

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida

Faculté des Sciences et de la Nature de la Vie

Département Agro-alimentaire



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en science alimentaire

Spécialité : Nutrition et Diététique Humaine

Thème

**Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur
les bactéries pathogènes d'origine alimentaire.**

Présenté par :

Kouaci Asmaa

Boukenoui Lamia

Devant le jury :

M^{me} BOULKOUR S.	MCB	USDB 1	Présidente
M^{me} KADRI F.	MCB	USDB 1	Examinatrice
M^{me} BOUDJEMA N.	MCA	USDB 1	Promotrice

Année Universitaire 2019-2020

Dédicaces

Je dédie ce travail

A MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et pour mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A MON TRES CHER PETIT POUSSIN SOUHEIB

C'est à toi mon adorable ange, ma joie, mon petit trésor que maman dédie ce travail pour te dire que tu resteras pour toujours le rayon du soleil qui égaye ma vie.

Je t'aime mon bébé et je te souhaite tous le bonheur du monde.

A mon mari Amine

Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour.

Cher mari j'aimerais bien que tu trouve dans ce travail l'expression de mes sentiments de reconnaissance les plus sincère grâce à ton aide et à ta patience avec moi que ce travail a pu voir jour...

Que Dieu le tout puissant nous accorde un avenir meilleur.

A MES FRERES

Mostafa : cher frère tu été a ma compagnie depuis mes études les plus premières, tu m'a toujours aidé par tes encouragement .

J'avoue vraiment que si je suis arrivé a être là c'est grâce à toi à ton aide et à ton amour.

Ishak : mon amour le généreux.

Yakoub : mon petit frère que j'adore.

A MA GRAND MERE CHERIE

A MA BELLE FAMILLE

Je vous remercie tout particulièrement pour votre soutien.

A MES ONCLES ET MES TANTES

A MES AMIS

A ma chère sœur Sarah, je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur, et je te souhaite tout le bonheur du monde.

A mon binôme Lamia d'avoir eu le courage d'achever ce travail malgré ce qu'elle a vécu, je t'aime fort ma belle.

ASMAA

Dédicace

Je Dédie ce travail.

*A mes cher parents ; Symboles de sacrifice,
de tendresse d'amour. Je vous remercie pour tout
le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon
enfance et j'espère que votre bénédiction
m'accompagne toujours.*

A mon mari

*qui ma encourager, qui a été toujours à mes cotés
A mes chers sœurs ; Hakima qui était toujours présente à mes cotés dans
chaque parcours et ma chouchou assia
A tous ma belles famille*

A tous ce qui me sont chers.

A la personne la plus proche à mon cœur mon binôme assma

Boukenoui Lamia

Liste des figures

Figure 1. Clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>)	10
Figure 2. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales	17
Figure 3. Colonie d' <i>Escherichia coli</i> sur le milieu VRBL après incubation de 44°C	24
Figure 4. Apparition d'un anneau rouge sur le milieu urée indole.....	25
Figure 5. Zone d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> (a) et <i>Escherichia coli</i> (b) par aromato-gramme.....	25

Liste des tableaux

Tableau I : Principales bactéries pathogènes responsables d'infections ou d'intoxinations alimentaires	4
Tableau II : Classement des bactéries selon leurs DZI	21
Tableau III : Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle des clous de girofle à côté des normes AFNOR (1992).....	22
Tableau IV : Résultats de l'analyse bactériologique des produits alimentaires étudiés ..	23
Tableau V : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de <i>syzygium aromaticum</i> vis-à-vis les souches bactériennes testées	26

Liste d'abréviation

AFNOR : Association française de normalisation.

ANSES : Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

DZI : Diamètre de zone d'inhibition

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments.

HE : Huile essentielle

ISO : Organisation internationale de normalisation.

MH : Muller Hinton

OMS : Organisation mondiale de la santé..

TIAC : Toxi-infection alimentaire collectives

°C : Celsius.

Liste des figures dans l'Annexe 1

Figure1.Poudre des clous de girofle

Figure2.hydrodistillateur

Figure3.L'huile essentielle de clou de girofle

Figure4.Observation macroscopique de *E.coli* et *Staphylococcus aureus*

Figure5.Apparition d'anneau rouge indique la présence de *E.coli*.

Figure6.Mllieu d'enrichissement pour *Staphylococcus aureus*

Figure 7.Test de catalase chez *Staphylococcus aureus*

Résumé

Introduction	1
---------------------------	----------

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Généralités	3
1.1. Altération des denrées alimentaires	3
1.1.1. Différent types d'altération	3
1.2. Maladies d'origine alimentaire	3
1.2.1. Toxi-infection alimentaire	3
1.2.2. Toxi-infection alimentaire collectives(TIAC)	4
1.3. Bactéries responsables des intoxications alimentaires	4
1.4. Bactéries responsables des altérations alimentaires	4
1.4.1. <i>Salmonella</i>	4
1.4.2. <i>Escherichia coli</i>	5
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.5. Conservation des denrées alimentaires	7
1.5.1. Différentes technique de conservation	7
1.5.1.1. Conservation par le froid	7
1.5.1.2. Conservation par la chaleur	8
1.5.1.3. Conservation chimique	8
1.6. Conservation par les plantes médicinales et aromatiques	9
2. Généralité sur le giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i>)	9
2.1. Description de giroflier	9
2.2. Classification	10
2.3. Huile essentielle de giroflier	10
2.3.1. Définition des huiles essentielles	10
2.3.2. Localisation des huiles essentielles	11

Sommaire

2.3.3. Fonction des huiles essentielles dans les plantes	11
2.3.4. Composition de l'huile essentielle de giroflier	11
2.3.5. Domaine d'utilisation des huiles essentielles du clou de giroflier	12
2.3.5.1. En pharmacie.....	12
a)Activité antibactérienne.....	12
b) Activité antifongique.....	12
c) Activité antivirale	12
d) Activité anti inflammatoire	13
e) Soins buccaux	13
2.3.5.2. En cosmétologie	13
2.3.5.3. En industrie agro-alimentaire	13

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Objectifs de l'étude	15
2. Matériel	15
2.1. Matériel biologique	15
2.2. Matériel non biologique	15
3. Méthodes	15
3.1. Préparation d'extraction de l'huile essentielle	15
3.2. Analyse bactériologique des échantillons	16
3.2.1. Préparation de la solution mère (inoculum)	16
3.2.2. Préparation des dilutions décimales	17
3.2.3. <i>Escherichia coli</i>	17
3.2.4. <i>Salmonella</i>	18
3.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.3. Identification biochimique	19
3.3.1. Test de catalase.....	19
3.3.2. Urée-indole.....	19

Sommaire

3.4. Etude de l'aromatogramme	20
-------------------------------------	----

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Description de l'huile essentielle obtenue.....	22
1.1. Caractéristiques organoleptiques.....	22
2. Analyses de l'huile essentielle (HE)	22
2.1. Rendement	22
3. Analyse bactériologique des échantillons alimentaires	23
3.1. Chawarma et saucisses cru	23
4. Actévitité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	25
Conclusion	27

Références bibliographiques

Annexes

La présente étude consiste à évaluer, *in vitro*, par aromatogramme, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, connue sous le nom de giroflier, sur des bactéries pathogènes responsables d'altération de deux produits : chawarma cru et saucisses crues.

L'extraction de l'huile essentielle des boutons floraux de *Syzygium aromaticum* est réalisée par la méthode d'hydro distillation, le rendement obtenu est de 8% ce résultat reste important.

L'analyse bactériologique des échantillons testés : chawarma cru et saucisses crues, nous a amené à isoler et identifier des bactéries pathogènes les plus incriminées dans les altérations alimentaires : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et absence totale des *Salmonella*.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur deux souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats de l'aromatogramme ont montré que l'huile essentielle des clous de girofle possède une forte activité antibactérienne avec un diamètre de zone d'inhibition (DZI) de 21mm pour *Staphylococcus aureus* et de 45mm vis à vis *Escherichia coli*.

Mots clés : *Syzygium aromaticum*, huile essentielle, effet antibactérienne, bactéries pathogènes, produits altérés.

The present study consists in evaluating, in vitro, by aromatogram, the antibacterial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*, known as clove, on pathogenic bacteria responsible for alteration of two products: raw chawarma and raw sausages.

The extraction of essential oil from the flower buds of *Syzygium aromaticum* is carried out by the hydro-distillation method, the yield obtained is 8%, this result remains important.

The bacteriological analysis of samples of raw chawarma and raw sausages, led us to isolate and identify the pathogenic bacteria most implicated in food poisoning: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and total absence of *Salmonella*.

Antibacterial activity was determined on two bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* according to the method of diffusion in agar medium. The results of the aromatogram showed that the essential oil of cloves has a strong antibacterial activity represented with inhibition zone diameters (DZI) varies between 21mm for *Staphylococcus aureus* and 45mm for *Escherichia coli*.

Key words: *Syzygium aromaticum*, essential oil, antibacterial effect, pathogenic bacteria, altered products.

ملخص

تتكون الدراسة الحالية من تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية من سيزيجيوم أروماتيكوم ، المعروف باسم القرنفل ، في المختبر ، عن طريق الأروماتوجرام ، على البكتيريا المسببة للأمراض المسؤولة عن تغيير منتجين: الشاورما الخام والنقانق الخام .

يتم استخراج الزيت العطري من براعم الزهور من *Syzygium aromaticum* بطريقة التقطير المائي ، العائد الذي تم الحصول عليه هو 8 ٪ ، وهذه النتيجة لا تزال مهمة.

قادنا التحليل البكتريولوجي للعينات التي تم اختبارها: الشاورما الخام والنقانق الخام ، إلى عزل وتحديد البكتيريا المسببة للأمراض الأكثر تورطاً في التعديلات الغذائية: المكورات العنقودية الذهبية و *Escherichia coli* والغياب التام للسالمونيلا.

تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا على سلالتين بكتيريتين: المكورات العنقودية الذهبية ، الإشريكية القولونية بطريقة الانتشار في وسط الأجار. أظهرت نتائج التحليل العطري أن الزيت العطري للقرنفل له نشاط قوي مضاد للبكتيريا بقطر منطقة تثبيط (DZI) يبلغ 21 ملم للمكورات العنقودية الذهبية و 45 ملم للإشريكية القولونية.

الكلمات المفتاحية: *Syzygium aromaticum* ، زيت عطري ، تأثير مضاد للجراثيم ، بكتيريا مسببة للأمراض ، منتجات متغيرة.

Nos aliments sont rarement stériles, ils contiennent habituellement des micro-organismes qui pour la plupart sont inoffensifs, certains d'entre eux sont même essentiels au développement de la saveur, c'est le cas pour de nombreux produits de charcuterie /salaison (saucisson, saucisses, etc.), laitiers (fromages, yaourt) ou végétaux (pain, choucroute, vins) pour lesquels la flore microbienne est dite positive (**Véronique et Pascal, 2014**).

En revanche, d'autres micro-organismes peuvent avoir un effet négatif sur un aliment. On distingue les micro-organismes d'altération qui peuvent être à l'origine de la dégradation organoleptique ou nutritionnelle (fermentation ou développement d'arômes indésirables). Ces germes entraînent une diminution de la durée de vie des aliments, prolifèrent ou libèrent des toxines en causant ainsi des infections ou des intoxications après ingestion par le consommateur (**Véronique et Pascal, 2014**). En 2001, 6800 cas de toxi-infections alimentaires collectives ont été dénombrés en France (**Haeghebaert et al., 2002**).

En Algérie, la toxi-infection alimentaire est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (DO), selon l'Arrêt ministériel du 17 Novembre (1990), et fait l'objet de disposer de données sur cette maladie afin de mieux suivre son incidence et de minimiser ses dégâts (**Ziane, 2015**). Ce véritable problème de santé publique, ces infections sont également responsables de lourdes pertes économiques.

Dans l'objectif de tenter de trouver de nouveaux remèdes aux fléaux actuels, la communauté scientifique s'est récemment tournée vers les constituants des huiles essentielles. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques, le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (**Pauli, 2001**),

Parmi toutes les plantes médicinales, le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) est le plus utilisé à travers le monde, est largement utilisé, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux. Le girofle est composé de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antifongique et antiseptique (**Rakotoatimanana et al., 1999**).

Les études réalisées par **Singh et al. (2009)**, ont démontré l'effet d'eugénol sur la croissance des bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* ; *Staphylococcus aureus*) et à Gram

négatif (*Escherichia coli* ; *Salmonella typhi*), l'eugénol inhibe la croissance de toutes ces bactéries.

Dans ce contexte, nous avons orienté notre travail dans le but de démontrer l'effet bactéricide des clous de girofle sur les bactéries responsables d'altération alimentaire. Cette présente étude consiste dans le premier temps à extraire l'huile essentielle des clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) puis valoriser l'usage de l'extrait de la plante aromatique comme agent antibactérien et un conservateur naturelle dans le produit alimentaire.

Dans le cadre de cette étude, nous avons structuré notre travail comme suit :

- Elaboration d'une extraction de *Syzygium aromaticum*.
- Isolement et identification des bactéries pathogènes isolées à partir de Chawarma et saucisse cru.
- Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur les principales bactéries pathogènes.

I. Généralités

1.1. Altération des denrées alimentaires

La contamination des denrées alimentaires peut être à l'origine d'une altération du produit, traduit par une modification de ses caractéristiques organoleptiques et de sa qualité sanitaire (Cuq, 2007).

1.1.1. Différents types d'altérations

Il existe en effet différents types d'altération responsable dans la modification des caractéristiques initiales du produit (Joffin et al., 2003) :

- **les facteurs responsables des modifications physiques tels que** : chocs, blessures, changement d'état, variation de la teneur en eau, changement de couleur.
- **Altération chimique et biochimique**: en générale sont manifestées par une oxydation (rancissement) via les enzymes (brunissement enzymatiques, lyses, destruction des vitamines et de certains nutriments).
- **Altération microbienne** : est sans doute la forme la plus connue et la plus risquée, cas de la fermentation. En présence des bactéries ou des champignons responsables dans la modification des caractéristiques organoleptiques et sanitaires du produit.

1.2. Maladies d'origine alimentaire

Les maladies d'origine alimentaire sont des affections, en général de nature infectieuse ou toxique, provoquées par des agents qui pénètrent dans l'organisme par le biais des aliments ingérés (Cappelier, 2009).

1.2.1. Toxi-infection alimentaire

Selon plusieurs travaux cités par Fabiani (1987), Khiati (1998) et Dervin (2013), la toxi-infection alimentaire ou maladie infectieuse d'origine alimentaire, est une contamination par voie digestive qui survient à la suite de l'absorption d'une denrée alimentaire souillée par des germes transmis par l'eau et l'aliment.

Une toxi-infection alimentaire est une maladie, souvent infectieuse et accidentelle, contractée à la suite de l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminées par des agents

pathogènes qu'il s'agisse de bactéries, virus, parasites ou de prions. Une telle contamination résulte habituellement de méthodes inadéquates de manipulation, préparation, stockage ou conservation ou cuisson des aliments (ANSES, 2010).

1.2.2. Toxi-infection alimentaire collectives (TIAC)

Pour la direction générale de la santé, un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas groupés d'une symptomatologie similaire, en générale digestive, dont on peut rapporter la cause à un même origine alimentaire (Haeghebaert et al., 2001).

1.3. Bactéries responsables des intoxications alimentaires

Parmi les bactéries pathogènes, on distingue celles responsables de la majeure partie des infections alimentaires de celles responsables de cas sporadiques (OMS, 1997) (Tableau I).

Tableau I. Principales bactéries pathogènes responsables d'infections ou d'intoxinations alimentaires (Bourgeois et al., 1996 ; Larpent, 2000; Haeghebaert et al., 2002).

Bactéries impliquées majoritairement dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires	
<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Bactéries responsables de cas sporadiques dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires	
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Shigella</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

1.4. Bactéries responsables des altérations alimentaires

1.4.1. *Salmonella*

Le genre *Salmonella*, qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, ce genre est caractérisé par des bacilles à coloration Gram-négative, non sporulant, la plupart du temps doué d'une mobilité propre grâce à des flagelles péritriches (à l'exception de *Salmonella gallinarum*). La taille des bâtonnets varie entre 2 et 5 µm de longueur sur 0,7 à 1,5 µm de largeur. Ils sont aéro-anaérobies, réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source

de carbone. *Salmonella* est une bactérie mésophile son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C) (Korsak et al., 2004).

- **Pathologie**

La salmonellose (gastroentérite à *Salmonella*) est causée par plus de 2000 sérovars de *Salmonella*, provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales, diarrhées, qui dure de quelques jours à quelques semaines. La salmonellose la plus fréquente est due à *Salmonella typhimurium* (Prescott et al., 2003). Elle est rencontrée dans tous les pays elle est isolée chez l'homme, les animaux et dans l'environnement, elle occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (Avril et al., 1992).

- **Mode de transmission**

La contamination de l'homme se fait principalement par voie orale suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Si dans les pays en voie de développement l'eau est une source majeure de contamination en raison des mesures d'hygiène très insuffisantes, les aliments consommés crus ou peu cuits sont la source majeure de contamination dans les pays industrialisés (Virlogeux-Payant et al., 2012).

1.4.2. *Escherichia coli*

L'espèce *Escherichia coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit de courts bâtonnets mobiles au moyen de flagelles péritriches, Gram négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulés. Ils sont capables de fermenter plusieurs sucres, mais leur fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique. La multiplication à 44°C, la production d'indole et la présence d'une activité β -glucuronidase sont également caractéristiques (Ghafir et Daube, 2007).

- **Pathologie**

Escherichia coli est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires, elle peut provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers ainsi que divers infections communautaires ou nosocomiales, initialement sensible à beaucoup d'antibiotiques. Elle a acquis une résistance fréquente, surtout en milieu hospitalier (Nauciel et Vildé, 2005).

Les facteurs de virulence sont des flagelles et des pilis qui permettent l'adhésion à la muqueuse intestinale ainsi qu'une capsule qui prévient la phagocytose et les entérotoxines (Goubau et Pellegrims, 2000)

- **Mode de transmission**

La majorité des infections est le résultat d'une transmission alimentaire. En effet, un grand nombre des infections à *E. coli* O157:H7 a été relié épidémiologiquement à la consommation de denrées animales (**Vernozy-Rozand et Montet, 2001**).

La consommation d'eau de puits, d'eau de source privée et d'eau de distribution non traitées a été à l'origine de cas isolés d'infection (**Jackson et al., 1998**) et d'épidémies à *E. coli* O157 (**Holme, 2003; Mannix et al., 2005**).

Le portage sain humain de *E. coli* existe mais semble rare et transitoire (**Griffin, 1995; Stephan et Untermann, 1999**).

1.4.3. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des coques Gram+, catalase +, aéro-anaérobies, métabolisant le glucose par la voie fermentative. Les staphylocoques comprennent une vingtaine d'espèces. *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus fréquemment impliquée dans des infections d'origine alimentaire (**Bonnefoy et al., 2002**).

- **Pathologie**

Bien qu'étant commensal, *S. aureus* est également responsable d'un grand nombre d'infections chez l'homme, notamment des infections cutanées (impétigos, folliculites, furoncles, panaris) et des infections des muqueuses (conjonctivites, otites, salpingites, endométrites, pneumonies) (**Lowy et Engl, 1998**).

Ces infections peuvent mener à des bactériémies et faire l'objet de métastases septiques à l'origine de foyers infectieux profonds. Dans 10% des bactériémies, une endocardite survient comme complication (**Pilly, 2008**).

- **Mode de transmission**

Bien que *S. aureus* soit capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement en état de dormance (**Pascoe et al., 2014, Mulyukin et al., 2014**), la contamination par une source environnementale reste relativement rare, sauf en milieu hospitalier où elle est prévalence (**Kampf et al., 2003**). Une autre voie de contamination est l'ingestion d'aliments colonisés par des souches de *S. aureus* libérant des entéro-toxines, responsables d'intoxications alimentaires (**Soares et al., 1997**).

1.5. Conservation des denrées alimentaires

De tous temps, l'homme a recherché des méthodes pour conserver sa nourriture, entre le moment où les denrées sont capturées, cueillies ou récoltées et celui de la consommation (**Jean-Pierre, 2000**).

Sécher, saler, acidifier, confire dans la graisse ou le sucre ont été longtemps les seuls moyens connus et pratiqués pour conserver les aliments avant la découverte de la stérilisation par la chaleur.

Après la découverte de l'intérêt des traitements par la chaleur, une nouvelle étape a été franchie avec la conservation par le froid. D'autres procédés ont été depuis utilisés avec succès: déshydratation, lyophilisation, action des rayonnements ionisants, utilisation d'additifs aux propriétés antimicrobiennes (les conservateurs). Quelque soit le principe ou le protocole, un procédé de conservation a pour but soit de bloquer ou de ralentir l'évolution des flores microbiennes de l'aliment, soit de les détruire (**Guy et al., 2007**).

1.5.1. Différentes techniques de conservation

Les méthodes courantes de conservation de la nourriture reposent principalement sur un transfert d'énergie ou de masse qui ont pour objet d'allonger la durée de vie des produits alimentaires (pasteurisation et stérilisation, séchage, réfrigération, congélation et autres) (**Alexandera, 2001**). Ou bien de les transformer par le jeu de réactions biochimiques ou de changement d'état (cuisson, fermentation obtention d'état cristallisé ou vitreux et autres) (**Darinmou, 2000**).

1.5.1.1. Conservation par le froid

Le froid est une technique de conservation des aliments qui arrête ou ralentit l'activité cellulaire, les réactions enzymatiques et le développement des micro-organismes tels que la réfrigération et la congélation (**Darinmou, 2000**).

- **Réfrigération** : Généralement, la température de réfrigération se situe dans les alentours de 0°C à 4°C (**Emilie, 2009**).
- **Congélation** : La congélation maintient la température au cœur de la denrée jusqu'à -18°C (**Boumendjel, 2005**).

1.5.1.2. Conservation par la chaleur

Ce type de conservation par la chaleur qui fait uniquement appel à un procédé physique de nature thermique (pasteurisation, la stérilisation), a pour but de dénaturer les enzymes susceptibles d'altération et détruire les micro-organismes présents dans les aliments. (**Murielle, 2009**).

- **Pasteurisation** : les températures de pasteurisation sont inférieures à 100°C puisqu'elles varient de 70°C à 85°C (**Emilie, 2009**).
- **Stérilisation** : la température appliquée est entre 110 à 115C° (**Murielle, 2009**).

1.5.1.3. Conservation chimique

a) Additif alimentaire

On entend par additif alimentaire toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristiques dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive. Et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires (**Dupain et al., 1992**).

b) Dangers des additifs alimentaires

En générale, les évaluations en matière de sécurité de la JECFA (Comité Mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaire) et EFSA (2011) sur les additifs alimentaires sont fondées sur des données toxicologiques issues d'études chez l'animal et dans la mesure de leurs disponibilités, sur des données produites lors d'études cliniques chez l'homme (**Hayder et al., 2011 ; Gallen et al., 2013**).

La majorité des additifs alimentaires utilisés dans l'industrie agro-alimentaire ont été classés sans innocuité pour la santé d'autres sont plutôt suspects, voire même toxiques selon les dernières études qui les concernes (**André, 2013**).

Ajouter aux aliments certaines substances chimiques n'est pas sans effets néfastes pour la santé. Cependant, les intoxications alimentaires consécutives à des additifs présents en trop grande quantité sont rares. Il faut plutôt redouter des intoxications à caractère chronique particulièrement pour ce qui concerne des substances présentant une tendance cumulative.

Cette toxicité à moyen ou long terme se caractérise par différents effets (**Derache, 1975**) à savoir :

- Effet cancérogène par action au niveau des acides nucléiques présents dans les gènes.
- Effet mutagène et notamment des mutations transmissibles héréditairement.
- Effet néfaste sur les fonctions de reproduction: pour les adultes, cela concerne l'aptitude à la reproduction, pour le fœtus, il peut apparaître des risques tératogènes avec malformations et effets neurotoxiques retardés, mais aussi des effets cancérogènes se révélant à l'âge adulte.
- Effet sur les défenses immunitaires avec des toxicités concernant organes (rate ou thymus) et tissu (lymphocytes).

1.6. Conservation par les plantes médicinales et aromatiques

Différentes espèces médicinales sont utilisées comme épices pour aromatiser et augmenter la durée de vie des aliments. En effet, ces espèces contiennent des huiles essentielles dotées d'activités antimicrobiennes intéressantes et peuvent servir d'agents de conservation alimentaires (**Mohammadi, 2006**).

2. Généralités sur le Giroflier (*Syzygium aromaticum*)

Le Giroflier est un arbre tropical appartenant à la grande famille des Myrtacées, originaire d'Indonésie, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du sud, principalement dans des pays tropicaux (**Eric et al., 2014**)

2.1. Description de Giroflier

C'est un grand arbre, élance, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, qui peut atteindre jusqu'à 20 mètres de haut, à port pyramidal et au tronc gris clair ride (**Wagner, Sprinkmeyer, 1973**),

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante.

Les clous de girofle (figure 1) sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau (**Richard et Loo, 1992**).

2.2. Classification (Sophie, 2015)

Règne :	Plantae
Classe :	Angiosperme
Sous-classe :	Tiporées
Ordre :	Myrtales
Famille :	Myrtaceae
Genre :	<i>Syzygium</i>
Espèce :	<i>Syzygium aromaticum</i>



Figure 1 : Clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)

2.3. Huiles essentielles de giroflier

2.3.1. Définition des huiles essentielle

Les huiles essentielles (HE), appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal ; elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'aire (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

2.3.2. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : des fleurs (bergamotier, tubéreuse), mais aussi dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus, etc.) et bien que

cela soit moins habituel, dans les écorces (cannelier), des bois (bois de rose), des racines (vétiver), des rhizomes (gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (clou de girofle) (**Bruneton, 1999**).

2.3.3. Fonction des huiles essentielles dans les plantes

Le rôle des HE n'a pas pu être clairement démontré. En fait, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Tout fois, certains auteurs pensent que la plante utilise son l'huile essentiel pour repousser les insectes, au contraire pour les attirer et favoriser la pollinisation (**Belaiche, 1979**).

D'autres la considéré comme une ressources énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autres parts, elles conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (**Belaiche, 1979**).

2.3.4. Composition de l'huile essentielle de giroflier

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction (**Guignard, 2000**).

- **Terpènes** : les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques .Ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute $(C_5H_8)_n$. Les huiles essentielles contiennent particulièrement des mono-terpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes (**Finar, 1994**).
- **Composés aromatiques dérivés du phénylpropane** : En plus des terpènes, les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Paris et al., 1981 ; Bruneton, 1999**). Considéré que ces composés sont très souvent des allyle- et propenyl phénols parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, fenouil : anéthol, anis aldéhyde, méthyl-chavicol=estragole. Persil :apiole). Mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), du Basilic (eugénol), ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol).

On peut également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C6-C1 comme la vanilline (assez fréquente) ou l'antranilate de méthyle.

2.3.5. Domaines d'utilisation des huiles essentielles de clou de giroflier

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs :

2.3.5.1. En pharmacie

L'importance des plantes aromatiques est indiscutable. Leur contenu en essence et la nature chimique des constituants de celle-ci leur confèrent de grandes perspectives d'application. Ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique (**valnet, 1984**). Les propriétés de l'huile essentielle de giroflier ont été démontrées dans plusieurs activités à savoir :

a) Activité antibactérienne

Le girofle est composé de plus de 15% d'huile essentielle et de 70 à 90% d'eugénol, composé antibactérien, antiseptique et antifongique. Il y a, également, entre 9 et 15% d'acétate d'eugénol, qui possède également des propriétés antibactériennes (**Rakotoatimanana et al., 1999**).

b) Activité antifongique

L'huile essentielle de clou de girofle possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme le *Candida albicans*, le *Cryptococcus* néoformés ou l'*Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal (**Goetz et al., 2012**).

c) Activité antivirale

L'huile essentielle de *S. aromaticum* a un effet inhibiteur sur : herpès simplex virus, elle exerce aussi des effets sur les virus plusieurs niveaux : sur la fusion des cellules virales, anti-HCV protéase dans le traitement de l'hépatite virale, inhibition de la synthèse de l'ADN viral (**Goetz et al., 2012**)

d) Activité anti inflammatoire

Cette l'huile provoque une réduction de l'inflammation (induite par injection de carragénine au niveau de la patte du rat), inhibition des prostaglandines, leucotriène, du chimiotactisme des leucocytes ainsi une inhibition de la synthèse des radicaux libres par les leucocytes. (Goetz et al., 2012)

e) Soin buccale

L'huile essentielle de *S. aromaticum* élimine les sarcomes épidermoïdes des gingivales maxillaires, les métastases intra maxillaires, les sarcomes, les tumeurs bénignes et les ostéites des maxillaires (Morin et al., 1983). Depuis des décennies, le clou de girofle est utilisé pour ses vertus culinaires et médicinales, il est beaucoup utilisé en médecine dentaire pour sa propriété d'anesthésique locale (Kozam, 1977; Ohkubo et Shibata, 1997).

Autrefois on soignait les maux de dents en mâchant un ou deux clous de girofle. Aujourd'hui les techniques se sont améliorées: par le mélange d'oxyde de Zinc et d'eugénol on obtient un ciment utilisé en tant que matériau de restauration temporaire permettant à la fois un excellent scellement et une anesthésie de la pulpe dentaire. Qui plus est, ce ciment est en générale très bien toléré par les patients. L'eugénol est aussi utilisé pour soulager la douleur associée à la pose de prothèses dentaires (Garibaldi et al., 1995).

2.3.5.2. En cosmétologie

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques (Bruneton, 1999).

2.3.5.3. En industries agro-alimentaires

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps. C'est pour cela, que l'on pense de plus en plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires. C'est ainsi que l'on trouve le laurier dans certaines conserves et dans le miso qui est un met japonais traditionnel (kurita et koike, 1982).

D'après **Busta et Foegedine (1983)**, ont eux aussi étudié la conservation alimentaire par les épices, les aromates et les huiles essentielles qui sont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût et qui ont aussi un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer.

1. Objectifs de l'étude

Notre travail est basé sur l'étude de la qualité bactériologique de deux échantillons alimentaires : le chawarma cru et les saucisses crues. Dans le but d'isoler et identifier les bactéries largement incriminées dans les altérations d'origine alimentaire, et d'évaluer l'efficacité de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) sur les principales bactéries isolées.

Notre travail expérimental a été effectué au niveau du laboratoire d'Hygiène de l'Etablissement Public de la Santé de Blida durant une période de stage du mois de février au mois de mars 2020.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est comme suit:

- Les échantillons alimentaires à analyser : chawarma cru et saucisses crues.
- La plante étudiée est *Syzygium aromaticum* : clou de girofle. A partir des boutons floraux de cette dernière, l'huile essentielle est extraite par la technique d'hydro-distillation au sein du laboratoire d'agro-alimentaire de l'université de Blida1.

2.2. Matériel non biologique

Les milieux de culture, la verrerie et les réactifs utilisés dans cette étude sont présentés dans l'annexe 2.

3. Méthodes

3.1. Préparation d'extraction de l'huile essentielle

L'hydro-distillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante.

Le clou de girofle a été acheté chez un herboriste de marché du Blida puis pesé, séché et broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (Annexe 1). Par la suite la préparation est effectuée par macération dans l'eau distillée.

- **Protocole expérimentale (AFNOR, 1986)**

- 75g de poudre de clou de girofle sont ajoutée dans un ballon contenant 1,5l d'eau distillée, sans pour remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition, installer le montage d'hydro-distillation, l'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.
- En récupère l'hydrolat et laisser dans le réfrigérateur à l'obscurité pendant 24h pour la séparation du l'huile essentielle de distillat.
- Le mélange précédent ce sépare en deux phase non miscible, l'eugénol qui situe en dessus de flacon est récupérée avec une pipette, puis conservée dans une température base à l'abri de la lumière.

Nous avons calculé le rendement selon l'équation suivante (AFNOR, 1986) :

$$\text{REA}\% = \frac{M'}{M} \times 100$$

Avec

REA: rendement de l'extrait aqueux(%);

M' :masse d'extrait aqueux en gramme(g) ;

M :masse de la poudre utilisée en gramme(g) ;

3.2. Analyses bactériologique des échantillons

Le contrôle bactériologique a été effectué sur deux échantillons : Chawarma cru (3 échantillons) et saucisse crus (Merguez 1 seul échantillon) ; achetés du marché local de Blida suspectés d'être contaminés. Les échantillons sont effectués dans des conditions aseptiques et transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C.

Nous avons fait la recherche des bactéries pathogènes à savoir : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*, sur la base des exigences recommandées par le Journal Officiel de la République Algérienne (JORA, 2017), il détermine les bactéries pathogènes qu'on doit rechercher dans le cas d'un contrôle ou d'une inspection.

3.2.1. Préparation de la solution mère (inoculum) (ISO 6888, 2004)

Une solution mère (inoculum) a été préparée comme suit :

- Peser 25g de l'aliment (chawarma cru, saucisse cru) et versé dans 225ml de bouillon Trypton-sel (TSE), Incuber le mélange pendant 15min à 37°C dans l'étuve.

3.2.2. Préparation des dilutions décimales (ISO 6887-6, 2013)

Les dilutions décimales sont préparées successives du 1/10^{ème} de la solution mère jusqu'à dilution 10⁻⁴ selon la figure 3. Les tubes fournis pour ces dilutions contiennent 9ml de TSE.

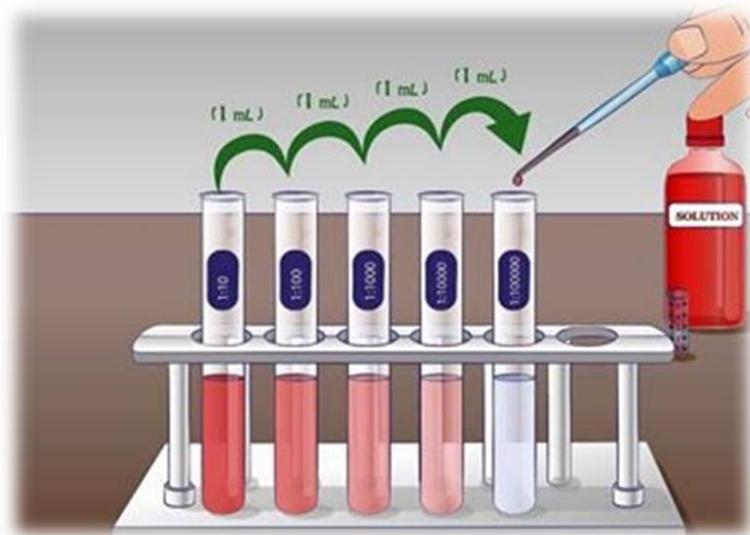


Figure 2: Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.

3.2.3. *Escherichia coli*

- **Technique (ISO4832/NF V08-060, 2009)**

Un volume de 1ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) est prélevé puis introduit dans des boites de pétrie stériles à l'aide de pipettes stériles, puis 15ml de milieu VRBL est versé et refroidi à 45°C.

L'inoculum est soigneusement mélangé au milieu de culture par des mouvements circulaires et en formes de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification les boites de pétries ainsi préparées sont incubées dans une étuve réglé à 44°C pendant 24h.

- **Lecture :** Apparition des colonies rouge.

3.2.4. *Salmonella*

L'isolement de *Salmonella* est effectué selon les étapes suivantes :

- **Technique (ISO 6579, 2002)**

- **Pré-enrichissement**

Nous avons pesé 25g de l'aliment puis broyer dans un sachet stérile pendant 2 à 5 minutes et le verser dans 225ml de bouillon Trypton-sel (TSE), l'ensemble est incubé pendant 24h à 37°C.

- **Enrichissement**

A l'aide d'une pipette stérile, nous avons rajouté 1ml de solution mère à 5ml de bouillon Sélénite-Cystine (SFB) plus deux gouttes d'additif Sulfite de Sodium, pour l'enrichissement, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24h.

- **Isolement**

Une (1) goutte de ce tube est prélevée à l'aide d'une anse de platine, et puis étalée sur le milieu hektoene. La boîte de pétrie est devisée sur 3 et en étalant la goutte par des stries séries. La boîte est ensuite incubée à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

- Présence des colonies typiques apparaissent d'une couleur verte, contour régulier avec ou sans centre noir : Résultat positif.
- Absence des colonies typiques apparaissent d'une couleur verte, contour régulier avec ou sans centre noir : Résultat négatif.

3.2.5. *Staphylococcus aureus*

- **Technique (ISO 6888, 2004)**

- **Enrichissement**

A partir des dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} , nous avons porté aseptiquement 1ml par dilution dans un tube stérile, par la suite 15ml de milieu d'enrichissement (bouillon de Giolitti et Cantoni) est ajouté, puis mélanger bien le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait dans une étuve réglée à 37°C pendant 24 à 48h.

➤ **Isolement**

Sont considérés comme positifs, les tubes ayant virés au noir, ces tubes sont isolés sur gélose de Chapman à l'aide d'une anse bouclée sous forme de stries. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

• **Lecture**

-Les *Staphylococcus aureus* se présentent sous forme de colonies dorées, jaunâtres, brillantes entourées d'une zone transparente.

3.3. Identification biochimique

Nous avons identifié les bactéries pathogènes isolées, par des tests biochimiques (galerie classique). Les galeries classiques sont un ensemble de tests biochimiques qui révèlent des voies métaboliques précises.

Pour l'identification des souches de *Staphylococcus aureus*, nous avons réalisé le test suivant:

3.3.1. Test de catalase

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif (Reiner, 2010). La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante :



• **Technique**

- Sur une lame sèche et propre, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée,
- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, nous avons rajouté une colonie bactérienne puis l'observation se fait dans l'immédiat
- La présence de l'enzyme se traduit par le dégagement de bulles gazeuses.

3.3.2. Urée indole

Pour l'identification d'*Escherichia coli*, nous avons réalisé le test d'urée indole.

3.3.2. Urée indole

Pour l'identification d'*Escherichia coli*, nous avons réalisé le test d'urée indole.

- **Technique (ISO4832/NF V08-060, 2009)**

La présence d'*Escherichia coli* est mise en évidence par repiquage de 3 à 5 colonies bien isolées et représentatives sur milieu urée-indole, puis incubé à 37°C pendant 24h, en rajoutant 2 gouttes de réactif kovak's.

- **Lecture** : l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'*Escherichia coli*

D'autres tests biochimiques n'ont pas été effectués, en vue de la crise sanitaire du coronavirus (Annexe 3)

3.4. Etude de l'aromatogramme

La recherche de l'activité antibactérienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des souches bactériennes isolées des produits alimentaires, soumises à l'huile essentielle (HE) de *Syzygium aromaticum*.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (aromatogramme) est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disque (Georgetti et al., 2003).

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des HEs testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Beloud, 2003). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans de boîte de pétri, le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'HE.

- **Principe de la technique**

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes, des suspensions pour chaque espèce ont été préparées. À l'aide d'une pipette pasteur deux ou trois colonies pures ont été prélevées et bien isolées sont déchargées dans un tube contenant 5ml d'eau physiologique stérilisée. L'enrichissement dure pendant 2 à 3 heures.

- **L'ensemencement**

Sur des boîtes contenant le milieu gélosé Muller Hinton (MH) d'une épaisseur de 2 mm bien séchées, un volume de 0,1 ml de l'inoculum est introduit, afin de faire un étalement.

- **Préparation des disques d'aromatogramme**

Les disques sont fabriqués à partir de papier wattman avec un diamètre de 5,5 mm. Une fois les géloses Muller- Hinton sont ensemencées, les disques imbibés dans l'huile essentielle sont disposés sur la gélose pendant 1/2h dans l'étuve.

- **Incubation et lecture**

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante, les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant avec une règle graduée les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition.

Selon **Atmani et Baira (2015)**, le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante (tableau I).

Tableau II : Classement des bactéries selon leurs DZI.

DZI	Classement des bactéries
$D \leq 8\text{mm}$	Souche résistante (-)
$9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$	Souche sensible (+)
$15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$	Souche très sensible (++)
$D \geq 20\text{mm}$	Souche extrêmes sensible (+++)

1. Description de l'huile essentielle obtenue

1.1. Caractéristiques organoleptiques

Le tableau III, présente une comparaison entre les caractéristiques de l'huile essentielle extraite des clous de girofle et les normes AFNOR (1992).

Tableau III. Caractérisation organoleptique de l'huile essentielle des clous de girofle à coté des normes AFNOR (1992).

Huile essentielle/Norme	Caractérisation organoleptique		
	Aspect	Couleur	Odeur
Clous de girofle <i>Syzygium aromaticum</i>	Liquide ; Mobile ; Limpide ;	Jaune claire	Epicée
AFNOR (1992)	Liquide ; Mobile ; Limpide parfois ; légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicé caractéristique de l'eugénol

D'après les résultats de l'analyse organoleptique, nous avons constaté que l'huile essentielle obtenue à partir des clous de girofle présente un aspect liquide et limpide avec une couleur jaune claire et une odeur épicée. Cette caractérisation est conforme à celle décrite par les normes d'AFNOR (1992).

2. Analyses de l'huile essentielle (HE)

2.1. Rendement

Le rendement en HE extraite par hydro-distillation à l'échelle du laboratoire à partir des clous de girofle est de 8%. Ce résultat ne coïncide pas avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont procédé par la même technique d'hydro-distillation, le cas de **Andrea (2004)** a obtenu un résultat de 14 à 20% et un rendement de 10.60% a été enregistré par **Houari (2015)**. Tandis que, **Benali et Bencheikh (2016)** ont obtenus un rendement de 9.83%.

Cette différence de rendement est probablement due à une perte d'huile dans la phase aqueuse du distillat et la simplicité de notre dispositif d'hydro-distillation. Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en HE varient suivant diverses conditions :

- La méthode employée,
- Les parties végétales utilisées et les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique ;
- La période de récolte de cette plante, le degré, les conditions et la durée de séchage, présence de parasites, et de mauvaises herbes (**Bajpai et al., 2008 ; Kelen et al., 2008**).

3. Analyses bactériologique des échantillons alimentaires

Durant notre période de stage, nous avons isolé et identifié des bactéries pathogènes à partir de deux échantillons alimentaires : chawarma cru et saucisses cru. Les résultats qualitatifs sont répartis dans le tableau suivant :

Tableau IV : Résultats de l'analyse bactériologique des produits alimentaires étudiés.

Germes identifiés	Echantillons	
	Saucisses cru	Chawarma cru
<i>Staphylococcus aureus</i>	P	p
<i>Escherichia coli</i>	p	p
<i>Salmonella</i>	a	a

(p) présence, (a)absence

3.1.Chawarma et saucisses cru

L'analyse bactériologique de la surface de chawarma cru et saucisses cru achetés du marché de Blida a relevé la présence de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Khallaf et al. (2014)** qui a enregistré une contamination des volailles désossées cru (chawarma cru) par les mêmes bactéries pathogènes. La principale cause de contamination par ces germes bactériens est l'insatisfaction des pratiques hygiéniques. Sachant que le chawarma est un aliment manipulé par les mains, ce qui rend la transmission humaine, la principale source de contamination.

La contamination des viandes par les *Staphylococcus aureus* se fait par les manipulateurs (**Rosset et Lamelloise, 1984**). D'après, **Bourgeois et al. (1988)**, les produits de base sont généralement de bonne qualité, le seul problème qui semble se poser, se situe plus dans le transport, la conservation et la préparation. Les sources de contamination seront donc constituées par les locaux, matériel et les manipulateurs.

D'après, **Carip (2008)**, *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus importante en alimentation, c'est une bactérie commensale de la peau des animaux et de l'homme, qui contaminent fréquemment des aliments et peuvent entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires (**Guiraud, 2003**). *Staphylococcus aureus* est à l'origine de l'intoxication alimentaire due à l'ingestion d'entérotoxine staphylococcique (protéine thermorésistante préformée dans l'aliment) (**ANSES, 2014**).

D'autre part, la présence d'*E. coli* dans le chawarma cru (figure 3) est la cause d'une transmission féco-orale. Cette transmission est d'autant plus importante que l'hygiène générale et plus particulièrement celle des mains insuffisante et que les contacts sont étroites (**Belongia et al., 1993**), en plus de l'absence de la chaîne de froid (**Cheikh, 2010**).



Figure 3: Colonies d'*Escherichia coli* sur le milieu VRBL après incubation à 44°C.

Après l'identification par le test urée-indole et l'apparition d'un anneau rouge (figure 4) nous avons détecté vraiment la présence d'*E. coli*. L'exposition à cette bactérie peut causer la maladie gastro-intestinale dans les gens sains quand ingéré.

E. coli est considéré comme un hôte normal de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux (**Caprioli et al., 2005**) et elle représente toutefois 80 à 90% des coliformes fécaux détectées (**Rosset, 1982**).



Figure 4 : Apparition d'un anneau rouge sur le milieu urée Indole.

A ce titre, *E. coli* sont recherchés dans les aliments comme indicateurs de contamination fécale, leur présence témoigne de l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine entérique, notamment les *Salmonella*, dont sa présence est interdite dans les Merguez crues (JORA, 2017). En revanche, aucun résultat positif n'a été enregistré pour *Salmonella* dans les deux échantillons étudiés.

4. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium Aromaticum*

En milieu solide l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est déterminée par les mesures des diamètres de zone d'inhibition (DZI) de la croissance en millimètres autour des disques. La figure 5 présente les DZI de l'huile essentielle vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *E. coli*, respectivement.

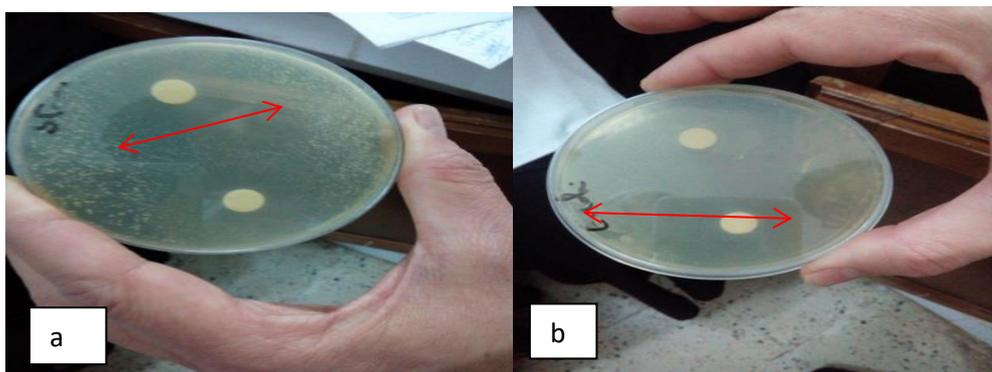


Figure 5 : Zone d'inhibition de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur *Staphylococcus aureus*(a) et *Escherichia coli* (b) par aromatoigramme.

Pour l'huile essentielle des clous de girofle, la plus grande zone d'inhibition a été observée chez *Escherichia coli* avec un diamètre de 45mm et de 21mm chez *Staphylococcus aureus* (tableau 4).

Tableau 4 : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis les souches bactériennes testées

Souche bactérienne	Gram	DZI	Sensible	Résistante
<i>Escherichia coli</i>	-	45	+++	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	21	+++	/
<i>Salmonella</i>	-	/	/	/

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres déjà publiés montrant que les HES des clous de girofle possèdent un pouvoir antibactérien. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est l'eugénol qui appartient à la famille des phénols (**Rhayour, 2002 ; Bennis et al., 2004**).

Les travaux de **Valero et Giner (2006)**, ont prouvé que l'eugénol parmi d'autres composés a provoqué l'inhibition de la croissance des bactéries pathogènes. Il semble donc que l'activité bactéricide des HES débute par une fixation de ces molécules sur les membranes bactériennes provoquant des altérations de structure et de perméabilité. En conduisant à la perte des constituants cellulaires due à une lyse importante des cellules bactériennes (**Rhayour, 2002**).

Il semble que le mécanisme d'action de l'HE est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram-. D'après **Kotan et al. (2007) et Elharas et al. (2013)**, la bactérie à Gram+ est plus résistante aux huiles essentielles. En outre, **Dabbah et al. (1970)** ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries à Gram- par rapport aux Gram+. Ce qui est similaire avec nos résultats.

D'après **Caillet et al. (2007)**, les HES de giroflier empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Les études réalisées par **Bagamboula et al. (2004) ; Baydar et al. (2004)** ont démontré que différents constituants des HES possèdent des activités antibactériennes et que les constituants volatils majeurs ont les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, comme l'eugénol chez les clous de girofle.

Le travail entrepris au cours de cette présente étude consiste à isoler les bactéries pathogènes à partir de deux denrées alimentaires (chawarma cru et saucisses crues). En plus à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur les bactéries pathogènes recommandées par JORA (2017).

Les résultats bactériologique obtenus ont montré la présence de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* par contre absence totale de *Salmonella* dans les deux échantillons étudiés (chawarma cru et saucisses crues).

L'extraction de l'huile essentielle des clous de girofle par hydro-distillation a montré un rendement de 8%. L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* sur les deux souches bactériennes par la méthode d'aromatogramme a révélé que la capacité inhibitrice de l'huile essentielle des clous de girofle dépend du type de Gram de la bactérie isolée. Les résultats obtenus ont montré une zone d'inhibition (DZI) de 21mm pour les *Staphylococcus aureus* et 45mm pour *Escherichia coli*.

Afin de valoriser l'usage de cette huile autant qu'agent antibactérien et conservateur naturel, nous recommandons au terme de ce mémoire d'approfondir cette étude par :

- ✓ Etablir ultérieurement une étude toxicologique afin de déterminer le degré de toxicité de cette HE pour le consommateur.
- ✓ Réaliser des essais d'application comme additif naturel dans les aliments à base de volailles.

AFNOR Recueil des normes françaises. (1992). Huile essentielle –Association Française de Normalisation, 4^{ème} édition,paris .

Alexandra L. (2001). La conservation des aliments tout on jeu. Savoir scientifique

Andria tsihoara S. (2004). Contribution à l'étude de l'huile essentielle de Gingembre en vue d'une meilleure exploitation école supérieure polytechnique d'Antananariv. p23- 25.

André M. (2013). Les Additifs alimentaires: Un danger méconnu: Éd. Jouvence.

ANSES Agence nationale De sécurité sanitaire de l'alimentation De l'environnement Et Du Travail. (2010). Fiche de description de danger microbien transmissible par les aliments. *Clostridium perfringens*. Famille des Clostridiaceae

ANSES Agence National De Sécurité Sanitaire des Aliments De L'environnement Et Du Travail,(2014). fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments

Atmani H., Bairan K. (2015). Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* I. Diplôme de Master en biologie et physiologie végétale .Université Frères Mentouri I.Constantine.p-64.

Avril D., Dennis M. (1992). Biopréservation by lactic acid bacteria . Antonie leeuwenhoek. J.p 70, 331-345.

Bajpai V.K., Rahman A., Kang S.C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. To control food-borne pathogenic and spoilage bacteria.international journalof Food Microbiology. p125,117-122.

Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T.(2004). Antibacterial activity andcomposition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercialimportance in Turkey.Food Control. 15, 169–172.

Bagamboul C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils,carv acrol,thymol,linalool and p-cymene toward *s Shigelle sonnei* and *S.flexneri*.Food Microbiology.p 21,33-42.

Beloud A. (2003). Plante médicinales d'Algérie .Offices des publication universitaires.,p144-145 .

Benali Djihad ., Bencheikh selma. (2016) .Contribution à l'étude des propriétés antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des épices,MASTER Académique , Analyse et Contrôle de Qualité, Université Kasdi merbah Ouargla,p 2.

Benni S., Chami F. (2004). Surface alteration of *sacchromyces cervisiae* induced by thymol and eugenol. Letters in Applied Microbiology.p38,454-458 .

Belongia E.A., Osterholm M.T., Soler J.T., Ammend D.A., Braun J.E. and Macdonald K.L. (1993). 0 infection in of *Escherichia.coli* O157:H7 Minnesota child day-care facilities. JAMA, 269, 883- 888.

Belaiche p. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie.Ed. Maloine S.A., Tome I .

Benyagoub E., Nabbou N.,Sirat M., Dahlis Z. (2014). Propriétés antibactériennes et constituants phyto-chimiques des extraits de la lavande de la région de Tlemcen et leur effet sur quelques espèces bactériennes responsables d'infection Alimentaire.Bio Ressources.p4, 2,18-28.

Bonnefoy C., Guillet F., Leyral Get Verne-Bourdais E. (2002). Recherche et identification des microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires, In:Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Editon Scérén, Paris.p 153-18.

Boumendjel. (2005).Conservation des denrées alimentaires. Centre Universitaire d'Eltarf .

Bourgeoi, C.M., Mescle J.F, Zucca J. (1988). Microbiologie alimentaire-Tome I. Paris, Tec & Doc Lavoisier APRIA. p420.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire, Lavoisier Tec & Doc, Paris P 25.

Brunetton J. (1993). Pharmacognosie phyto-chimie :plantes médicinales. Tec. et Doc. – Lavoisier.

Brunetton (1999). Pharmacognosie. Phytochimie - plantes médicinales. 3^{ème} Dd. TEC & Doc, Lavoisier, Paris.

Brunetton J. (1999). Huiles essentielles, In pharmacognosie phyto-chimie plantes médicinales .3^{ème} éd.Doc.et Tec.Lavoisier .

Busta F., Foegeding P.M. (1983). Chemical food preservatives in S.

block, Desinfection, sterilization and preservation, Lea and Febiger. P256-694 .

Bur S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food_a review. International Journal of food Microbiology. p94,223-253 .

Caillet S., Lacroix M. (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).

Caprioli A., Morabito S., Brugère H., and Oswald E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet. Res. 36,289–311.

Carip C. (2008). Microbiologie hygiène bases microbiologiques de la diététique. Edition tec α doc Lavoisier, Paris, p153-675.

Chaalal W. (2013). Occurrence et profil d'antibiorésistante des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Mémoire de magistère. faculté des sciences. Université d'Oran.

Cheikh Ndiaye. (2010). Etude anatomo-clinique et bactériologique sur des cas suspects de *colibacillose aviaire* dans les régions de Dkar et Thies .(thèse de doctorat inédit). universite cheikh anta diop de dakar..

Cuq J.L. (2007). Microbiologie alimentaire cours de microbiologie Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc. Polytech Montpellier STIA4. P134 .

Darinmou . (2000). Conseil pour le consommateur. Laboratoire darinmoub. Site [darinmoub.com /conseils.pdf](http://darinmoub.com/conseils.pdf)

Dabbah R., Edwards V. M., Motts W.A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. Applied Microbiology. 19, 27-31.

Delarras, C. (2007). microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de controle sanitaire. Paris: Lavoisier.

Dervin F. (2013). Le Risque de Toxi-infection Alimentaire lié aux salariés manipulant des aliments : recommandation pour la surveillance médicale des salariés. Thèse de doctorat en Médecine, U.F.R de Médecine et de Pharmacie : université de Rouen.p 95

Derache R. (1975). Colorants alimentaires, Médecine et Nutrition, XI, 2, 131-134.

Dupin H., Cuq J.L., Malewlak M.I., Leynaud Rouaud C. et Berthier A.M.(1992). Alimentation et nutrition humaines. Paris : ESF éditeur.pp 1533

Elharas k., Abdelmoula Daagare., Abdelmoula Mesfioui et Mohamed Ouhssine.(2013). Activité antibactérienne des huiles essentielles,09(2),p134-141.

Emilie F. (2009). Connaissance des aliments. Bases alimentaires et notionnelles de la diététique.2eme Edition Lavoisier. ISBN : 978-7430-1156-7.

Eric Penot et al . (2014). Le giroflier à Madagascar : une « success story »... à l'avenir incertain, Bois et Forets des Tropique, 35p.

Fabiani G. (1987). Prévention des maladies infectieuses microbiennes et parasitaires. Hermann, Paris.p 43.

Finar I.L. (1994). " Organic chemistry", Ed. Longman Scientific et Technical, Vol. II, 354

Garibaldi J.A., Greenlaw J., Choi J. and Fotovatjah M. (1995). Treatment of post-operative pain. CDA Journal; 23:71-7

Gallen C., J Pla. (2013). Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. Revue française d'allergologie 53 (2013) S9-S18.2.

Georgetti S.R., Casagrande R., Dimambro V.M., Azzolini ., Ana E.C.S., Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Methode. AAPS Pharm Sci,5-2,p1-6.

Ghafir Y., Daube G. (2007). Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale, Ann. Méd. Vét.151, p79-100.

Goubau P., Pellegrims. (2000). Repère en Microbiologie ,Edition Garant. P391.

Gordon R .E., Haynes W.C., Pang C.H.N. (1973). the genus bacillus.Agri culture Handbook,ARS-USDA,Washington(USA).p 427.

Goetz P., le Jeune R. (2010). *Syzygium Aromaticum* L, Merr and Perry (Myrtaceae) giroflier, phytothérapie, p 37-43.

Goetz P., le Jeune R. (2012). *Syzygium Aromaticum* L, Merr and Perry (Myrtaceae) giroflier, phytothérapie, p 37-43.

Guignard J.L. (2000). Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185

Griffin P.M. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Infectious of the Gastrointestinal Tract/Ed. par Blaser MJ, Smith PD, RadvinJI, Greenberg HB, Guerrant RL. New York: Raven Press, 739-758.

Guy L., Elizabeth V. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments. Hygiène et sécurité alimentaires. Doin éditeur, Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, 4 ème édition.

Guiraud J.P. (1998). La microbiologie alimentaire. DUNOD. Paris.

Guiraud J.P. (2003). Microbiologie Alimentaire. 3eme Ed ; DUNOD, Paris.

Guignard J.L. (1996). Biochimie végétale,10ème éd.Masson.

Guesmi A., Boudabous A. (2006). Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie-les plantes à parfum, aromatiques et médicinales.Faculté des sciences de tunis, Université Tunis-El Manar,2092,Tunis.

Hayder H., Mueller U., Bartholomaeus A. (2011). Examen des Réactions D'intolérance aux Aliments et aux Additifs Alimentaires. International food risk analysis journal. 1-2,p25, 36.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Vaillant V., Delarocque-astagneau E., Bouvet P. (2001). Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998, Bull Epidémiol, Hebd. p15, 65-70.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., ESPIE E., vaillant V. (2002). Les toxiinfections alimentaires collectives en France en 2001. Bulletin épidémiologique hebdomadaire 50 p 25.

Holme R. (2003). Drinking water contamination in Walkerton, Ontario: positive resolutions from a tragic event, Water Sci Technol . 1-6,p47

Houari A.D.E. (2015). Effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiqués au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale. Thèse de Doctorat en biologie. Université d'Oran Ahmed ben Bella. P52,63.

ISO International Organization for Standardization 688 7-6, (2013). Microbiologie des aliments Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue

de l'examen microbiologique .

ISO International organization for Standardization 4832/NF V08-060. (2009).

Microbiologie des aliments Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 C°.

ISO International Organization for Standardization 6888. (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of coagulase positive staphylococci(*Staphylococcus aureus* and other species).

ISO International Organization for Standardization 6579. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection of *Salmonella spp* .

Jackson S.G., Goodbrand R.B., Johnson R.P., Odorico V.G., Alves D., Rahn K., Wilson J.B., Welch M.K., Khakhria R. (1998). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhoea associated with well water and infected cattle on an Ontario farm . Epidemiol Infect 120,p 17-20.

Jean-Noel Joffin., Guy Leyral. (2009). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. 4 eme édition, ISBN : 978-7-2-86617-515-8.

Jean-Pierre D. (2000). La conservation des aliments. Lycées de métiers de l'hôtellerie et de tourisme. Alexandre Dumas strasbourg _ Illich.

Joffin C., Joffin J.N. (2003). « MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE ».

Joffin, J.-N et le yral ., G.2006 :Microbiologie technique, Tome 1 :dictionnaire des techniques, 4eme edition CRDP d'aquitaine.

Journal Officiel de La République Algérienne (J.O.R.A) . (1998). Arrêté interministériel du 27 mai 1998, relatif aux critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaire.

Journal Officiel de la République Algérienne (J.O.R.A) . (2017). Arrêté interministériel du 2 juillet 2017,relatif aux critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaire .

Kampf G., Aderna S., Ruden H., Weist K. (2003). Inducibility and potential role of Mec A –gene- positive oxacillin-susceptible *staphylococcus aureus* from colonized healthcar workers as a source for nosocomial infections. J Hosp infect. p54 : 124.129.

Kelen M., Tepeb. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*. 99, 4096-4104.

Khiati M. (1998). Guide des Maladies infectieuses et parasitaires. Maladies à transmission hydrique. Office des Publications Universitaires. Alger.

Khallaf M., Benbakhta B., Nasri I., Sarhane B., Senouci S., Ennaji M.M. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat marketed in Rabat, Morocco, *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 1665-1670.

Korsak N., Clinquart A., Daube G. (2004). *Salmonella* spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique , *Ann. Méd. Vét*, 174-193.

Kozam G. (1977). The effect of eugenol on nerve transmission . *Oral. Surg . Oral .Med . Pathol* ; 44 :799-805.

Kotan R., Kordali S., Cakir A. (2007). "Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes." *Z. Naturforsch. C*. 62(7–8): 507–513.

Kurita N., Koike S. (1982). :systematic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric.Biol.Chem*. p46,159-165.

Larpent, J.P. (1997) . Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique

Larpent J.P. (2000). Microbiologie et aliments : microbiologie négative . Industrie alimentaire et agricoles, mai, P 21-34.

Le loir Y, Gautier M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Tec & Doc, EMinter, Lavoisier. France.

Lowy FD., Engl. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339, 520–32.

Mahmoud B.S.M., Yamazaki K., Miyashita K., Ilshik S., Dong-suk C., Suzuki T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*. p 21,657-666

Mannix M., O'Connell N., Mcnamara E., Fitzgerald A., Prendiville T., Norris T., Greally T., Fitzgerald R., Whyte D., Barron D., Monaghan R., Whelan E., Carroll A., Curtin A., Collins C., Quinn J., O'Dea F., O'Riordan M., Buckley J., McCarthy J., McKeown P. (2005) Large *Escherichia. coli* O157 outbreak in Ireland, October-November

2005. Euro Surveill 10, 51222-51223.

Marchal N., Bourdon J.L., Richard C., 1982. Milieux et techniques réservés à l'étude de certains genres bactériens. In: Les Milieux de Culture pour l'Isolement et l'Identification Biochimique des Bactéries, pp. 235, 248, 273-283. Doin, Paris, France.

Microbiologie. (2014). 83 :149-159 doi : 10.1134/S0026261713060088.

Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat, Faculté des sciences Tlemcen..

Morin J., Malhuret R., Basted P. (1983). Aromathérapie, Exemple de la réalisation pratique de l'utilisation des huiles essentielles en thérapeutique, ISSN 0992-9406

Murielle M. (2009). Nutrition humain et sécurité alimentaire. Edition Lavoisier, ISBN : 987-2-7430-1072-0.

Mulyukin AL., Suzina NE., Melnikov VG., Galchenko VF., EL'-Registan G.L. (2014). Dormant state and phenotypic variability of staphylococcus aureus and corynebacterium pseudodiphtheriticum.

Nauciel C ., Vildé J.L. (2005). Bactériologie médicale : Abrégés connaissances et pratiques . Elsevier Masson. Paris , p 257

Ohkubo T., Shibata M. (1997). The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. J . Dent. Res ; 76 : P :848-851

Organisation mondiale de la santé . (1997). Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales. Organisation mondiale de la santé, Genève.

Paris M., Hurabielle M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339

Pauli A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents.Int.J. Aromather., 11 : 126-133.

padrini F., Lucheroni M.T. (1996). le grand livre des huiles essentielles.Ed.de Vecchi.

Pascoe B., Dans L., Wilkinson TS., Harris LG., Bodger O., Mack D., et al. (2014). Dormant cells of *staphylococcus aureus* are resuscitated by spent culture supernatant. Schliever PM

edition. PLOS ONE. 9 :e85998. Doi : 10-1371/ journal.pone, 0085998

Pilly E. (2008). Maladies infectieuses et tropicales. p 21 .

Prescott C.E., Hope G.D., Belvins L.L. (2003). Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comeniana. 55 : 64-72.

Rakotoatimanana B.V., al. (1999). « Contribution a l'optimisation d'une unité de production d'huiles essentielles », mémoire de fin d'étude , département génie chimique , Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo ESPA, université d'Antananarivo.

Recherche et Identification des staphylocoques. (2014)
:http://www.anses.fr/Documents/MICFi-StaAureus.

Reiner K .(2010) .Catalase test protocol.American Society for Microbiology. 1-9

Renaud F., Borrel T., Marmontier A. (2007). Identification conventionnelle in Précis de bactériologie clinique. Ed. ESKA. 2 émes édition, Paris

Rhayour k . (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*
Thèse présentée en vue de l'obtention du Doctorat National.p69.

Richard H., Loo A. (1992). Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, Apria.

Rosset R. (1982). Conséquences hygiéniques des flores microbiennes contaminant la viande, édition du CNRS, paris,p 153 .

Rosset R., Lamelloisep. (1984). Multiplication de la microflore initiale. In Les viandes : Hygiène et Technologie. Paris, ITSV, p 113-138

Singh A.K., Dhamanigi S.S., Asad M. (2009). Anti-stress Activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). Indian. J. Pharmacol. ; 41,1, 28-31

Soares M.T., Tokumaru Miyazaki N.H., Noletto., al. (1997). Enterotoxin production by staphylococcus aureus clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III ::B :A) among isolates from food handlers. J Med Microbiol. 46 ,214-221.

Sophie ., Barbelet.(2015).le giroflier : historique, description et utilisation de la plante et de ses huiles essentielles. Vol5. P 22-26.

Stephan R., Untermann F. (1999). Virulence Factors and Phenotypical Traits of Verotoxin Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Asymptomatic Human Carriers. J Clin Microbiol 37, 1570-1572.

Valnet J. (2000). Aromathérapie.Ed .Maloine S.A.

Valero M., Giner M.J. (2006). Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in an d the sensory qualities of carrot broth. International Journal of Food Microbiology. p106, 90- 94.

Valnet J. (1984). Aromathérapie –traitement des maladies par les essences des plantes .Ed.Maloine S.A.,n°10 .

Vernozy Rozand C., Montet M.P. (2001). *Escherichia coli* O157:H7. Londres, Paris, New York: Tec et Doc. p135.

Véronique Zuliani., Pascal Garry., Ctscv. (2014). 7 avenue du général de gaulle, 94704 Maisons-Alfort Codex Avec aimable autorisation de la revue « Salles propres » ,qui a publié cette article .p12-16.

Virlogeux Payant I., Lalmanach A.C, Beaumont C., Hirt H., Velge P. (2012). *Salmonella*, de la plante au tube digestif : Des recherches pour élaborer des stratégies de lutte,Innovations Agronomiques. p 24, 35-48.

Wagner H, Sprinkmeyer L. (1973). Ü ber die Pharmakologische Wirkung von Melissengeist Deutsche Apotheker Zeitung 113: 1159–1166

Ziane M. (2015). Caracterisation , identification et etude de la thermorésistante de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous. Thèse de doctorat. En microbiologie : université ABOUBEKR BELKAID ,Tlemcen. 3 ,p6.

Annexe 01



Figure 1 : Poudre des clous de girofle



Figure 2 : hydrodistilateur



Figure3 :Huile essentielle de clou de girofle



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

Figure3 : Observation macroscopique de *E. coli* et *Staphylococcus aureus*



Figure4 :Apparition d'anneau rouge indique la présence de *E.coli*



Figure6 : Milieu d'enrichissement pour *Staphylococcus aureus*

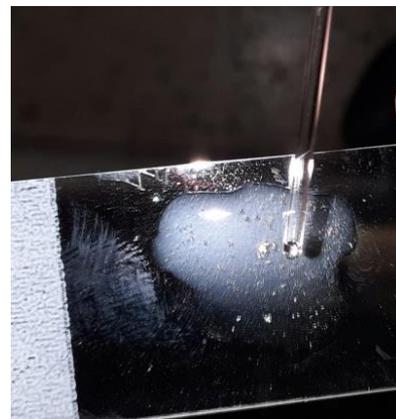


Figure7 :Teste de catalase chez *Staphylococcus aureus*

Annexe 02

Appareils	Rota-vapeur, Etuve, Bain marie, Balance, Broyeur électrique, Autoclave
Matériel	Boite pétrie, Pipette pasteur, Milieux de culture, Tube stérile, Disque vierge, Verrerie
Réactifs	Covaks, Sélénit-cystine, Additif Sulfite de sodium

ANNEXE 03

➤ **Identification des souches de *Escherichia coli***

L'identification des souches isolées est basée sur plusieurs tests : détermination de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

❖ **Examen macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification .d'après les auteurs Thoma et al. (1970), les éléments d'identification macroscopiques sont : La forme, Élévation de colonie, La transparence, la Surface, la consistance, la taille et la pigmentation.

(Larpent, 1997)

Lecture sur milieu Hektoen : des petites colonies jaunes saumon, lisse, ronde, braient.

Lecture sur milieu Mac Conkey : des colonies rose calière.

❖ **Examen microscopique**

Un examen à l'état frais a été fait pour examiner la mobilité, la forme des bactéries, et l'arrangement des cellules suivi d'une coloration de Gram.

a. Etat frais

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique.

b. Coloration de GRAM

Afin de confirmer le GRAM (-) des souches ;La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consistent à :

- fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen ;
- recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laissé agir une minute (violet de gentiane)
- rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute ;
- rejeter le Lugol puis laver à l'eau ;
- décolorer à l'alcool 95° ;

- rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir quelques secondes ;
- rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres. (Joffin et al., 2006)

Lecture : des bactéries Gram négatif, roses, coccobacille.

c. Identification biochimique

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement Apparentées entre elles. (Marchal et al., 1982). Ces tests ont été réalisés en utilisant les «galeries biochimiques traditionnelles : Le milieu TSI (milieu triple sucres), Mannitol-Mobilité, Clark et Lubs, Citrate de Simmons, eau peptonée exempte indole.

❖ Préparation de la suspension bactérienne

La préparation de la suspension bactérienne met en jeu le transfert en condition aseptique, d'une colonie bien isolée vers un tube d'eau physiologique stérile.

Cette suspension sert à ensemencer différents milieux de culture en tube permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques d'*Escherichia coli*.

❖ Métabolisme des glucides

▪ Test Voges Proskauer et Rouge de Méthyl

La mise en évidence des voies fermentaires est de grande utilité pour le diagnostic des micro-organismes. Ce test est opéré à partir d'une culture sur milieu Clark et Lubs qui servira à la détermination des réactions de Voges Proskauer (VP) et Rouge de Méthyl (RM).

Ensemencer un tube contenant le milieu Clark et Lubs à l'aide de quelques gouttes de la suspension mère, puis l'incuber à 37°C pendant 24h, le lendemain verser la moitié du tube dans un autre tube stérile :

- L'un servira à la recherche de la réaction VP, après adjonction des réactifs VP I, puis VP II, attende environ 15 minutes puis noter la couleur ; si elle vire au rouge orangé, il s'agit d'une réaction positive.
- L'autre servira à la recherche de la réaction RM, après adjonction du réactif RM ; s'il y a virage de la couleur au rouge, il s'agit d'une réaction positive (Joffin et al., 2006)

▪ **Test TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H₂S)**

Milieu solide, incliné, renfermant un indicateur de pH coloré, le rouge de phénol, il contient trois sucres (glucose avec une forte concentration au culot- saccharose et lactose au niveau de la pente), des peptones, des thiosulfates et du fer. Ce test nous renseigne sur trois caractéristiques :

1. La production ou pas de gaz pendant la consommation du glucose se manifeste par un décollement de la gélose au fond du tube.
2. L'utilisation ou non du lactose qui se manifeste par un jaunissement de la pente sinon, la pente reste légèrement rose.
3. La production ou non d'H₂S qui se traduit par un noircissement. Un ensemencement a été effectué par stries puis piqûre centrale sur la pente puis incubation à 30°C pendant 24 heures.

▪ **Test du citrate de Simmons**

Le principe est de placer les germes dans un milieu contenant une seule source de carbone, le Citrate. Seules les bactéries qui possèdent les enzymes de dégradation de cette molécule peuvent se multiplier dans ce milieu. Le milieu est ensemencé par des stries à la surface de la pente.

Incuber à 30°C pendant 48 heures ou plus. L'utilisation de citrate se traduit par le virage de l'indicateur de pH au bleu. **(Delarras , 2007).**

▪ **Test Mannitol Mobilité**

Ce test est utilisé pour les bactéries fermentatives. Il permet de mettre en évidence deux caractères : l'utilisation du mannitol et la mobilité. Sur le milieu de mannitol, un ensemencement a été effectué par piqûre centrale et incubation à 30°C pendant 24 heures. Si le milieu devient jaune : la bactérie est Mannitol +, s'il reste rouge elle est Mannitol -. Pour La mobilité, elle se traduit par l'envahissement de la gélose molle. **(Marchal et al., 1982)**

▪ **Production d'indole**

Ce test s'effectue en utilisant un milieu riche en tryptophane exempt d'indole (ou milieu urée-indole). l'indole produit par la bactérie est mis en évidence par le réactif de Kovacs. Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur suite à une incubation de 18 heures à l'étuve, l'addition du réactif de Kovacs montre la production de l'indole qui se traduit par un anneau rouge en surface du milieu (indole +).

❖ Conservation

La conservation à court terme des isolats purifiés est réalisée par ensemencement sur gélose inclinée. Après 24h d'incubation les tubes sont placés à 37 C, Où ils peuvent être conservés Pour plusieurs semaines.

➤ Identification des souches de *Staphylococcus aureus*

❖ Identification biochimique

En plus des caractères morphologiques, l'identification est aussi effectuée sur la base de quelques caractères biochimiques (GUIRAUD, 1998 ; FRENEY et al., 2007).

▪ Test de la catalase

Pendant leur respiration aérobie, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase. Cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction (MARCH et al., 1991).



Ce test permet de différencier les staphylocoques catalase (+) des streptocoques catalase (-) et intervient aussi dans le mécanisme de résistance à la bactéricidie (CHAALAL, 2013).

• Technique

Prendre une lame porte objet propre, déposer sur celle-ci une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose. Un test positif se traduit par un dégagement de bulles de gaz.

▪ Test de la coagulase

La propriété de *Staphylococcus aureus* à provoquer la coagulation d'un plasma est due à la sécrétion d'une protéine extracellulaire ; la Staphylocoagulase ou la coagulase.

La recherche de la Staphylocoagulase est le test essentiel qui permet de distinguer les souches potentiellement pathogènes, car la Staphylocoagulase joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des Staphylocoques, en leur permettant de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

• Technique

L'activité coagulase libre doit être mesurée à partir d'une culture sur milieu non inhibiteur.

À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et ensemencée dans un tube de bouillon cœur-cerveau, puis incubé à 37°C durant 18 à 24h.

Le substrat de cette enzyme est le plasma du lapin, à défaut nous avons eu recours à l'utilisation du plasma humain.

On prélève ensuite 0,5 ml de chaque culture ajoutées à 0.5 ml du plasma humain dans des tubes stériles, puis l'incubation est faite à 37°C. La coagulation est examinée après 4 à 6h. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif, non ensemencé, au plasma humain. Le témoin positif est réalisé, en utilisant la souche de référence ATCC 25923.

Le test est considéré comme positif lorsqu'on observe une prise en masse totale du plasma ou un caillot moins compact.

- **Test de la désoxyribonucléase (DNase)**

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) grâce à une enzyme l'ADNase. La réaction catalysée est la suivante :

ADN + H₂O Nucléotides et / ou polynucléotides.

La DNase des *Staphylococcus aureus* est, de plus, capable d'hydrolyser les ARN (activité ARNase). Les deux réactifs utilisés pour révéler l'action d'une DNase sont :

-L'acide chlorhydrique HCl à 2 N qui précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines ;

-Le bleu de toluidine qui prend une teinte rose en présence des composés d'hydrolyse de l'ADN.

La DNase recherchée n'est pas active sur le propre ADN des bactéries sécrétrices (JEANNOEL et GUY LEYRAL, 2009).

- **Technique**

Cette enzyme est recherchée par culture des souches à tester sur des boîtes contenant le milieu à ADN (Conda Pronadisa, Espagne). La présence de cette enzyme se traduit par la présence d'une zone claire tout autour de la strie et ceci après inondation de la boîte de Pétri par le HCl à 2N.

- **Test de Vogts Proskauer (VP)**

La réaction de Vogts Proskauer permet de mettre en évidence la production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol) à partir du glucose. Au cours de la fermentation butylène

glycolique, avant de parvenir au stade butylène glycol, l'acide pyruvique est transformé en acétyl-méthylcarbinol ou acétoïne. L'acétoïne est mise en évidence par une coloration rose obtenue en milieu alcalin par action de créatine sur le diacétyl formé par oxydation (RENAUD et al.,2007).

- **Technique**

Un volume de 5 ml du milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche à tester, puis incubé à 37°C pendant 48 heures. La lecture se fait après l'addition de 0.5 ml d' α -naphtol à 6% (VPI) et de 1 ml de NaOH 4N (VPII) à 1 ml du milieu d'incubation.

Le test positif se traduit par l'apparition d'une coloration rouge cerise en surface au bout de 10 à 15 mn.

- **Recherche du nitrate réductase**

La nitrate réductase est une enzyme (un complexe enzymatique en réalité) qui est capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates (NO_3^-). Au cours de ce test, on recherche donc la production de cette enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.

- **Technique**

La recherche du nitrate réductase est faite par ensemencement d'un bouillon nitraté par la souche à tester. L'incubation est faite à 37°C pendant 48 heures.

La révélation est faite après ajout de deux réactifs (nitrate réductase I et II). Dans le cas où il y'a apparition d'une couleur rouge ça voudra dire qu'il y'a eu réduction des nitrates en nitrites ce qui implique donc la présence de l'enzyme, et quand il n'ya pas eu de virage de couleur ça peut se traduire par l'absence de l'enzyme ou par la réduction totale des nitrites en azote (N_2) ; pour le savoir il faut poursuivre le test en rajoutant de la poudre de zinc, dans le cas où il y'aura un changement de couleur au rouge donc le test est négatif car la réduction est due au zinc, et dans le cas contraire le test est positif et que la réduction par l'enzyme était totale jusqu'à dénitrification.