison des huiles sur les deux souches sont représentés dans la figure 10 Et le tableau 6.

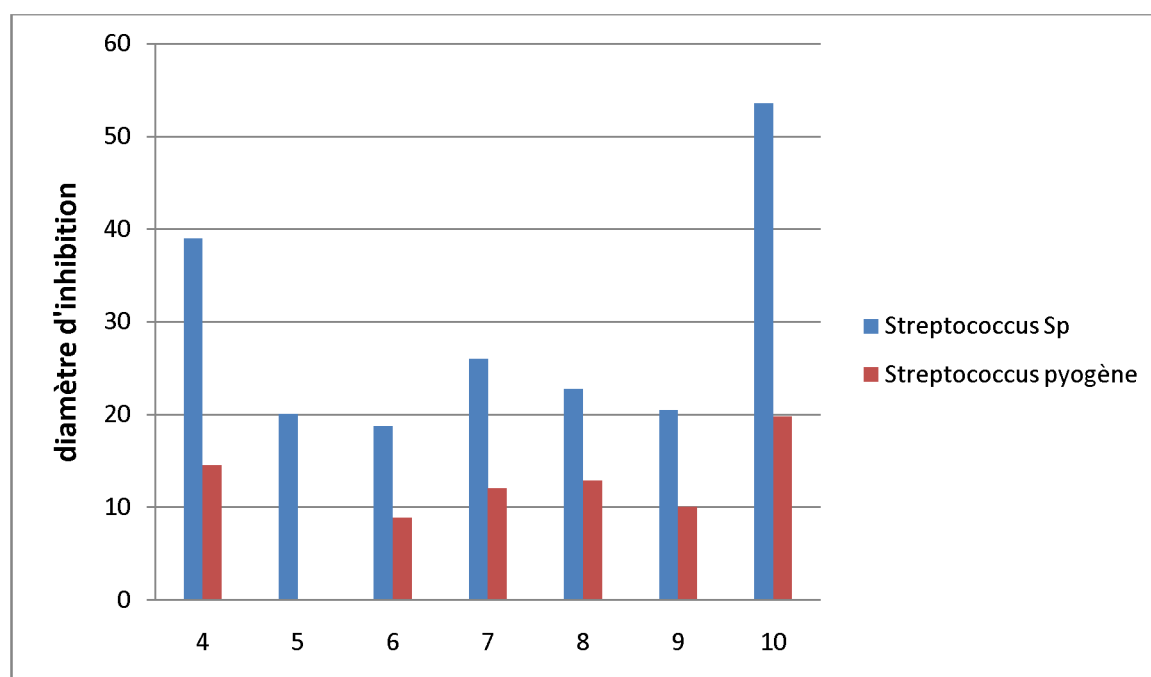


Figure 10 : résultats de la combinaison entre les huiles essentielles *thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*

Tableau VI : résultats des combinaisons entre les huiles essentielles testées sur *Streptococcus pyogenes*.

	Diamètre d'inhibition en (mm) en moyenne et écart type													
□	4		5		6		7		8		9		10	
	Diamètre	Sensibilité	diamètre	sensibilité	diamètre	Sensibilité	diamètre	sensibilité	diamètre	sensibilité	Diamètre	sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>Streptocoque pyogène</i>	39.0 ±01	(+++)	20.1 ±0.8	(+++)	18.8 ±0.1	(++)	26.0 ±1	(+++)	22.8± 0.3	(+++)	20.5 ±0.5	(+++)	53.6± 0.4	(+++)
<i>Streptocoque sp</i>	14.6 ±0.4	(+)	/	/	8.9 ± 0.15	(+)	12.1 ±0.1	(+)	12.9 ±0.1	(+)	10.05 ±0.55	(+)	19.85 0.15±	(+++)

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les six combinaisons testées présentent un effet antibactérien sur les deux souches, mais l'effet le plus prononcé est obtenu avec la combinaison 2/3 de *Thymus fontanesii*, 1/6 de *Mentha spicata* et 1/6 de *Mentha pulegium*.

Les études menées par SALEHI et al, (2005) sur l'effet antimicrobien des huiles essentielles *ziziphora clinopodioides* (pulegone 45.8%), ainsi que celle de son composé majoritaire vis-à-vis de sept bactéries (aromatogramme), montrent que les deux échantillons possèdent un même niveau d'efficacité sur les microorganismes testés, soit entre 9 et 15 mm (selon les différentes bactéries) pour la pulegone et entre 11 et 18 mm pour l'huile essentielle, malgré qu'elle contienne une teneur en thymol (8%).

II.6. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* appliquée à la soupe de poisson

Dans cette partie, nous avons essayé de vérifier l'efficacité de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle *Thymus fontanessi* en appliquant sur un produit alimentaire qui est la soupe de poisson.

en se basant sur les résultats de l'aromatogramme, On a pu suivre la croissance et le développement des deux souches bactériennes *Streptococcus Sp* et *Streptococcus pyogène* inoculées dans la soupe de poisson en présence de l'huile éssentielles *Thymus fontanessi*

Les figure 11 et 12 .montre les resultats du devloppement de *Streptococcus Sp* et *Streptococcus pyogène* sur la soupe de poisson conservée à + 4°C pendant 5 jours .

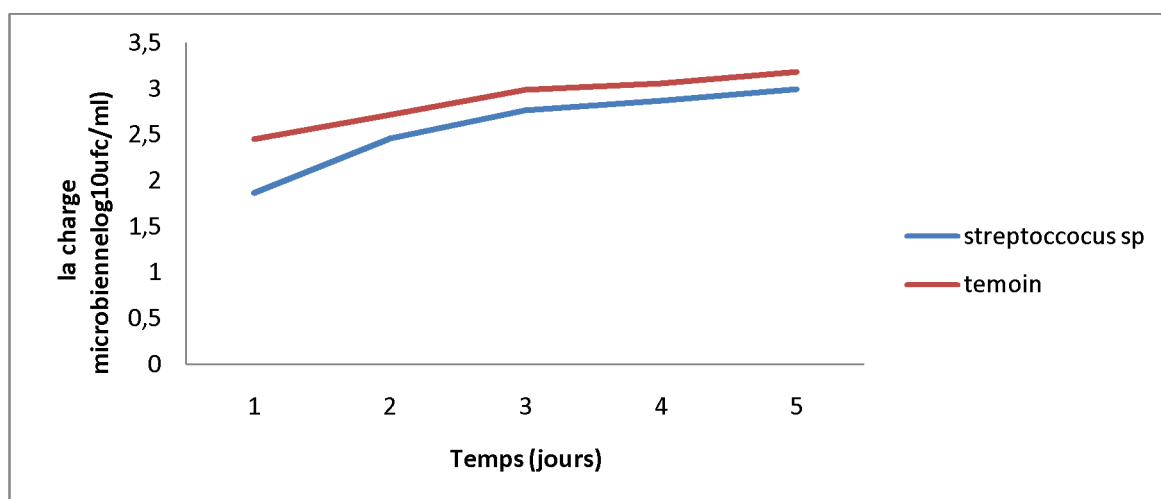


Figure 11 : représentation graphique de l'évolution de la croissance de *streptococcus sp* en fonction de la période de conservation.

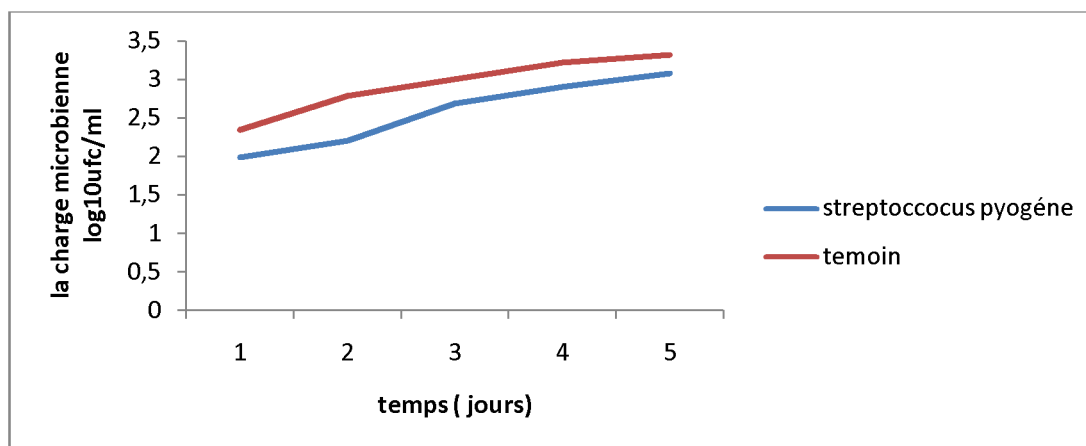


Figure 12 : représentation graphique de l'évolution de la croissance de *streptococcus pyogène* en fonction De la période de conservation.

La figure 12 montre la charge microbienne de dans la soupe de poisson avec et l'huile essentielle de *thymus fontanesii* (témoin). Durant les 5 jours de conservation à +4°C, la charge bactérienne de la soupe avec l'huile essentielle à atteint 2.9 (log₁₀ufc)/ml 3.5 (log₁₀UFC/ml) pour *Streptococcus Sp* et 3.08 (log₁₀ufc)/ml contre 3.5 (log 10UFC/ml) pour *Streptococcus pyogène*.

L'huile essentielle testée montre une activité antimicrobienne performante car elle a permis la réduction de la charge bactérienne par rapport au témoin positif et cela tout le long de la période de conservation.

Il semble que l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* à une activité antimicrobienne pas très importante dans la matrice alimentaire, et cela pourrait être dû à sa composition chimique, ou le degré de diffusion. Il est incontestable que plusieurs l'huiles ont une activité antibactérienne, cependant elles réagissent autrement lorsque elles sont appliquées dans les matrices alimentaires. Selon OUSSALAH et *al.* (2007) la divergence dans l'activité antibactérienne peu être liée à la concentration, à la nature et le nombre de aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et leur interaction synergique possible.

La présence dans l'aliment d'éléments nutritifs comme les graisses, protéines, substances anti-oxydantes, le sel, le pH, température, condition de stockage, microorganismes, peuvent influencer sur l'activité des huiles essentielles. D'après HOLLEY et *al.* (2005), à Ph bas l'hydrophobicité des huiles essentielle augmente, ce qui leur permet de se dissoudre facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne.

Selon HELLAL, (2011), l'huile essentielle testée expérimentalement peu ne pas avoir le même effet dans un autre produit alimentaire. D'après BURT, (2004), pour obtenir un effet antimicrobien meilleur d'une l'huile essentielle dans une matrice alimentaire il faut utiliser des concentrations importantes.

De plus, les huiles essentielles peuvent avoir des odeurs assez fortes et prononcées (HELLAL.2011), ce qui peut être un inconvénient pour leur application dans des produits alimentaires. Mais selon CAILLET et LACROIX, (2007) les effets organoleptiques indésirables peuvent être évités en sélectionnant l'huile essentielle appropriée à chaque denrée alimentaire comme par exemple l'huile essentielle adaptée pour l'application sur les viandes et les produits carnés sont : le thym, l'origan, clou de girofle.

Conclusion

Ce travail est une contribution à l'évaluation de la qualité microbiologique du poisson surgelé importé, pris au hasard, ainsi que l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes : *Thymus fontanesii* *Mentha sp* et *Mentha* deux souches de *Streptococcus*.

Les résultats obtenus permettent de conclure que le poisson présent une contamination à *Pseudomonas* sur l'ensemble des échantillons testé avec une forte charge observée dans l'échantillon n° 8 qui est de $8,9.10^5$ UFC/g, à Flore psychrophiles totale avec une charge importante de $8,9.10^6$ UFC/g dans l'échantillon n° 8 et une faible charge dans l'échantillons n° 2 qui est de $1,02.10^8$ UFC/g, au entérobactéries qui été indénombrable et coliformes avec une charge de $6,38.10^7$ UFC/g, mais absence de bactérie lactique, de *staphylococcus aureus* et de *streptocoque fécaux* dans la plus part des échantillons. L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a exercé une activité antibactérienne importante sur les deux souches testés (*streptocoque isolé* et *streptocoque pyogènes*) par contre, l'huile essentielle de *Mentha sp* et *Mentha pulegium* ont révélé une faible activité.

On ce qui concerne les CMI_s, l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a montré un effet inhibiteur très important avec une concentration minimale qui de 0.29µl/ml obtenue sur *streptococcus isolé*.

Une étude plus prononcée de l'huile essentielle *Thymus fontanesii* en combinaison avec l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a permis de mettre en évidence un effet synergique envers les deux bactéries. L'huile essentielle de *Mentha sp* combiné avec *Mentha pulegium* a donné un effet antagoniste envers *streptocoque pyogènes*.

Quant aux résultats des testes de l'application de huiles essentielle de *Thymus fontanesii* dans la soupe de poisson. L'huile essentielle s'est révélée intéressante par son pouvoir antimicrobien. Cette l'huile essentielle peu être utilisée comme agent naturel de conservation des produits de la pêche.

Références bibliographiques

ANTON.R, LOBSTEIN.A, (2005). Plante aromatiques, épices, aromates, condiment et l'huile essentielle *Tec&Doc*. Paris. P522.

ARAS.G, USAI.M, (2001). Fungi toxic activity of twelve essential oil against four postharvest *Citrus* pathogens: chemical analysis of *thymus capitatus* (L) Huffing. Oil a dits effect in sub atmospheric pressure condition. *J of food protection*, 64:P1025-1029.

ARPIGNY.J.L, FELLER, G, DAVAIL, S, GENICO, S, NARINX, E., ZEKHNINI, Z. AND GERDAY, C(1994) .Molecular adaptations of enzymes from thermophilic and psychrophilic organisms.*Adv. Comp. Env. Phisiol.* 20, P 269-295.

BAKKALI.F, AVERBECK.D, ET IDAOMAR.M, (2008). Biological effects essential-oil-A review. *Food and chemical toxycology* 46, P446-475.

BEKHECHI.C, ATIK, BEKKARA.F, ABDEL OUHIB D.E, (2008).Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles *d'origanum glondulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*6, P 153-159.

BEKHECHI.C, (2009). Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen et études de leur pouvoir antimicrobien. Thèse de doctorat de l'université d'Abou bakr Belkaid région de Tlemcen Algérie.

BENBOUALI.M, (2006). Valorisation de plante aromatique et médicinale de *Mentha rotundifolia* et *thymus vulgaris*.thèse de magister université de Hassiba ben Bouali région de Chlef Algérie.

BERGONZELLI.G.E, DONNICOLA.D,PORTA.N,CORTHESEY.I.E,(2003). Essential-oil as components of adeit-basedapproach to management of helicobacter infectionantimicrob.agents .chemother,47 P 3240-3246.

BILLERBECK.V.G,(2007). Huiles essentielles, bacteries resistantes aux antibiotiques *phytothérapie* 5,P 249-253.

BOUAZIZ .M,YANGUI.TH,SAYADI.S,DAHOUIB.A, (2009). Disinfectant propertiesof essential oil from *salvia officinalis* L cultivated in tunisia. *Food and chemical toxycology*47,P 2755,2760.

BOUDOUX.D, (2001). Aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles 2 *Ed Atlantica*. P25-26, 34-36.

BRUNTON.J, (1999). Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales Edition technique et documentation 3^{ème} Edition Lavoisier, Paris 1120.

BURT, (2004). Essential oils their antibacterial properties and potential application in food a review, *international journal of food microbiology*, 94, P 223-253.

CAILLET.S, LACROIX.M, (2007). Les huiles essentielles : leur propriété antibactériennes leur application potentielles en alimentation, laboratoire de recherche en science appliquées a l'alimentation (ROSALA) de l'NRS institut Armand-Frappier. Université de laval(Québec).

CHARPENTIER.B, -LORLEAC'HF, HARLY.A, HUARD.A, RIDOUX.L CHANSELLE.S, (2008). Guide de préparateur en pharmacie.3^{ème} édition Elsevier Masson 1358.

CHEBLI.B, ACHOUR.M, IDRISSE HASSANI.LM, HMAMOUCHE.M, (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Marrocon Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: *Fr j of Ethno pharmacology*, 89, 165-169.

COTTIN. J. H., BIZOU C., CARBOUNELLE B, (1985). Study of *Listeria monocytogenes* in meat from 415 chateaux and restaurants 5 series 4 P 145 -149.

CLINQUART A, FARRY J, CASTTEEL M.J. (1999). Les viandes et les produits de viande dans notre alimentation Ed CNRS. P: 76.

CROTEAU.R, (1988).Catabolism of monoterpenes in essential oil plants In: BM LAWRENCE, BDMOOKHERDJEE and B.J, WILLIS (eds) flavour and fragrance,A words perspective Elsevier science publishers. Amsterdam P 65-84.

D'Amico S, Collins T, Marx J-C, (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports* 7: P 385–389.

DAFERERA.D.J,ZIOGAS .B .N, POLISSIOU.M.G, (2003).The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp* and *Clavibacter michiganensis*. *Crop protection*, 22: P 39-44.

DEKBAS.N , DADASOGLU.F, KOTAN.R,CAKIR.A, (2011). Influence of summer savory essential oil on decay of strawberry and grape. *Journal of essential oil bearing plants* 14(2):P151-160.

DJENANE.D SANCHEZ-ESCALANTE.A, BELTRANJ.A,RONCALES.P,(2001). Ability of alpha -tocopherol and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere . *food chemistry*76.P 407-415.

DJENANE.D,AIDER.M, YANGUELA.J ,IDIR.L,GOMEZ.D, RONCALES.P, (2012). Antioxidant and antibacterial effects of lavender and mentha essential oils in minced beef

inoculated with *E.coli* O157:H 7 and *S.aureus* during storage at abuse refrigeration temperature *Food science*, 92, P 667-674.

DUARTE, M.C.T, FIGUEIRA G.M, SARTORATTO A, REHDER V.L.G AND DELARMELINA. C, (2005). Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethno pharmacology*, 97: P305-311.

ERMAN W.F, (1985). Chemistry of monoterpene in P.G Gassaman (ED) studies in organic chemistry Vol II and B Marcel Dekker. New york, 101.

HADOUCHI.F, HAMADI ABDURRAHMAN. L, ABDI-EL-KADER ET ABDELHAFID, B. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle De *Thymus fontanesii* Boiss & Reut, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Tlemcen, Algérie.

FELLER, G. AND GERDAY, C. (1997). Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, P 830-841.

FRANCHOUM. P, PENOEL.D, (1990). Matière médicale aromatique fondamentale l'aromathérapie exactement. Roger jallois éditeur. Limoge 4.317-446.

GARCIA. R, LOPEZ. S, FERNANDEZ. M, BODAS. R, GONZALEZ J.S, (2008). Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 36–52.

GUIGNARDJ.L, (2004) 1^{ère}/ License pharmacies CAPES. Biochimie végétale 2^{ème} Ed: DUNOD, Paris

GILLE.M, ZHAO.J, AN.M AGBOOLA.S, (2009). identification component of the essential oil from wild Corsican *daucus carota* L using ¹³C NMR spectroscopy *flavour fragr. J*, 19, 433-424.

GUBA.R, (2001). Toxicity of essential oils and their carcinogenic potential *international journal of aromatherapy*, 11, P 76-83.

GUINOISEAU.E, (2010), Molécules antimicrobiennes issues d'huiles essentielles, séparation, identification et mode d'action, thèse de Doctorat université de Corse.

HELLAL.Z, (2011). Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne et anti-oxydante de certaines huiles essentielles extraites de *citrus* application sur la *sardine pilchardus*. Thèse de Magister de l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

HELENCYN.V, RODRIGUES.F.F, GCOLARYASA.V, MENEZES.I.R.A. COUTUHO, H.D.M, BOTELHO.M.A, COSTA J.G.M, (2012). Synergic antibiotic of volatile compounds from the essential oil of *lippia sidoides* and *thymol*. *Fitoterapia*.

- HOLLEY.R.A, PATEL.D, (2005). Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smock antimicrobial. *Food microbiology*.
- ISERIN.P, MASSON.M, RESTLLINI.J.P (1997), Encyclopédie des plantes médicinales des régions tempérée, Ed Maloine1980.
- JOKER.N, (1983).épices et plante aromatiques, guide points vert.
- KABOUCHE A, BOUTAGHANE.N, LAGGOUNE.S, AIT KAKAKI.Z, BENLABED.K, (2005). Comparative antibacterial activity of five lamiaceae essential oils from Algeria. The international of aromatherapy, 15, P 129-133.
- KALEMBA.D, KUNICKA.A, (2003). Antibacterial and antifongical properties of essential oils. *Current medicinal chemistry* 10, P 813-829.
- KHENAKA.K ,(2011). Effets de divers plantes medicinale et de leur huiles essentiellesur la methanogénéséruminale ches les ovin . thèse de de magister en microbiologie appliquée a l'université dede Mentouris constantine Algerie .
- KODO.J.L, (1990). Valorisation des produits de mer. Centre « Amphitryon »ZL. de Montifaut 85 700 Pouzauges. P : 23
- LAURENT.D, (2012). Les huiles essentielles a l'officine. Thèse de Doctorat en pharmacie URF de medcine et de pharmacie de Rouen.
- MEBARKKI.N, (2010). extraction des huile essentielle de *thymus fontanessi* et application a la formation d'une forme medicamenteuse-antimicrobienne. Thsése de de Magister de la faculté des hydrocarbure et de la chimie. Université M'hamedBougouera Boumerdes, Algerie.
- MOHAMMADI.Z, (2006). Etude de pouvoire antimicrobien et antioxydant de quelque plante d'origine de Tlemcen . thèse de Magister faculté des science. Université ABB Tlemcen Algerie.
- MONTES.T, BELMONTE.R , CARVAJAL.M ,(1998). Control of aspergillus flavus in maiz with plant essentialoil and their componentsjournal of food protection 61.P 616-619in : CHAMI F 2005 evaluation in vito de l'action antifongique des huiles essentielle d'organet de clou girolf et leur composé majoritaires in vitro. Thèse de Doctorat de l'etat des sciences université sidi Mohamed Ben abdallah Fés, Maroc.
- NAIT-ACHOUR.K ,(2012). Etude de la composition chimiques des escences de quatre especes d'Eucalyptus poussant dans la region de Tizi-ouzou . thèse de Magistre de l'université de Mouloud Memmeri de tizi- ouzou Algerie.
- NEILSON.P.V, RIOS.R , (2000).Inibition of fungal growthon bread by volatile compnent fromspice and herbs and the possible application in packaging , with special emphasis on mustard essential oil.*Int food microbiol*.60. P 226-229.
- OULHADJ, A. BEDDARK.K, (2011). DJANANE.D, (2011). Chemical composition and antifungal activity of the myrtus communis and pistacia lentiscus essential oils of

Mediterranean regions in laboratory medium and strawberry fruit in: proceeding of the 42th international symposium on essential oils, *journal of essential oil Research*.

OUSSALAH. M, CAILLET.S, SAUCIER.L, LACROIX.M, (2006). Mechanism of action of Spanish oregano.chinese cinnamon and savory essential oils against cell membrane and walls of *E.coli* O157:H7 and *Listeria monosytogenes* *journal of food protection food*.

PADRINI.F, LUCCHRONI.N, (2003). Legrand livre des huiles essentielles, médecine douce, bien être Edition de vecchi S-A PARIS.

PIBIRI. M.C, (2005). Assignement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielle. Thèse de Doctorat école polytechnique fédérale de Lausanne (suisse).

PIOCHON.M, (2008). Etudes des huiles essentielles d'espèce végétales la flore laurentienne : composition chimique, activité pharmacologique et hémi-synthèse, mémoire, université du Québec Chicoutimi, Canada.

RHAYOUR.KH, (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de Doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah.

ROBERT.G, (2000). Les sens du parfum Osman Eroyles Multimedia, paris 224in : PIOCHON.M,(2000), eudes des huiles d'espece végétale la flore Laurentienne composition chimique, activité pharmacologie et hémi-synthèse.

RIOS J. L, RECIO M. C, (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *journal Ethnopharmacol*. 100 P 80-84.

ROUX.D,(2008). Conseil en aromathérapie.2^{eme} édition,*pro-officina*,187 :in HELLALE.Z,(2011),contribution a l'étude des propriété antibacterienne et antioxydantede certaine huiles essentielleextraites de *citrus* aaplication sur sardine (*sardina pilchardus*)

SABRI.A, BARÉ G, JACQUES P, JABRANE A, ONGENA M, VAN HEUGEN J.C, DEVREESE, B. THONART. P.H, (2001). Influence of moderate temperatures on myristoyl-CoA metabolism Andacyl-CoA thioesterase activity in the psychrophilic Antarctic yeast *Rhodotorulaaurantiaca*. *Journal. Biol. Chem.*, 276, P 12691-12696.

SALEHI.P, SONBOLI.A, EFTEKHAR.F, NEJAD-IBRAHIMI.S, YUCEFZADI.M, (2005).Essential on composition, antibacterial and antioxidant activity of oil and various extract of *Ziziphora clinopodioides susp rigida* (boiss) Rech.F from Iran *Biol.Pharm.Bull*.28, P 1982-1896.

STOREY, K.B, AND STOREY, J.M. (1988), Freeze tolerance in animals. *Physio. Revue* .68, P 27-84.

Référence Biobibliographiques

SERI.Y,KOUAMER.O , JEAN BRICE .B , GUESSENND.K.N, KANKO.C,(2008).Etude chimique et activité antidiarrraheitique des huiles essentiellesde deux plantes aromatique de la pharmacopée Ivoirienne. *European journal of scientificResearch* P 94-103.

SILOU.T, LOUBAKI.L, (2004) .Optimisation de l'extraction d'huile essentielle de cymbogon ciratus grâce à un plan factoriel complet. *Journal of Food engineering*, 63, P 219-223.

THOMPSON J.D, CHALCHAT. J.F, MICHET.A, LINHART.Y.B,EHLES.B , (2003).Qualitative and quantitative variation in mono terpene co-occurrence and composition in essential oil of thymus vulgaris chymotypes, *journal chemical of ecology*,29

VALNET.J, (1990). Aromathérapie : traitement du maladiepar les essences des plnate 11^{ème} maloineeedition,Paris .

VIOLLON.C, CHAMAOUTIJ.P,(1994).Antifungal proprties of essential oils and their main components upon *cryptococcus neoframans*.*Mycopathologia*,128,P151,153.

ZHIRI.A,(2006). Les huiles essentielle un pouvoire antimicrobien avéré, *nutra new*.

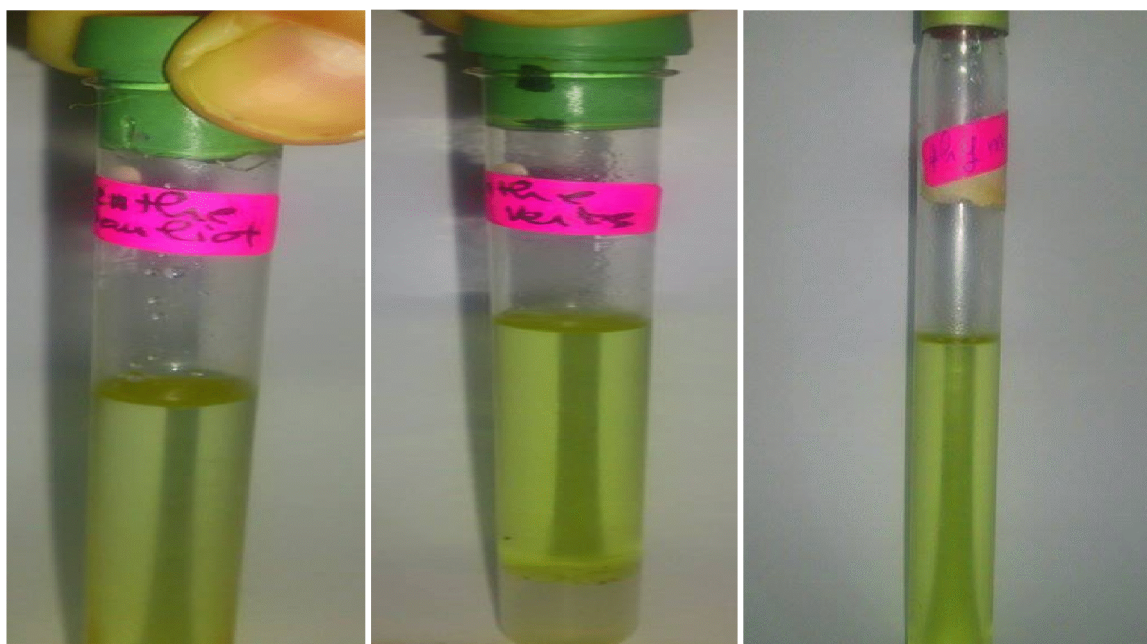
Plante mellifère Abeilles & Fleurs N° 738 - Mai 2012 27

Site internet :

file:///D:/Menthe%20Pouliot%20-Plante%20m%C3%A9dicinale.html.

Annexes

Annexe 1 : l'huile essentielle des trois plantes

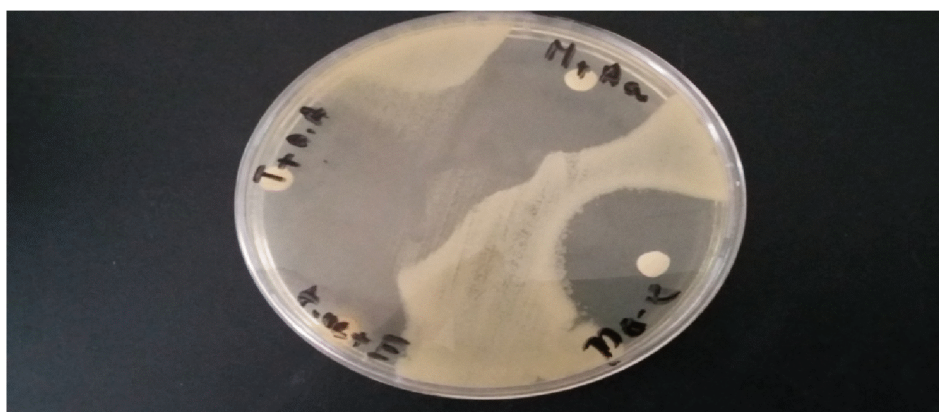


Mentha pulegium

Mentha spicata

thymus fontanesii

Annexe 2 : Résultats du teste de sensibilité des souches a l'acide lactique, l'acide acétique, et la combinaison entre les huiles étudiée et l'acide lactique et acétique.





Annexe 3 : Application H.E de *thymus fontanesii* sur les souches inoculées à la soupe de poisson



Annexe 4 : composition de la soupe de poisson



Soup'Idéale, entreprise familiale, cuisine cette délicieuse Soupe de Poissons en utilisant les richesses de la mer.

Soup'Idéale, s'engage à vous proposer des produits qualitatifs et savoureux, fruits de 50 années de savoir faire.

Soupe de poissons / Vissoep

Ingrédients / Ingredienten

FR Ingrédients : Fumet de poissons reconstitué (eau, poissons 16%, purée de tomates, oignons, huile de colza et huile d'olive vierge extra, sel, ail, extraits naturels d'épices (poivre, thym, laurier, paprika), extrait de crustacés, piment), amidon transformé de maïs, lait écrémé en poudre, exhausteur de goût : glutamate de sodium, arômes, correcteur d'acidité : acide citrique.

Traces possibles de céleri, de gluten, de fruits à coque, de mollusques, de moutarde, d'œufs et de soja.

NL Ingrediënten : Guer van gereconstitueerde vissen (water, vissen 16%, tomatenpuree, uien, raapolie en olijfolie, zout, knoflook, natuurlijke extracten van kruiden (peper, tijm, laurier, paprika), extract van schaaldieren, chili, getransformeerd maïszetmeel, magermelkpoeder, mononatriumglutamaat, aroma, citroenzuur.

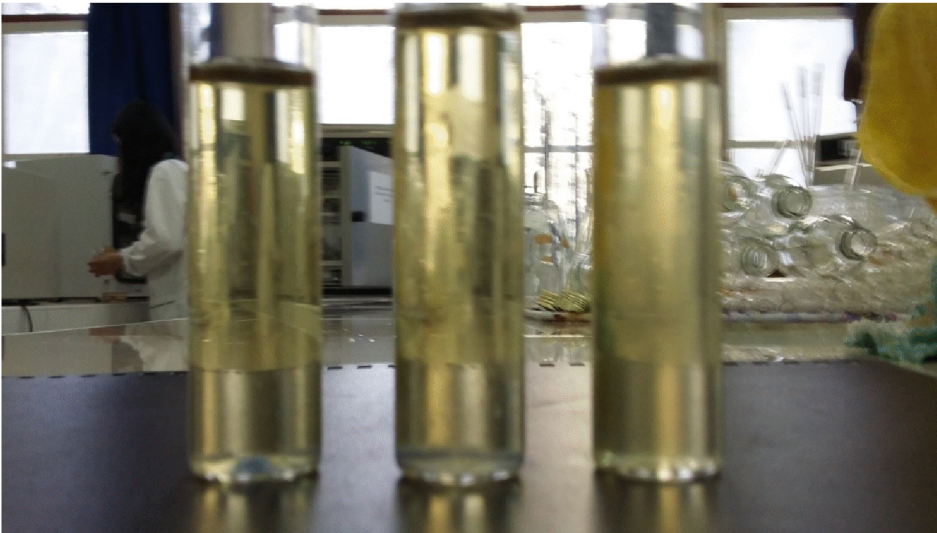
Mogelijk sporen van selder, gluten, schaalvrucht, weekdieren, mosterd, ei, soja.

Valeurs nutritionnelles moyennes / Gemiddelde voedingswaarde :	Pour 100 ml / Per 100 ml	Par portion de 250 ml / Per portie 250 ml	% des RNJ* par portion de 250 ml / %GDA** per portie van 250 ml
Énergie / Energie	154 kJ 36 kcal	384 kJ 91 kcal	5 %
Matières grasses / Vetten dont acides gras saturés / waarvan verzadigde vetzuren	1,0 g 0,1 g	2,5 g 0,3 g	4 % 2 %
Glucides / Koolhydraten dont sucres / waarvan suikers	4,0 g 0,5 g	10,0 g 1,3 g	4 % 1 %
Fibres alimentaires / Voedingsvezels	0,1 g	0,3 g	1 %
Protéines / Eiwitten	2,8 g	7,0 g	14 %
Sel / Zout	0,710 g	1,775 g	30 %

FR * RNJ : Repères Nutritionnels Journaliers pour un adulte avec un apport moyen de 2000 kcal. Les besoins nutritionnels d'un individu peuvent varier selon l'âge, le sexe et l'activité physique. Contient 4 assiettes de 250 ml.

NL **GDA : dagelijkse voedingsrichtlijn op basis van 2000 kcal. De individuele nutritionele behoeften kunnen variëren naargelang geslacht, leeftijd, hoeveelheid fysieke activiteit. Dit product bevat 4 borden van 250 ml.

Annexe 5 : Apparition de la pastille violette dans l'échantillon n°6.



Annexe 6 : Valeur de la série des dilutions utilisé pour déterminé la CMI_s

Tableau 1 : Valeur des dilutions utilisé pour déterminé la CMI

Rapport de dilution d'HEs	1/2	1/4	1/6	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	1/8192
(%)	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.19	0.09	0.04	0.02	0.01	0.006
µl HEs/ml	150	75	37.5	18.75	9.37	4.68	2.34	1.17	0.58	0.29	0.14	0.07	0.03	0.01

Annexe 7 : composition des milieux de culture utilisés Ph : 7

1. Gélose de dénombrement PCA :

- ✓ Tryptane.....5g
- ✓ Extrait de levure.....2.5g
- ✓ Glucose.....1g
- ✓ Agar-agar.....15g

2. Milieu de Chapman : (g/l). Ph : 7.6-7.8.

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

3. Milieu Muller Hinton gélosé

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

4. Bouillon nutritif

- ✓ Macération de viande..... 1 litre
(Ou eau distillé + extrait de viande)
- ✓ Peptone 15 g
- ✓ Na Cl ou KCl..... 5 g

5. solutions utilisées pour l'analyse

• Eau physiologique

On a utilisé l'eau physiologique pour la préparation des dilutions.

✓ Préparation de l'eau physiologique

Chlorure de sodium 9g
Eau distillée 1000ml
Stérilisation 15min à 121°C.

• Bouillon TSE

TSE (Eau physiologique peptoneé) est un diluant pour les produits alimentaires et plus particulièrement pour la recherche des germes pathogènes.

✓ Composition (g/l)

Tryptone 1
Chlorure de sodium 8,5

✓ Préparation

Dissoudre 9,5g dans un litre d'eau distillée ; autoclave 15min à 121°C ; pH=7,2

Annexe 8 : Matériel utilisé pour la présente étude

Une balance analytique, des flacons, un bistouri, ciseaux, une pince, éprouvette graduée (100ml), boîtes de Pétri, pipette graduée (5ml), une pro-pipette, pipettes Pasteur, micropipette, réfrigérateur, étuve, bain-marie, une haute, des tubes à essai, une anse de platine, bec bunsen, autoclave pour la stérilisation et décontamination du matériel.

Annexe 9 : Tableau montre la Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles.

	<i>Thymus fontanesii</i>		<i>Mentha sp</i>		<i>Mentha pulegium</i>	
	Diamètre d'inhibition en (mm) et en moyenne. Et écart type					
<i>Streptococcus</i> <i>Sp</i>	diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité	diamètre	Sensibilité
	58.5±1.5	(+++)	11±1	(+)	12.5±0.5	(+)
<i>Streptococcus</i> <i>pyogène</i>	51.5±0.5	(+++)	14.4±0.6	(+)	21.1±1.3	(+++)

En vue d'évaluer la qualité microbiologique du poisson surgelé importé et l'activité antibactérienne de huiles essentielles de trois plantes : *thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*, une étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté. Des échantillons ont été prélevés et ont fait l'objet d'analyses microbiologiques. Les résultats obtenus ont démontré que les échantillons présentent une contamination à *Pseudomonas*, Flore Psychrophile totale, coliforme totaux, entérobactéries. Les staphylococcus aureus, les streptocoques fécaux et les bactéries lactiques sont présents uniquement L'effet antibactérien des huiles essentielles de *thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium* a été testé sur *streptocoque fécaux streptocoque pyogène*.

L'application de l'huile de thym sur la soupe de poisson conservée pendant 5 jours à +4C° ralentit légèrement la croissance des deux souches. Souches *streptocoque sp* isolé partir de l'espadon congelé et *streptococcus pyogène*.

Mots clés : produit de la pêche, *Thymus fontanesii*, *Mentha spicata* et *Mentha pulegium*, activité antibactérienne,