

REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER SMB      filière : BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE ET TOXICOLOGIE DES ALIMENTS

**Thème :**

Etude de l'activité biologique de quelques plantes médicinales et  
aromatiques de la région de Blida et application dans le domaine  
Agroalimentaire en tant que conservateurs naturels « Bio » dans  
les viandes bovines fraîches.

Présenté par : MAMMOU YASMINA

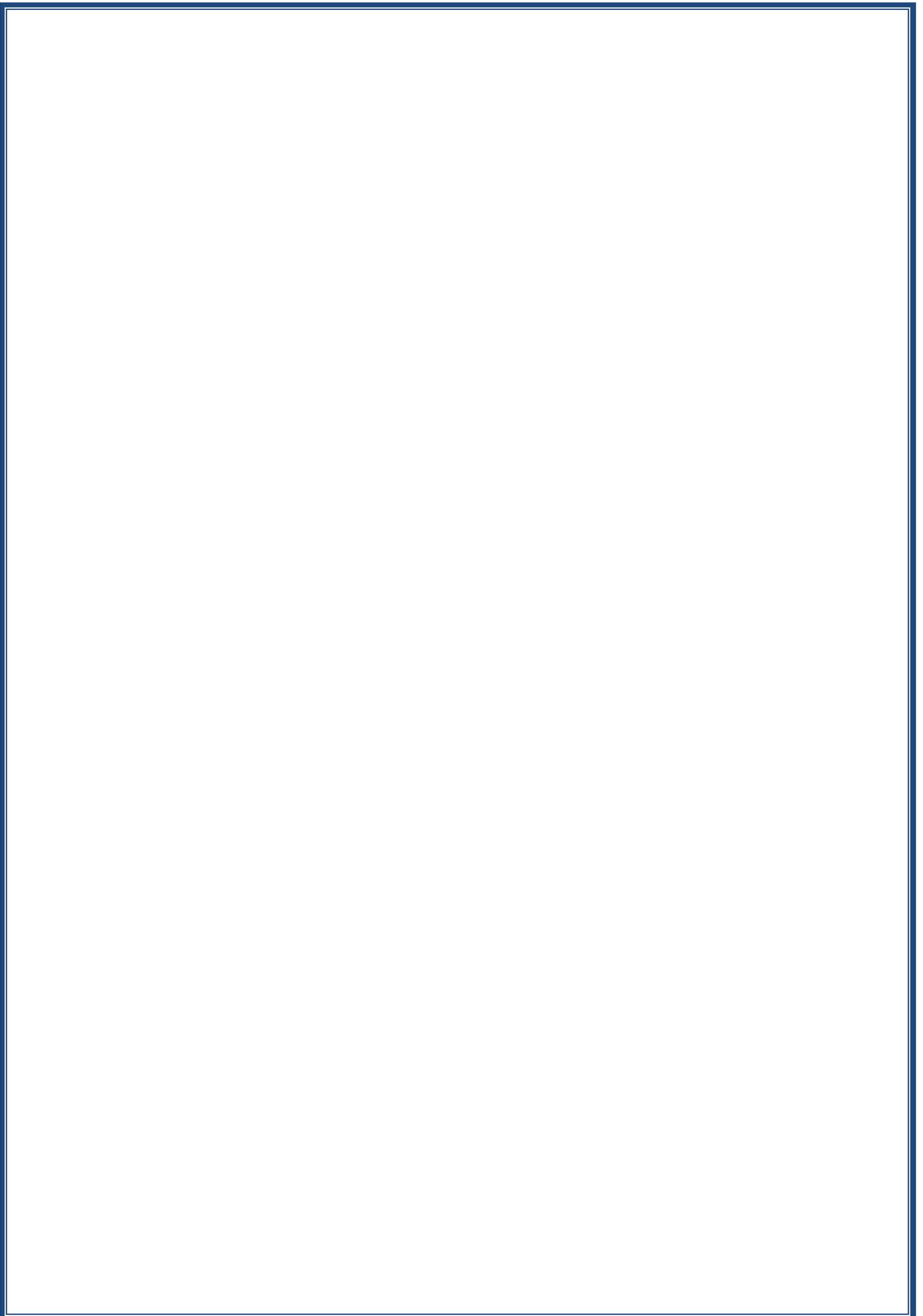
Soutenu : Le 17/12/2013

**Devant le jury:**

M <sup>r</sup> . MOHANED SAID O.	MAA ( UB1 )	Président
M <sup>r</sup> . ROUBI A .	MAB ( UB 1 )	Promoteur
M <sup>me</sup> . BENOAKLIL F.	MAA ( UB1)	Examinatrice
M <sup>me</sup> . BRADEA MARIA STELLA	MCA ( UB1 )	Examinatrice

Promotion

2013-2014



## **Remerciements**

*Je tiens d'abord à remercier le « bon dieu » tout puissant de nous donnés la force, la santé, la volonté et le courage qui ma permis de réaliser ce travail et d'arriver au terme de nos études dans les bonnes conditions.*

*Je remercie mon promoteur Mr.Rouibi qui a accepté de m'encadrer, pour ses encouragements et ses conseils.*

*Je tiens à également à remercier notre président de jury Mr. MOHANED SAID mon enceins enseignant de génétique pour son honorable présence.*

*A l'honorable jury,*

*A l'ensemble des enseignant du département de biologie de SAAD DEHLEB qui nous ont servis tout au long du cursus universitaire.*

*A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, é la concrétisation de ce mémoire.*

## **DEDICACE**

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers et adorables **parents**, qui m'ont toujours encouragé, aidé à surmonter tous les obstacles que j'ai rencontré dans ma vie et être à mes cotés dans les moments les plus difficiles.*

*A mes frères: Walid, Ahcen, Hocine et Noufel (goulouz).*

*A toute la famille **MAMMOU**.*

*A tous mes collègues des laboratoires VENUS - SAPECO : Amina, Karima, Samir Hichem et Mohand.*

*Un grand merci a notre PDG Mr. Moula Mourad, le DG, Mr. Moula Kamel des laboratoires VENUS – SAPECO, pour leur soutiens et leur compréhensions.*

*A tous ceux qui m'aiment.*

**Yasmine**



## Liste des abréviations

**%** : Pour Cent

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**BHA**: Butyl-hydroxyanisole.

**BHT**: Butyl-hydroxytoluène

**BHIB**: Brain Heart Infusion Broth

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice

**CPG**: Chromatographie en Phase Gazeuse

**DPPH**: 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**FDA** : Food Drug Administration

**FIG**. Figure

**CG/MS**: Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse

**GRAS**: Generally recognised as safe (Généralement considéré sain)

**H.Es** : Huiles essentielles

**H.Es** : Huiles essentielles

**ml** : Millilitre

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**UFC** : Unité Formant Colonies

**µl** : Micro Litre

**RH**: Acide gras libre

**ROOH**: Hydroperoxyde

**ROH**: radical alcooxyle

**ROS** ou **RLO**: Radicaux libres oxygénés

**SS** : Salmonella Shiguella

**SM** : Spectrométrie de Masse

**TBA:** Acide thiobarbiturique

**TBA-rs:** Thiobarbituric acid reactive species (les espèces réactives avec le TBA)

**TBHQ:** Tertio butyl-hydroxyquinone

**TIA:** Toxi-infection alimentaire

**ZI:** Zone d'Inhibition.

**Liste des figures**

**Figure 1 :** *Thymus vulgaris*

**Figure 2 :** *Origanum floribundum*

**Figure 3 :** *Laurus nobilis*

**Figure 4 :** Représentation schématique de la méthode des bandelettes

**Figure 5 :** Dispositif pour la réalisation de la « micro-atmosphère »

**Figure 6 :** Dispositifs de l'hydrodistillation type Clevenger

**Figure 7 :** Illustration du Principe de la méthode de diffusion par disque

**Figure 8 :** Illustration de la nature d'activité antibactérienne

**Figure 9 :** Photo montrant les étapes de préparation de la viande bovine

**Figure 10 :** Morceaux de viandes préparées, poids 50gr / morceau

**Figure 11 :** Inoculation des morceaux de viandes par des bactéries pathogènes

**Figure 12 :** Ajout des HES a une concentration 2x CMI

**Figure 13 :** Schéma du test de l'activité antibactérienne des H.E. sur une viande contaminée par les souches pathogènes

**Figure 14 :** Schéma de l'ensemencement des milieux sélectifs à partir de la solution mère de chaque échantillon

**Figure 15 :** Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie

**Figure 16:** Différentes étapes de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH

**Figure 17 :** Cuves en quartz de 2 ml

**Figure 18 :** Rendement des H.Es étudiées .obtenues par hydro distillation

**Figure 19 :** Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*

**Figure 20 :** *Chromatogramme de l'huile essentielle d'Origanum vulgare*

**Figure 21 :** Inhibition de la FAMT par les HES d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours

**Figure 22 :** Inhibition de *S. aureus* par les HES d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours

**Figure 23 :** Inhibition d'*E.coli* par les HES d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours

**Figure 24 :** Inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par les HEs d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours

**Figure 25 :** Inhibition de *Salmonella enteritidis* par les HEs d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours

**Figure 26 :** structure du carvacrol et du thymol (isomères de position)

**Figure 27 :** photo montrant la différence entre viande inoculée avec une bactérie pathogène avec et sans HE

**Figure 28 :** forme libre et réduite du DPPH

**Figure 29 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de l'HE de Thym

**Figure 30 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de l'HE d'origan

**Figure 31 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de l'HE de laurier

**Figure 32 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de la BHA

**Figure 33 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de la BHT

**Figure 34 :** variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de la vitamine E

**Figure 35 :** Comparaison des valeurs EC50 de nos huiles avec les antioxydants de synthèse et les antioxydants standards

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I</b> : Classification botanique du genre thym .....	3
<b>Tableau II</b> : Classification botanique du genre Origan .....	5
<b>Tableau III</b> : Classification botanique du genre Laurus.....	8
<b>Tableau IV</b> : Présentation des plantes employées pour l'extraction des H.E.....	26
<b>Tableau V</b> : Liste et caractéristiques des microorganismes testées .....	27
<b>Tableau VI</b> : Coloration de Gram et morphologie des souches bactériennes utilisées.....	30
<b>Tableau VII</b> : Caractères biochimiques recherchés.....	31
<b>Tableau VIII</b> : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les valeurs de CMI (d'HE/ml).....	36
<b>Tableau IX</b> : Produits et standards utilisés, leurs marques et degrés de pureté.....	45
<b>Tableau X</b> : Le rendement (%) en H.E. des différentes plantes utilisées.....	48
<b>Tableau XI</b> : résultats des caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées.....	49
<b>Tableau XII</b> : résultats des caractéristiques physico-chimiques des HEs étudiées.....	49
<b>Tableau XIII</b> : Analyse chromatographique (CPG/SM) de l'HE de Laurus nobilis.....	52
<b>Tableau XIV</b> : Récapitulatif des aromatogrammes des H.E. avec six souches bactériennes pathogènes vis-à-vis des huiles étudiées.....	53
<b>Tableau XV</b> : les valeurs des CMI.....	57
<b>Tableau XVI</b> : Résultats du test sensoriels.....	68
<b>Tableau XVII</b> : résultats des valeurs des EC 50 de huiles étudiées .....	71

# SOMMAIRE

Liste des tableaux  
Liste des figures  
Liste des abréviations  
Résumé

**Introduction générale** ..... 1

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Chapitre I. Monographie des plantes étudiées**

I. Thym ..... 3

I.1. Généralités ..... 3

I.2. Origine et distribution de la plante ..... 3

I.3. Classification botanique ..... 3

I.4. Description morphologique de la plante ..... 4

I.5. Huile essentielle du thym ..... 4

I.6. Principales utilisations du thym ..... 4

II. Origan ..... 5

II.1. Généralités ..... 5

II.2. Origine et distribution de la plante ..... 5

II.3. Classification botanique ..... 5

II.4. Description morphologique de la plante ..... 6

II. Huile essentielle d'origan ..... 6

II.6. Principales utilisations d'origan ..... 6

III. Laurier ..... 7

III.1 Généralités ..... 7

III.2. Origine et distribution d la plante ..... 7

III. 3. Classification botanique ..... 7

III.4. Description morphologique de la plante ..... 8

III.5. Principales utilisations de laurier ..... 8

## **Chapitre II.** Activités biologiques des huiles essentielles

II.1	Activité antioxydante .....	9
II.1.1	Définition d'un antioxydant.....	9
II.1.2.	Types d'antioxydants .....	9
II.1.3.	Toxicité des antioxydants.....	11
II.1.4.	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	11
II.2.	Activité antimicrobienne .....	13
II.2.1	Définition d'un antimicrobien.....	13
II.2.2.	Activité antibactériennes .....	13
II.2.3.	Activité antifongique .....	14
II.3.	Activité antivirale .....	15
II.4.	Activité liée à la composition chimique .....	16
II.5.	Combinaison entre les huiles essentielles .....	16
II.6.	Détermination de l'effet synergique/antagoniste du mélange d'huiles essentielles (Méthode des bandelettes).....	17
II.7.	Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	18
II.7.1.	Aromatogramme.....	18
II.8.	Détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique des huiles essentielles .....	18
<b>Chapitre III.</b>	<b>Application des huiles dans le domaine agroalimentaire .....</b>	<b>19</b>
III.1.	Système de sécurité sanitaire des aliments en Algérie.....	20
III.2.	Intoxications alimentaires.....	21
III.3.	Applications alimentaires des H.Es.....	21
III.3.1.	Essais de l'activité antioxydant dans les aliments .....	21
III.3.2.	Essais de l'activité antimicrobienne dans les aliments .....	22
III.3.3.	Facteurs qui influencent les propriétés antimicrobiennes des H.E. dans les aliments...	23
III.3.4.	Bactéries impliquées dans les toxi-infections alimentaires (TIA).....	23

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Partie I**

1. Matériel.....	25
1.1. Matière végétale.....	25
1.2. Microorganismes utilisés.....	26
1.3. Milieux de cultures .....	27
1.4. Disques de papier filtre stériles (type wattman) Pour la réalisation des aromagrammes...	28
1.5. La viande bovine.....	28
2. Méthodes.....	28
2.1. Procédé d'extraction des huiles essentielles étudiées.....	28
2.1.1. Calcul du rendement.....	29
2.1.2. Caractéristiques des H.E.....	29
2.2. Tests microbiologiques .....	30
2.2.1. Test de confirmation des souches .....	30
2.2.2. Tests de confirmation biochimique.....	31
2.3. Conservation des souches.....	31
2.4. Préparation de l'inoculum .....	32
2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées .....	32
2.5.1. Test <i>in vitro</i> (Méthode de diffusion des disques ou aromagramme).....	32
2.5.2 Nature de l'activateur anti bactérienne .....	34
2.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilutions en milieu solide (NCCLS, 2002).....	35
2.6. Combinaison entre les huiles essentielles .....	36
2.7. Application des huiles essentielles sur la viande bovine .....	37

2.7.1. Préparation de la viande bovine (matrice alimentaire).....	37
2.7.2. Contrôle microbiologique préalable de la viande bovine fraîche.....	37
2.7.3. Optimisation de la CMI appliquée à la viande .....	38
2.7.4. Inoculation de la viande par des souches bactérienne.....	38
2.7.5. Test de l'effet des H.E. sur la conservation de la viande hachée par des analyses Microbiologiques.....	41
2.7.6. Analyses sensorielles .....	43
2.8. PH Métrie.....	43

## **Partie II**

Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées (origan, thym et laurier) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH .....	44
---	----

1. Préparation de la solution DPPH.....	46
2. Préparation des échantillons (Standards et H.E.).....	46
3. Lecture des résultats .....	47
4. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	47
5. Détermination du temps d'équilibre EC 50.....	47

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **Partie I**

1.1. Rendement.....	48
1.2. <i>Caractéristiques organoleptiques</i> des H.E. extraites.....	49
1.3. <i>Caractéristiques physicochimiques</i> .....	49
1.4. Analyse CG/SM des trois plantes .....	50
2. Tests de sensibilité microbienne envers les H.E.....	53

2.1. Spectre d'activité des huiles étudiées vis-à-vis des souches pathogènes .....	55
2.2. Effet de la combinaison des deux huiles essentielles .....	57
2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	57
3. Application des huiles essentielles sur la viande .....	58
3.1. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la viande avant inoculation ....	58
3.2. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la viande après inoculation .....	58
3.3. Synthèse sur l'effet des HE appliquées sur la viande inoculée par les bactéries pathogènes .....	63
4. Résultats des analyses sensorielles de la viande .....	67

## **Partie II**

Test anti-radicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre

II.1. La détermination de la valeur EC50.....	69
II.2. Comparaison des valeurs des EC 50.....	71
II.3. Discussion concernant l'activité antioxydante de nos huiles .....	72

**Conclusion et perspectives**.....75

Références bibliographiques

Annexes

La qualité microbiologique d'un aliment constitue l'une des bases essentielles de son aptitude à satisfaire la sécurité du consommateur. Un aliment, exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ses caractéristiques sensorielles, nutritives et sanitaires (Rosier et *al.*, 1986 ; Guiraut ., 2003 ). Malgré l'amélioration des techniques de conservation des aliments, la nature des conservateurs reste une des questions les plus importantes pour la santé publique (Burt, 2004).

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979 ; Nessrien et Mohamed, 2007).

La Viande qui peut être le siège d'une contamination et d'une prolifération microbienne, car elle constitue un excellent milieu de croissance pour un grand nombre d'espèces bactériennes (Lapie, 1993). Parmi les microorganismes rencontrés dans la viande, on peut citer les bactéries qui peuvent toucher la santé du consommateur en lui causant des toxi-infections alimentaires et celles qui peuvent altérer les caractères organoleptiques de la viande (Koohmaraie., 2005).

En Algérie les maladies d'origine alimentaire qui résultent des viandes contaminées avec des bactéries pathogènes constituent une grande préoccupation pour les pouvoirs publics. Généralement, ce genre de problème touche une population massive. Il est utile de signaler que près de 40% des cas d'intoxication sont dus à l'ingestion de viandes et dérivés impropres à la consommation. Selon une étude de l'OMS (Organisation mondiale de la santé), on compterait quelque 500 décès par an en Algérie dus à des intoxications alimentaires. D'après Moll .1998, différentes stratégies sont appliquées dans le but de contrôler les pathogènes dans la viande, en effet pour faire face aux problèmes d'oxydation et de contamination des denrées alimentaires, l'essor de la chimie a permis l'apparition et l'application de nouvelles substances chimiques en tant que conservateurs alimentaires synthétiques .

Ces derniers ont été employés couramment pour empêcher la détérioration des aliments (Nakahara et al ., 2003). Par la suite, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité (Ho et *al.* ., 2009 ., Chahardehi et *al.*, 2010 ) . De même , la tendance actuelle

des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a inciter la recherche , le développement et l'apparition de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobiennes et antioxydantes dans le but de les utiliser comme alternatives aux conservateurs synthétiques dans le domaine des industries agroalimentaires .Parmi ces substances naturelles figurent des extraits de plantes aromatiques et médicinales .D'ailleurs un intérêt particulier a été manifesté ces dernières années pour les huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales (Demirci et *al.*, 2008)

Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (Wang et *al.*, 2010). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (Rashid et *al.*, 2010). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison , d'une part , de leurs activités anti oxydantes , antibactériennes et antifongique (Dung et *al.* , 2008 ) , d'autre part , la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances **GRAS** , qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires ( Gachkar et *al.*, 2007 ; Rasooli et *al.*, 2008 ).

L'Algérie est connue par a richesse en plante s aromatiques et médicinales, au regard de sa diversité bioclimatique ce qui nous a conduit à nous intéresser à l'inépuisable source de produits naturels à vertu antimicrobien et antioxydant. Les huiles essentielles sont des substances qui occupent une place particulière dans leur utilisation en agroalimentaire (Rota et *al.* , 2008).

Les plantes sur lesquelles a porté notre choix sont 03genres : *Origanum Floribundum*, *Laurus nobilis* et le *Thymus vulgaris* provenant des deux régions de Blida (Chrèa, pour les deux premiers et Bouguara pour le thym).D'ou l'objectif de notre travail est basé sur :

- L'extraction des H.E. citée précédemment par hydro distillation de type Clevenger .
- Etudes de quelques paramètres et indices physicochimiques ;
- L'évaluation « *In vitro* » de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites tout en déterminant les Concentrations minimales inhibitrices (CMI) spécialement sur un ensemble de bactéries pathogènes surtout impliquées dans les toxi-infections alimentaires (TIA).
- L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.
- Application direct des huiles essentielles ayant activité antimicrobienne et antioxydante significative sur une matrice alimentaire qui est la viande fraîche bovine.
- Contrôle microbiologique de la viande étudiée.
- Effet des HE appliquées sur la flore pathogène.
- Optimisation des doses appliquées à la viande fraîche estimées par des analyses sensorielles.

## I. Thym

### I.1 Généralités

#### Historique

C'est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des Lamiaceae (labiales), avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002). Comme beaucoup de labiales elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. localement connu « zaatar ». En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre (thym et thyme respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (Amiot, 2005).

Le nom « *Thymus* » dérive du mot grec « thymos » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariente, 2001). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001).

#### I.2. Origine et distribution de la plante

La plante est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Özcan et Chalchat, 2004 ; Amiot, 2005). Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale (Kitajima et al., 2004).

se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian et al., 2003). Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (Poletti, 1988).

#### I.3. Classification botanique

Synthétisée dans le tableau I (Engler, 1924)

**Tableau I** : Classification botanique du genre thym

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnolipsida
Sous classe	Métachlamydées
Ordre	Tubiflorales

Famille	Lamiacées
Sous famille	Stachyoidea
Genre	<i>thymus</i>

#### I.4. Description morphologique de la plante

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi (Quezel et Santa, 1963)

#### I.5. Huile essentielle du thym

L'HE du thym est extrait principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries.

L'HE du thym est une huile susceptible de présenter de grandes variations, qui sont principalement d'origine génétique et édaphoclimatiques, elle dépend également de la saison de cueillette (stade végétatif). D'après Viaud (1993), les résultats de l'analyse chimique des HE du thym ont permis de définir 07 chémotypes.

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymène (9,1 - 18,5 %), terpinène (6,9 - 18,0%), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib *et al.*, 2002 ; Bouhdid *et al.*, 2006).

#### I.6. Principales utilisations du thym

Le thym possède un large spectre d'utilisation, parmi lesquelles on peut citer :

- Confection de savons, parfums et détergents.
- Considéré comme une herbe médicinale avec une action antispasmodique, fluidifiante réduisant la flatulence.
- Son usage est très reconnu pour soulager les symptômes de la bronchite, inflammation des voies respiratoires, troubles gastro-intestinaux, traiter la stomatite, la laryngite et les blessures cutanées superficielles.
- L'herbe séchée est employée pour donner de la saveur à la viande, conserves et aux sauces.

Le thym produit un miel distinctif qui commence à trouver des marchés de place en Europe et en Asie.



**Fig. 1:** *Thymus vulgaris* (originale 2013)

## **II. Origan**

### **II.1. Généralités**

#### **Historique**

L'origan a toujours joué un rôle important dans nos vies quotidiennes. Elle est employée en médecine traditionnelle et beaucoup d'autres utilisations.

Le nom origan dérive de deux mots grec ; **Oros**: montagne ou colline et **Ganos**: ornement, parce que cette plante préfère une altitude plus élevée dans le climat méditerranéen.

### **II.2. Origine et distribution de la plante**

Plante mellifère vivace, pousse de préférence sur les talus ensoleillés des pays du bassin méditerranéen (Richard, 1992).

Le genre *Origanum* comporte plusieurs espèces aromatiques de la famille des Labiées, il est originaire du Sud Est méditerranéen et d'Asie occidentale (Vokou et al., 1993).

### **II.3. Classification botanique**

Le genre *Origanum* inclut des arbustes nains dicotylédones, des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui se reproduisent dans les secteurs chauds et montagneux.

La classification est synthétisée dans le tableau II (d'Engler, 1924). **Tableau II** : Classification botanique du genre Origan

Règne	Plantes
Embranchement	Plantes vasculaires
Sous - embranchement	Angiospermes
Classe	Magnolipsida
Sous classe	Métachlamydées

Ordre	Tubiflorales
Famille	Lamiacées
Sous famille	Stachyoidea
Genre	<i>Origanum</i>

#### **II.4. Description morphologique de la plante**

L'origan est une plante herbacée ou sous-ligneuse à la base. Haut de 30 à 90 cm, il représente des tiges carrées portant une quarantaine de branches à feuilles vert foncé, petites et ovales. Les inflorescences sont en épis, eux-mêmes réunis en inflorescences composées (Richard, 1992).

Le calice de l'origan est tubuleux à cinq dents courtes, bilabié ou non. La corolle quant à elle est blanche, rosée ou bien violette (Quezel et Santa, 1963).

#### **II.5. Huile essentielle d'origan**

Tous les origans renferment en quantité variable une huile essentielle fortement aromatique (Garland, 1980). En moyenne, on extrait environ 1,8 % d'HE à partir des feuilles et des sommités fleuries. Cependant, la qualité et la quantité de l'huile extraite varient selon la génétique de la plante, le stade végétatif, les procédés d'extraction et surtout les conditions de l'environnement (Padulosi, 1997).

Le carvacrol est généralement le composé majoritaire de l'HE d'origan (35 à 74 %)

(Ultee et al., 1999, Azoudj, 1999), mais dans certains cas le thymol (isomère du carvacrol), l'importe (Ruberto et al., 2002, Chikhoun, 2004, Fadli et Kessi, 2005).

#### **II.6. Principales utilisations de l'origan**

Différentes parties de la plante (feuilles, sommités fleuries huiles essentielles) sont actuellement employées en industrie alimentaire en tant qu'épices. Elle est considérée comme étant l'une des épices les plus répandues dans la région méditerranéenne (Carmoet al., 1989 ; Baser et al., 1992, 1993).

#### **Utilisation en médecine traditionnelle**

L'huile essentielle d'origan possède un effet antiseptique, est légèrement tonique et digestive. Elle provoque la menstruation, apaise les nerfs, soulage les maux de tête et de dents, elle aide aussi à lutter contre les insomnies.

L'origan est aussi un anti-inflammatoire, antispasmodique expectorant, diurétique et sudorifique. C'est un bon stimulant de l'appareil digestif, il est particulièrement utile dans diverses affections des voies respiratoires (Bronchique, trachéo-bronchite) elle calme les toux en favorisant l'expectoration



**Fig.2:** *Origanum floribundum* originale 2013

### **III. Laurier**

#### **III.1. Généralités**

##### **Historique**

*Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante (Pariante, 2001).

Les feuilles sont largement appliquées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antique grec et romain (Demir et al., 2004). Il est intéressant de noter que cette herbe qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en fait, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelles applications (Ferreira et al., 2006).

#### **III.2. Origine et distribution de la plante**

Originaires du bassin méditerranéen, *Laurus nobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment (Iserin, 2001). Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les États-Unis Méridionaux (Demir et al., 2004; Barla et al., 2007).

#### **III.3. Classification botanique**

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Quezel et Santa, 1962) synthétisée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau III** : Classification botanique du genre *Laurus*

Règne	Plantes
Embranchement	Plantes vasculaires
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous classe	dialypetales
Ordre	Laurales
Famille	Lamiacées
Sous famille	Lauracées
Genre	<i>Laurus</i>

#### III.4. Description morphologique de la plante

*Laurusnobilis*, Arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. Les fleurs sont dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité (Iserin, 2001 ; Demir et *al.*, 2004 ; Beloued, 2005 ).

#### III.5.Principales utilisations de Laurier

Le laurier est principalement utilisé pour soigner les troubles de l'appareil digestif supérieur. En outre, il stimule l'appétit et la sécrétion des sucs gastriques. Utilisées comme condiment, les feuilles facilitent la digestion et l'assimilation des aliments..L'huile essentielle est surtout employée pour frictionner les muscles et les articulations douloureuses. Ajoutée à l'eau du bain, la décoction des feuilles apaise les membres douloureux (Larousse, 2000). employée pour le soulagementd'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (Sayyah et al., 2002). En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir et *al.*, 2004 ; Beloued,, 2005 ).



**Fig.3:***Laurusnobilis* originale 2013

### Chapitre III. Application des huiles essentielles dans le domaine agroalimentaire

Les microorganismes ont d'une part un impact important en tant que ferment puisqu'ils participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires fermentés tels que : les produits laitiers ( Yaourt et fromage ), les produits carnés ( saucisson ), les boissons ( cidre , vin , la bière ) , les produits de panification et autres . D'autre part les microorganismes peuvent se multiplier dans les aliments , l'altère , c'est-à-dire lui confèrent des goûts , des odeurs ou des aspects inacceptables . Quelques espèces pathogènes sont responsables de troubles divers , allant de problèmes digestifs bénins à des maladies graves provoquant jusqu'à 30% de décès ou des séquelles invalides ( Afssa, 2006 ).

En effet, les risques inhérents de l'utilisation des produits chimiques de synthèse dans la lutte contre les pathogènes des denrées alimentaires sont manifestes et ces produits chimiques deviennent de plus en plus inefficaces avec le développement de souches résistantes. Ajouté à cela le problème de réfraction dû à l'utilisation abusive des antibiotiques qui ont donné plus de réponse satisfaisante à son utilisateur pour cause d'usages multiples et incontrôlés. Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles (produits naturels) comme alternatives efficaces devient alors une urgence. Puisqu'ils sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes , antimicrobiennes et antioxydante. La tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces H.E. Cependant, c'est seulement récemment que beaucoup d'attention a été donnée à leur application potentielle comme conservateurs dans le domaine agroalimentaire (Palmer, 1998).

Actuellement, les H.E. et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires, pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire, Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants . d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "*généralement reconnus comme sains*: Generally Recognized As Safe (GRAS) " ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration Américaine (FDA). Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais des études préalables sont nécessaires pour mieux cerner leur activités sans pour autant être toxique pour l'homme (Caillet&Lacroix, 2007).

L'évaluation des propriétés biologiques des H.E. demeure très importante pour les exploiter dans l'industrie agroalimentaire comme étant des conservateurs naturels (Guesmi et Boudabous, 2006).

La plupart des publications ont confirmé la possibilité d'employer les huiles essentielles dans les aliments pour prolonger la durée de conservation des aliments (Bagamboula et al., 2004 ; Ghasemi et al., 2010).

### **III.1. Système de sécurité sanitaire des aliments en Algérie**

La vente de viandes fraîches exposées en carcasse entières et parfois coupées en quartiers sur la voie publique dans différentes régions de l'Algérie à des températures abusives et parfois même de viandes issues d'un abattage clandestin constitue une importante source de nourriture pour une grande population Algérienne et les vendeurs n'ont souvent aucune formation spécifique aux risques qui peuvent découler de ces pratiques.

En Algérie pour faire face à la forte incidence des maladies transmises par les aliments, des systèmes de bonnes pratiques de fabrication, d'hygiène (BPF et BPH) et d'assurance qualité comme analyse des dangers, des points critiques pour leur maîtrise (ADPCM), ont été introduits dans le secteur de la production alimentaire et de la restauration, mais leur mise en application est généralement limitée voire même inexistante.

Notre pays doit poursuivre ses efforts pour la sécurité sanitaire des aliments soit solidement inscrite dans ses programmes nationaux de santé publique. La mise en place de système intégré de contrôle des aliments et de surveillance des maladies d'origine alimentaire, requiert une collaboration et une coordination efficaces avec l'ensemble des parties prenantes dans les secteurs de la santé, de l'agriculture et du commerce.

Les Algériens consomment de plus en plus la viande et sous différentes formes, car certaines coutumes régionale ou locales, comme la consommation des viandes sous forme de : Steak (méchoui) ou hachées (Hambourgers, Mergez, boulettes, etc.), et certaines techniques de préparation spécifiques, telles que les opérations de hachage et de conservation multiplient les risques de contamination microbiologiques. Ce qui souligne les problèmes de sécurité sanitaire des aliments et renforce la crainte du public.

La qualité de la viande est d'une importance vitale sur le marché, mais les conditions hygiéniques de sa préparation et manipulation ainsi que celles de sa conservation sont peu respectées. De plus l'arrivée de la saison estivale est généralement à l'origine de plusieurs cas d'intoxication alimentaires dues essentiellement à la consommation de produits avariés, devenus impropres, pour le non respect de la chaîne de froid ou défaut d'hygiène notamment quand il s'agit de restauration publique.

### **III.2.Intoxications alimentaires**

L'Algérie quant à elle compte chaque année entre 3 000 et 5 000 cas d'intoxication collective déclarés, a indiqué le Dr Hadj LakhelBelkacem de l'Institut national de la santé publique (INSP) en 2009. Ce médecin nutritionniste a relevé que “même si les intoxications alimentaires collectives font partie des maladies à déclaration obligatoire, beaucoup de cas échappent aux statistiques et ne sont pas déclarés”. Il a souligné à ce sujet qu'en général, les intoxications collectives enregistrées sont des “infections qui ne mettent pas en péril la vie des intoxiqués (dans 99% de cas)”.

« Les personnes particulièrement touchées sont “les plus fragiles et vulnérables”, à savoir les plus jeunes, les personnes âgées et les femmes enceintes. Le médecin a expliqué en outre que les intoxications collectives ont lieu souvent lors de fêtes de mariages, de périodes de pèlerinage et des “zerda”, où il est enregistré un manque de précautions sur le plan hygiène. (Anonyme, 2009 c).

### **III.3.Applications alimentaires des H.Es**

Plusieurs huiles essentielles, ont en laboratoire, une activité antimicrobienne avérée. Mais avant leur adoption en tant que agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier les résultats expérimentaux dans l'aliment sélectionné .En général les résultats expérimentaux obtenus en milieu modèle se confirment sur les aliments, mais avec des concentrations d'huiles essentielles un peu plus élevée. Les études faites à travers le monde, montrent que les H.E.peuvent être ajoutée à peu près à tous les aliments.

L'emploi d' H.E. lors de la transformation des aliments peut présenter un **triple** intérêt : aromatisant, antioxydant et antimicrobien (Caillet et Lacroix, 2007).

#### **III.3.1.Essais de l'activité antioxydant dans les aliments**

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (Hussain *et al.*, 2008, 2010). Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (Hussain, 2009).

Des études de l'équipe RESALA de l'INRS – IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments ou l'application par vaporisation en surface

de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits, et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

Récemment, une autre étude a été réalisée pour essayer la formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus lemon*, en vue de les exploiter et de les substituer à un additif synthétique : le Tocobland.

L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus lemon* étaient plus résistantes que celle de tocobland vis-à-vis de l'oxydation forcée (Himed, 2011).

### **III.3.2. Essais de l'activité antimicrobienne dans les aliments**

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles ont été employées pendant des milléniums pour fournir des saveurs caractéristiques pour les aliments et les boissons (Baydar et al., 2004). Leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient donc empêcher la croissance des microorganismes d'altération et pathogènes, améliorant de ce fait la sécurité alimentaire (Sacchetti et al., 2005 ; Hadizadeh et al., 2009 ; Piyo et al., 2009 ; Udomsilp et al., 2009 ; Souza et al., 2009).

Les H.E. d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes ; l'H.E. de menthe pour les produits frais (salades, yaourt...); les H.E. à base de carvacrol ou de citral pour les poissons ; les H.E. de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz) ; et les H.E. à base de carvacrole ou de cinnamaldehyde pour les fruits. (Caillet et Lacroix, 2007).

L'incorporation des H.E. directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourt...) ou l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à contrôler la flore microbienne et à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation des gras au-delà de sa durée normale d'entreposage (Caillet et Lacroix, 2007). Il a été démontré que l'utilisation des H.E. pouvait augmenter la sensibilité des bactéries à différents procédés de conservation des aliments (chauffage, pasteurisation, atmosphère modifiée). Selon la bactérie et le procédé utilisé, la sensibilisation augmente de 2 à 10 fois. Par exemple, l'H.E. mélangée à des carottes hachées emballées sous air ou sous atmosphère modifiée (AM ou

MAP : Modified Atmospheres Packaging ) permet de multiplier par trois la sensibilité de *Listeria sp.*,

De même que pour de la viande hachée emballée sous les mêmes conditions, une augmentation très significative de la sensibilité d'*E.coli*(2.5fois) et de salmonelle (4.5 fois)est constatée en présence d'H.E. Aussi l'H.E. combinée à un chauffage doux (55° C pendant 1 minute ) a permis d'inhiber totalement Salmonelle , alors qu'en absence d'huile un chauffage de plus d'une heure était nécessaire pour arriver au même résultat.

Plusieurs huiles essentielles des plantes aromatiques ont totalement empêcher le développement fongique sur les grains de maïs (Montes-Belmont et Convajal , 1998) et sur des grains de riz ( Piyo et al., 2009 ).

Par ailleurs un exemple vivant sur l'application des huiles essentielles de la lavande comme conservateur antifongique des légumes secsà été démontré par les travaux de Laib.(2011).

### **III.3.3.Facteurs qui influencent les propriétés antimicrobiennes des H.E. dans les aliments**

Selon les aliments, certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des huiles essentielles. Il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduite. Il est également prouvé qu'une même huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou protéines. Les fortes teneurs en eau et en sels d'un aliment vont aussi favoriser l'action de l'huile essentielle, alors qu'une structure gélatineuse va au contraire la limiter (Caillet et Lacroix, 2007).

### **III.3.4.Bactéries impliquées dans les toxi-infections alimentaires (TIA)**

Ces dernières année les problèmes liés aux bactéries responsables de toxi-infection alimentaires se sont considérablement amplifiés par l'apparition de germes résistant à une série d'antimicrobiens et menacent d'entraîner un grave problème de santé publique. Il a été estimé qu'environ 30 % de personnes dans les pays industrialisés souffrent de maladies

transmises par les aliments .Chaque année, des millions de cas sont signalés partout dans le monde (Nedorostovaet *al.*, 2009).

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'homme via les denrées alimentaires .Ces bactéries sont regroupées en bactéries d'intoxication alimentaire et celles qui peuvent entraîner une infection alimentaire.

- **Intoxication alimentaire** : les bactéries pathogènes se multiplient dans l'aliment et produisent des toxines .Une intoxication alimentaire est caractérisée par l'apparition rapide de la maladie (nausées et vomissements), et que les toxines sont déjà préformées dans les aliments avant ingestion.
- **Infection alimentaire** : l'aliment agit comme support pour les microorganismes pathogènes l'agent infectieux peut ou non se multiplier dans l'aliment, mais les bactéries ingérées viables continuent à croître dans l'hôte et provoque le symptôme

De la maladie (fièvre, diarrhée).La dose infectante minimale (MDI) varie considérablement entre les espèces bactériennes.

Les bactéries impliquées dans les TIA sont représentées en annexe.

## Chapitre II. Activités biologiques des huiles essentielles

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques. C'est ainsi, que les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (bouhdid et *al.*, 2006) . On attribue un certain nombre d'activités biologiques susceptibles de trouver des applications en agroalimentaire (Alitonou et *al.*, 2008 ).

### II.1. Activité antioxydante

Ces derniers temps, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques conservateurs utilisés en industrie alimentaire. En effet , la peroxydation des lipides produite au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'effet des radicaux libre oxygénés ( RLO ) conduit à des modifications de goût , d'odeur et de la couleur et parfois constituent un risque pour la santé du consommateur et , par conséquent la perte de la qualité et de la sécurité des aliments ( Mau et *al.* , 2004 ).

La lutte contre l'oxydation des lipides représente donc un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables :

- ✓ tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation
- ✓ et / ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation. C'est le rôle d'un antioxydant (Moll, 1998 ; Jeantet et *al.*, 2006).

#### II.1.1. Définition d'un antioxydant

Une substance qui, à de faibles concentrations comparées à celles des substances oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation (Beirão & Bernardo – Gil, 2006).

Selon la définition générique, les antioxydants sont des substances qui, a faible concentration, sont capables d'inhiber ou de retarder de manière significative les oxydations des molécules.

## II.1.2. Types d'antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leurs origines en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

### ❖ Antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants de synthèse de l'industrie alimentaire on peut citer : le butylhydroxyanisol(BHA), le butylehydroxytoluène(BHT) le tert-butylhydroquinone(TBHQ). Leur plus grand avantage est lié à leur cout très bas d'une part, leur propriétés chimiques et technologiques bien étudiées, qui satisfait dans la plupart des cas la demande des producteurs (Petkov et *al.*, 1984 ) d'autre part. En revanche, sont suspectés avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur (Namiki, 1990), car le BHA et le BHT ont été avérés cancérogènes (Nesserine and Mohamed, 2007 ; Olivero Verbal et *al.*, 2010 ) . Le TBHQ à été interdit au japon, au Canada et en Europe. De même le BHA à été égalementéliminé de la liste des composés GRAS (Rashid et *al.*, 2010 ). Par conséquent, il ya grand intérêt mondial pour la recherche de nouvelles sources d'antioxydants,naturels et sures (Kulevanova&Panovska 2001 ; cadefieChenets et *al.*, 2003 ;Bouhdid et *al.* , 2006 ;Panaphile et *al.* , 2009 ; Raza et *al.* ;Dongmo et *al.*, 2010).

### ❖ Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo. Elles incluent le beta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polymères, les flavonoïdes l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres ( Svoboda et Ampson, 1999 ;Mohammedi, 2006).

### ❖ Antioxydants synergistes

Ce sont des substances qui ne sont guère en tant actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence d'autres antioxydants. IL en est ainsi des lécithine des acides citrique et tartrique, des acides aminés (lysine et arginine), de certains flavonoïdes, leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer et le cuivre qui ont un effet pro-oxydant à faibles doses .Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des

antioxydants, comme les tocophérol ou les dérivés de l'acide ascorbique de leurs formes oxydées ( Morelle , 1988 ).

#### ❖ Antioxydants primaires

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidique (  $L^\circ$  ,  $LOO^\circ$  ,  $LO^\circ$  ) en produits plus stables (  $LH$  ,  $LOOH$  ,  $LOH$  ) grâce à leur propriété de donneur de protons actifs . Le radical ( $A^\circ$ )Dérivé de l'antioxydant se converti en produit stable (Kim et Lee., 2004).

#### ❖ Antioxydants secondaires

Selon Gordon (1990), les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différent modes d'action :

- ✓ Absorption des radiations ultraviolettes ;
- ✓ Inactivation de l'oxygène singlet ;
- ✓ Chélation des métaux
- ✓ Décomposition des hydro peroxydent.

### II.1.3. Toxicité des antioxydants

L'ajout de vitamine E peut également poser des problèmes si on n'a pas prévu un emballage qui prévient l'oxydation par la lumière. De plus la surconsommation d'antioxydants peut entrainer une déficience des systèmes naturels et protection de l'organisme (systèmeimmunitaire)et cela peut nuire la santé en altérant de nombreuses fonctions vitales. Certains antioxydants sont responsables aussi à des réactions allergiques, des hypersensibilités, des troubles digestifs, etc. (Roberfroid, 2002).

Selon Alais et *al.*( 2003 ) , les produits de synthèse ont été beaucoup étudiés sur le plan de la toxicologie chez l'animal . Des résultats varient avec les espèces ont été donnés : effet sur les poumons, le foie, la thyroïde, la coagulation sanguine ou l'action cancérigène. On ne peut les extrapoler à l'homme, mais on est porté à réduire leur emploi dans l'alimentation humaine.

### II.1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisés pour évaluer l'activité antioxydant des huiles essentielles sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la

décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2 diphényl-1-picryl-hydrazyl (**DPPH**), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, de la chélation des métaux et de blanchiment du  $\beta$  carotène dans l'acide linoléique.

- **Test DPPH (1,1Diphényl-2- Picryhydrozyl )**

Le DPPH est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Pour cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm. La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité.

- **Evaluation sensorielle**

Les mauvaises odeurs traduisent les altérations biochimiques d'un produit et sont souvent de très bons indicateurs d'altération. L'évaluation sensorielle est souvent considérée comme une bonne méthode d'évaluation d'oxydation des produits. En général une évaluation du niveau d'oxydation se traduit par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit, de nouvelles notes odorantes apparaissent parmi lesquelles les odeurs qualifiées de rance.

L'analyse sensorielle permet de détecter et d'identifier les odeurs résultantes de la dégradation lipidiques difficilement mesurables par les méthodes chimiques.

Cependant, ce type d'analyse nécessite de constituer un jury d'évaluateurs sensoriels entraînés capable de qualifier et de quantifier les odeurs et goûts perçues ( Hsieh & Kinsella, 1989).

L'analyse sensorielle permet de détecter et d'identifier des odeurs résultant de dégradations lipidiques difficilement mesurables par des méthodes chimiques (Frankel, 1998).

**II.2. Activité antimicrobienne des HEs :** De nombreux auteurs ont reporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (

Donranteset *al.*, 2004, Bousbia , 2004). Les constituants des H.E. sont actifs sur une large gamme debactéries, levures et champignons.

### **II.2.1.Définition d'un antimicrobien**

Un aliment exposé à la détérioration par les bactéries et les moisissures peut voir diminuer ces caractéristiques sensorielles, nutritive et sanitaire (Rozier et *al.*, 1986 ; Guiraut , 2003).Pour faire face, l'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces derniers sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques (CE, 2001).

Ces substances synthétiques ont été employés couramment .Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile (Rozman&Jarsek, 2009).Les huiles essentielles sont connus pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants ( Gachkar et *al.* , 2007 ; Rasooli et *al.*, 2008).

### **II.2.2.Activité antibactérienne**

Les huiles essentielles les plus étudiés pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : Origan, thym, sauge, romarin, clous de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à H.E.riches en composées phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons ; friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires.

Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactérie : *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (Pauli, 2001).

Belleti et al. (2004) et Fisher et al. (2007), ont démontré que les H.E. de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes mais aussi les bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium*, *thyphimurium* et *Acrobacterbutzleri*.

- **Notion de Bactéricide et bactériostatique**

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effet des HE sur les microorganismes : une activité létale ( bactéricide et fongicide ) ( CARSON et RILEY , 1995) et une inhibition de la croissance ( bactériostatique ) ( Freeman et Carel , 2006 ).

- **Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries**

D'après Caillet et ses collaborateurs (2007) l'action antimicrobienne des H.E. se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l' H.E. provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

### **II.2.3. Activité antifongique**

Freeman et Carel (2006), ont signalé que les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces, mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Expérimentalement, les HE des plantes aromatiques parfois même supérieur a celle des agents antifongiques commerciaux.

L'huile essentielle de la Menthe pouliot ( *Menthapulegium* ) dont le composé majoritaire est la R (+) pulegone ( 82 % ) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* (Belghazi et al., 2002 ).

Une étude à évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle des clous de girofle sur toute une variété de champignons pathogènes, incluant ceux responsables d'infections urogénitales (Ahmad et al., 2005 ). Selon Chami (2005), l'huile essentielle des clous de

girofle a démontré une puissante activité antifongique contre des champignons opportunistes tels que *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus*.

- **Mode d'action des huiles essentielles sur les champignons**

Une étude a porté sur les effets antifongiques de l'HE de thym (Rasooli et al., 2006) et plus particulièrement sur les conséquences de cette huile sur l'ultra structure du champignon *Aspergillus Niger* était exposé à l'H.E., celle-ci provoquait des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire ainsi que sur les organites du champignon (Berral et al., 2007). Alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Cailletet Lacroix, 2007).

- **Mode d'action des huiles essentielles sur les levures**

L'action fongicide des H.E des clous de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae* absorbent à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les H.E. d'origan et de clous de girofle était significativement endommagée (Chami, 2005).

Giordaniet Kaloustian (2006) ont souligné que les composés terpéniques des H.E et plus précisément leurs groupement fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissant avec les enzymes membranaires et dégradant la membrane plasmique entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox, 2000).

### **II.3. Activité antivirale**

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des H.E. telles que les monoterpénols et les monoterpénales. (Freeman et Carel, 2006).

Selon les travaux d'Inouye et Abe (2007), il existe des H.Es., des plantes exotiques très puissantes qui sont connus pour leur efficacité. De nombreuses pathologies virales s'avèrent traitées avec les H.Es ont montrées des améliorations importantes. L'effet antivirale de l' H.E de *Menthapiperita* a été étudié in vitro contre les virus de *Herpès simplex* (HSV-1 et HSV-2) une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0.002% et 0.008% (Shuhmacher & Reichling, 2003).

- **Mode d'action des huiles essentielles sur les virus**

Les H.Es sont sélectivement absorbés et perturbent les fonctions des membranes biologiques de la cellule, sur la mitochondrie et autres organites vitales pour tous les organismes hormis les virus (les H.E ne sont actives que sur les virus à été enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine).

#### **II.4.Activité liée à la composition chimique**

L'efficacité d'une huile essentielle dépend de sa richesse en composés photochimiques, plus l'H.E est riche en substances actives, plus son activité est importante L'activité biologique d'une H.E est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools,phénols, les composés terpéniques et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des H.Es et semblent agir en synergie avec les composés principaux (Zhiri, 2006).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et , à large spectre sont des phenols (thymol , carvacrol , eugénol ) , les alcools (  $\alpha$  – terpinéol , terpinen -4-ol, linalol ) , les aldéhydes , les cétones et rarement les terpènes ( Dorman&Deans , 2000).

#### **II.5.Combinaison entre les huiles essentielles**

Dans le but d'augmenter la durée de conservation des différents types d' aliments , par exemples l'usage simultané de plusieurs facteurs de conservation sous forme de systèmes combinés pourrait être utile pour potentialisé l'efficacité de chaque facteur individuel .La notion de synergie entre les systèmes antioxydants et antimicrobiens est aussi une alternative intéressante .Voire même un procédé incontournable pour mieux sécuriser les produits vis-à-vis des germes pathogènes et , contre les phénomènes d'oxydation lipidique ( Ayeroet *al .* , 2004 ).

Certaines études ont montré que l'activité biologique des H.E est supérieur à celle de ses composés majoritaires testés séparément .Les composés purs, le thymol et le carvacrol ont un net effet synergique, ce qui expliquerait les différences activités des chémotypes de thyms. (Lahlou, 2004).Les interactions possibles, entre plusieurs huiles essentielles lors de leur mélange sont au nombre de 4 selon (Pibiri, 2006 ; Degryse et *al.*, 2008):

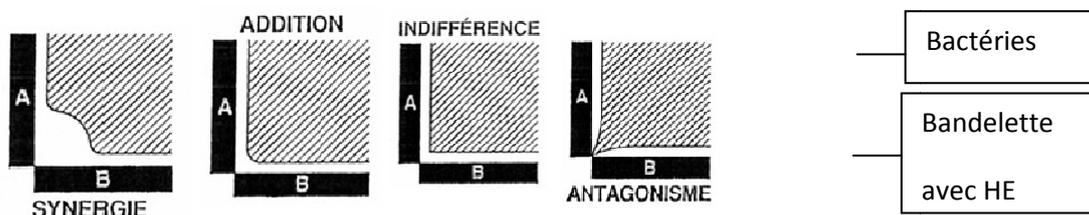
Les effets antimicrobiens des associations d'HE., comme pour les associations d'antibiotiques, sont définis selon quatre interactions possibles :

- **L'indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- **L'addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **La synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- **L'antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

Dans une étude réalisée par PIBIRI (2005), Il a été observé que des associations d'H.E. de cannelle et de thym sont synergiques vis-à-vis de *S. aureus*, elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus* ; par contre sur *P. aeruginosa* et *E. Coli* de telles associations ne sont plus efficaces. En revanche la cannelle testée individuellement est plus active que celle du thym, contrairement au cas de présence de bactéries Gram +.

## II.6.Détermination de l'effet synergique/antagoniste du mélange d'huiles essentielles (Méthode des bandelettes)

Deux bandelettes de papier imprégnées d'HE sont disposées à angle droit à la surface de la gélose préalablementensemencée par la bactérie à étudier, puis on observe l'angle formé par la rencontre des deux zones d'inhibition (Cattoir, 2006).



A : huile essentielle A ; B : huile essentielle B (CATTOIR, 2006)

**Fig. 4** : Représentation schématique de la méthode des

L'effet additif s'observe par une légère augmentation de la surface d'inhibition au niveau de l'angle (rencontre des deux HE). L'effet de l'HE « A » s'ajoute à l'effet de l'HE « B ».

L'effet synergique se manifeste par une augmentation plus importante de la surface d'inhibition au niveau de l'angle. L'effet obtenu est supérieur à l'addition des effets des deux HE.

L'indifférence est observée lorsque les deux HE n'ont aucune influence l'une sur l'autre. La zone d'inhibition qui se crée prend la forme de l'angle droit.

Enfin, l'effet antagoniste fait que la surface d'inhibition au niveau de l'angle diminue, car l'effet du mélange des deux HE est inférieur à celui des HE appliquées séparément.

## **II.7.Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

La technique de détermination du pouvoir antimicrobien des H.E. a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des H.E dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et , des problèmes de standardisation des méthodes ( Bousbia, 2004 ).

### **II.7.1.Aromatogramme**

L'aromatogramme ou méthode de Vincent (Bekhechiet *al.*, 2008) est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles sur la croissance des micro-organismes, par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle. Une suspension de chaque germe est préparée en eau distillée stérile et ajustée à  $10^8$  bactéries/ml. Chaque suspension est étalée sur une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. La surface des boîtes est séchée sous hotte à flux laminaire avec le couvercle des boîtes légèrement ouvert. Des disques de papier buvard stériles de 6 mm de diamètre sont ensuite déposés sur les géloses (un disque par boîte). Ils sont imprégnés d'huile essentielle. La lecture des diamètres d'inhibition D se fait après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37 °C. DE BILLERBECK (2007) exprime les résultats selon trois niveaux d'activité :

- Résistant ( $D < 6$  mm),
- Intermédiaire ( $6 \text{ mm} < D < 13$  mm)
- Sensible ( $D > 13$  mm).

## **II.8.Détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique des huiles essentielles**

Il est possible de déterminer si l'effet d'une HE est bactéricide ou bactériostatique en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées sur les aromagrammes (ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur un milieu nutritif), puis d'incuber les milieux ensemencés pendant 24 à 48H à une température idéale pour la souche recherchée et d'observer les résultats :

- S'il y a croissance bactérienne, l'HE a un effet bactériostatique sur la souche
- Si au contraire il y a absence de croissance bactérienne, l'HE montre des propriétés bactéricides vis-à-vis de cette souche (Haddouchi et *al.*, 2009).

Ce travail de recherche a été réalisé pendant une période de 06 mois. Il est subdivisé en trois parties principales : extraction des H.E ; évaluation de leur activité antibactérienne *in vitro* (aromatogramme, CMI...); activité antioxydante, et enfin application pratique sur des viandes inoculées avec des bactéries pathogènes principalement ceux, impliqués dans les TIA.

Ce travail a été mené grâce à la contribution des laboratoires suivants:

- laboratoire de chimie industrielle d'USDB université de Blida.
- Laboratoire de recherche de l'enseignement supérieur (E.N.S de kouba).
- Laboratoire de contrôle de qualité de VENUS SAPECO de OULED YAICH.
- Laboratoire de la police scientifique du château neuf.

## 1. Matériels

### 1.1. Matière végétale

Les huiles essentielles étudiées sont extraites à partir des feuilles sèches des plantes médicinales et aromatiques (Laurier, Origan et thym), provenant des différentes régions d'Algérie.

- **Choix des plantes étudiées**

Un certain nombre de critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes utilisées dans cette étude:

- ✓ Des ressources naturelles à exploiter, ces plantes sont ainsi parmi les plus populaires des aromatiques utilisées dans le monde entier, leur utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle surtout concernant leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement ;

- ✓ Acôté du fait que leurs huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique;

- ✓ Elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant. Car elles sont connues par leurs effets antibactériens, antifongiques, et antioxydants puissants.

Les critères que nous venons d'évoquer ayant permis d'établir une liste préliminaire de plantes potentiellement intéressantes pour une éventuelle étude sur l'activité biologique à savoir : antimicrobienne et antioxydante.

Des parties aériennes (feuilles fraîches) de laurier, d'origan, et du thym ont été collectées dans les régions de Blida, exactement Chéra pour les deux premiers, et Bougerapour le thym pendant la période allant du mois de Mai au mois de juillet 2013. Après récolte, ces trois espèces végétales ont été transportées vers les laboratoires de recherche d'enseignement supérieur (E.N.S de Kouba). Les feuilles fraîches appartenant à ces trois espèces ont été intensément nettoyées avec de l'eau distillée à 20 °C, égouttées à l'aide d'un tamis puis séchées à l'air libre et conservées pendant 3 jours à une température ambiante tout en étalant les feuilles sur du papier propre. Devenues sèches, les feuilles sont récupérées dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle.

**Tableau IV :**Présentation des plantes employées pour l'extraction des H.E.

NOM BOTANIQUE	NOM COMMUN	FAMILLE
<i>Origanum folribundum</i>	Origan	Labiées
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym	Labiées
<i>Laurus nobilis</i>	Laurier	Lauracée

## 1.2. Microorganismes utilisés

Le choix des bactéries à été porté sur des souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de toxi-infection alimentaires (TIA), ainsi que leurs fréquences à contaminer les denrées alimentaires et particulièrement les viandes et les produits carnés, ce qui constitue un problème majeur de la santé publique.

Ces souches ont ainsi une résistance naturelle à divers types d'agents antimicrobiens. (*S. aureus* est souvent retenu comme bactérie-test dans les normes d'évaluation de l'activité des antiseptiques et désinfectants (Afssa, 2003).

Deux groupes de bactérie à été sélectionné :

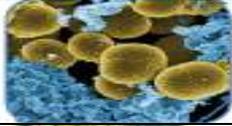
❖ Des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli*, *pseudomonasaeruginosa* et *Salmonella entiritidis*

❖ Des bactéries à Gram Positif : *Satphylococcus aureus*.

Les souches de *Escherichia coli*, *pseudomonasaeruginosa* sont des souches hospitalière ont été fournies par le laboratoire d'analyse médicales de OuldRouiss de Blida. Pour les souches

d'origine alimentaire (*salmonellasp* et *Satphylococcus aureus*) sont fournies de l'IPA, toutes procurés dans des milieux de conservation.

**Tableau V** :Liste et caractéristiques des microorganismes testées

Souche	Famille	Allure microscopique
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Micrococcaceae</i>	
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853)	<i>Pseudomonasaceae</i>	
<i>Salmonella entiridis</i>		

### 1.3. Milieux de cultures

Suivant les méthodes employées et selon les souches, nous avons principalement utilisé comme milieux de culture suivant :

- ✓ Gélose Nutritive, Gélose Mueller Hinton(MH) et Gélose de conservation.
- ✓ Milieux sélectifs : gélose de Chapman, gélose Hecktoen, et gélose SS.
- ✓ Milieu King A, King B.
- ✓ Milieu liquide BHIB,
- ✓ eau physiologique, eau peptonée tamponné(EPT) et des émulsifiants tel que Tween 80...

Les milieux ont été approvisionnés chez un fournisseur français ayant un représentant en Algérie : *Biomerieux*, comme les géloses, d'autres sont fabriquées au laboratoire de Microbiologie de la société VENUS - SAPECO (TSE, EPT, eau physiologique).La composition des milieux est décrite dans l'annexe.

#### 1.4. Disques de papier filtre stériles (typewattman) Pour la réalisation des aromagrammes.

#### 1.5. La viande bovine

Afin d'évaluer l'effet antibactérien et antioxydant de nos H.Es, nous avons choisi la viande bovine comme matrice alimentaire, vue aussi que c'est un aliment qui est beaucoup consommé sous différentes formes (Hamburgers, Merguez, boulettes, Steak ...etc.), cette matrice est très vulnérable aux altérations microbiennes et aux phénomènes d'oxydation lipidique, donc par conséquent une diminution des qualités nutritionnelles et organoleptiques à savoir une altération de la flaveur et de la couleur de la viande ( formation du limon ,apparition de taches colorées sur la viande , modification de la couleur , le rancissement , surcissement et la putréfaction, sans oublier les produits de l'oxydation qui peuvent avoir des effet délétères sur la santé du consommateur ). Agnet. (2011).

### 2. Méthodes

#### 2.1. Extraction des huiles essentielles étudiées

Les H.E sont extraites par la méthode d'hydro distillation type Clevenger1928(Laurier et Thym et l'origan).100g de broyat de chaque planteest introduit dans un ballon a 2L imprégné d'eau distillé .L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 h. Les vapeurs chargées de substances volatils traverse le réfrigérant se condensent puis elles sont récupérées .L'eau et l'H.E. se séparent par différence de densité.

Les H.E.s extraites sont conservées à une température de l'ordre de 4°C dans des flacons en verre opaque, fermés hermétiquement, à l'abri de la lumière, l'air et les variations de températures qui sont facteurs de dégradation d'une huile, qui, en cas d'altération perd son activité biologique



**Fig.6** : dispositifs de l'hydrodistillation type Clevenger. (Photo originale, 2013).

### 2.1.1. Calcul du rendement

C'est le rapport entre le poids de l' H.E. extraite et le poids de la biomasse végétale utilisée, le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$Rdt (\%) = (M_{HE} / M_{MV}) \times 100$$

Avec : Rdt : rendement d'extraction;  
 $M_{HE}$ : masse de l'huile essentielle  
 $M_{MV}$  : masse de la matière végétale.

**Remarque :** Il est à noter que dans notre cas d'étude on s'est pas trop focaliser sur le rendement des H.E. étudiées car notre objectif est de mettre en évidence leur propriétés biologiques et leur application en tant que conservateurs naturels, puisque des études préalables et beaucoup de travaux ont déjà calculé le rendement des H.E. précitées.

### 2.1.2. Caractéristiques des H.E

La caractérisation d'une huile essentielles consiste à :

- Contrôle des paramètres organoleptiques (Aspect, couleur et odeur).
- Déterminer les indices physiques (Densité et indice de réfraction).
- Analyse quantitative sous un profil chromatographique, relative aux différents constituants (réalisées au niveau des laboratoires de la police scientifique).

#### A. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles utilisées ont été notées. (Aspect, couleur et odeur)

#### B. Caractéristiques physiques

##### ➤ Mesure de l'indice de réfraction (Selon la norme NF T 74-112)

L'indice de réfraction d'une HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans HE maintenue à une température constante. La détermination de l'indice de réfraction est déterminée par la formule :

$$I_{20} = I_t + 0.00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

$I_{20}$  = Indice à 20°C  
 $I_t$  = Indice à température ambiante ou de mesure  
 $T$  = température ambiante.

**Mode opératoire :**

Placer le produit à l'aide d'une pipette pasteur dans la cellule de mesure jusqu'au trait signal, refermer le couvercle. Au bout de 15 secondes (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C). Observer par l'oculaire, et régler avec les deux boutons, jusqu'à la localisation du trait signal au centre de la cellule, une ligne de séparation entre la partie claire et la partie sombre apparaît dans le champ de vision. (Pharmacopée, 1997).

L'ajustement du refractomètre se fait à l'aide d'un étalon de qualité l'eau distillée généralement ( $d = 1.333$ ).

➤ **Mesure de la densité relative à 20 °C (Selon la norme NF T 74-111)**

La densité relative de l'H.E. est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20 °C et la masse égale de volume de l'eau distillée à 20°C. Cette grandeur sans dimension et sans symbole est  $d_{20}$ . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume 5 ml à température de 20 °C.

**C. Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CG/SM**

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés.

**2.2. Tests microbiologiques**

**2.2.1. Test de confirmation des souches**

• **Coloration de Gram (voir annexe)**

**Tableau VI :** Coloration de Gram et morphologie des souches bactériennes utilisées.

Souches	Milieu de culture	Gram	Morphologie microscopique
<i>S. aureus</i>	Gélose Chapman	+	Coccus en grappes de raisin
<i>E. coli</i>	Gélose Hecktoen	-	Bacilles
<i>PS. aeruginosa</i>	Milieu gélosé King A et King B	-	Bacilles
<i>Salmonella sp</i>	Gélose SS	-	Bacilles

### 2.2.2. Tests de confirmation biochimique

Des tests biochimiques ont été réalisés pour la confirmation des souches utilisées (Tableau III).

➤ **Confirmation de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa***

C'est la seule à produire le Pycocianine et le pyoverdine, les autres espèces ne produisent que la pyoverdine. La pycocianine est favorisée sur milieu King A, en donnant une couleur bleu-verte, La pyoverdine est de couleur jaune – verte fluorescente se' manifeste sur le milieu de King.

- **Teste d'oxydase**(voirannexe)

➤ **Confirmation de l'espèce *Staphylococcus aureus*** (voir annexe)

- **Test de la catalase**
- **Test de la coagulase**

**Tableau VII** : Caractères biochimiques recherchés

Souches	Catalase	Coagulase	Oxydase	Pigment
<i>S. aureus</i>	Positive	Positive	NR	NR
<i>E. coli</i>	NR	NR	Négative	NR
<i>Ps.aeruginosa</i>	NR	NR	Positive	Pyoverdine - Pycocianine
<i>Salmonella sp</i>	NR	NR	Négative	NR

NR : non recherché

**2.3. Conservation des souches :** La conservation des souches s'effectue, en faisant des repiquages par pique centrale dans des tubes de gélose de conservation ou tubes inclinés, incubés à leur tour a 37 °C Pendant 24 heures.

Les tubes sont ensuite conservés dans le réfrigérateur à 6 +/- 1°C. Des repiquages sont réalisés tous les 15 jours dans le but de garder toujours la disponibilité.

## 2.4. Préparation de l'inoculum

### ✓ Préparation de pré-cultures

Avant la réalisation des tests antibactériens, des repiquages sont effectués pour chaque souche, un repiquage est effectué sur milieu solide (gélose nutritive) la veille de la réalisation du test antibactérien. L'ensemble a été incubé à 37+/-1 °C pendant 18 h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance.

### ✓ Préparation des suspensions bactériennes

À partir de cette culture bactérienne fraîche et jeune, on prélève 3 à 4 colonies que l'on mélange avec 05 ml l'eau physiologique stérile(EPS). Pour la standardisation de la charge de l'inoculum de départ, la méthode de comparaison de la densité bactérienne à celle d'un tube de référence (0,5) Mc Farland (mesurée à l'aide d'un densitomètre) dont la charge est supposée être  $10^6$  à  $10^8$  ufc/ml a été employée, réalisée elle-même à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm.

## 2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées

### 2.5.1. Test *in vitro*(Méthode de diffusion des disquesou aromagramme)

L'évaluation *in vitro* de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique de diffusion en milieu solide (Aromagramme, Méthode des disques). C'est une méthode qualitative, qui nous permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries à l'huile essentielle extraite.

Le test antimicrobien a été réalisé au niveau de laboratoire de contrôle de qualité Microbiologique de VENUS SAPECO.

- **Principe**

Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques.

Après l'ensemencement, des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité standardisée d'huile essentielle sont disposés à équidistance sur le milieu, les disques doivent être distants

d'environ 30mm. Les boîtes sont placées dans l'étuve à la température adéquate. L'inhibition se traduira par une zone circulaire stérile dont le diamètre sera fonction de la sensibilité ou de la résistance du germe microbien. Cette zone est dite : «zone d'inhibition». Leur diamètre nous permet d'évaluer le degré d'action de l'huile essentielle traitée sur la croissance des bactéries.

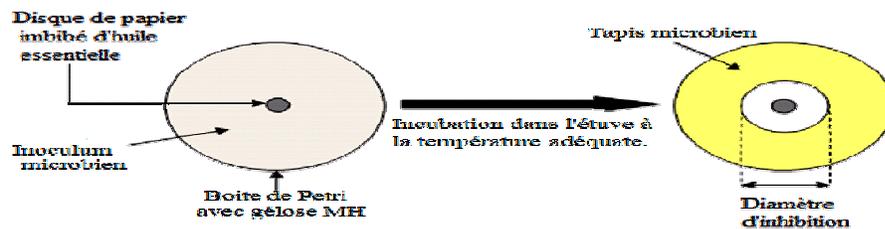


Fig.7: Illustration du Principe de la méthode de diffusion par disque

- **Protocole expérimental**

Le protocole de base d'aromatogramme qu'on a adopté est celui qui a été proposé par le laboratoire de microbiologie de l'École Polytechnique Fédérale de LAUSANNE (Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit Institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement, Section D'architecture, Suisse).

- **Les milieux de culture**

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation du test antimicrobiens sont les suivants :

- ✓ La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- ✓ La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries à l'huile essentielle.

La gélose prête à l'usage a été coulée aseptiquement en surfusion dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte .Ces dernières après refroidissement et solidification sur la pailleasse doivent être séchées avant leur emploi.

- **Préparation des disques**

Des disques de papier Whatman de 6mm de diamètre ont été stérilisés (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), puis ils ont été imprégnés avec 05µl de l'huile essentielle.

- **Mise en test**

Le test est effectué en cultivant les bactéries sur un milieu Muller Hinton. Chaque boîte de Pétri est ensemencée avec 1 ml de la suspension microbienne préparée bactérienne préparée précédemment est étalée à la surface du milieu gélosé à l'aide d'un râteau stérile, autrement, on peut réaliser l'ensemencement à l'aide d'un écouvillon préalablement imbibé de la suspension bactérienne. Après 1/4 d'h, les disques stériles imprégnés d'H.E à l'état pur sont déposés au centre des boîtes. Celles-ci sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 20 mn puis incubées à 37 °C durant 24 heures pour les bactéries. (Pibiri, 2006).

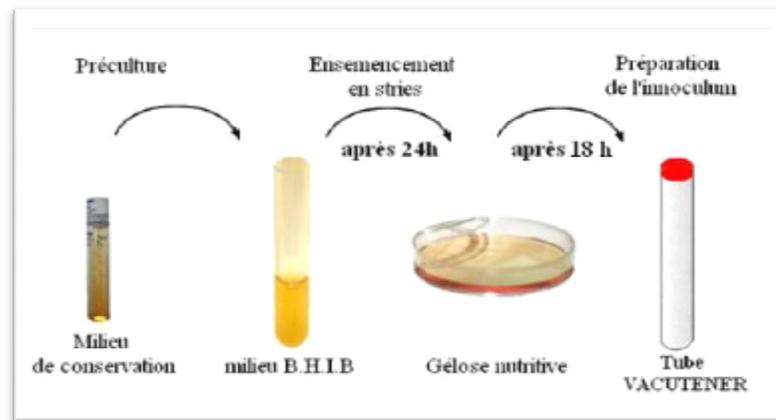
- **Lecture des résultats**

Après incubation, l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antimicrobienne se traduit par un halo translucide autour du disque, de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (exprimé en mm). Il est important de noter que la quantité d'H.E. déposée sur le disque varie selon les auteurs, excluant toute comparaison des valeurs des diamètres mesurés (PIBIRI, 2006).

### **2.5.2. Nature de l'activité antibactérienne (bactériostatique ou bactéricide) des huiles essentielles**

La nature de l'activité de chacune des H.E. testées a été déterminée par la méthode de Pibiri (2006). À partir des aromagrammes de 48 h, les zones translucides entourant les disques ont été repiquées à l'aide d'une anse stérile dans des tubes à essai contenant le milieu B.H.I.B. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 h (cf. figure 8). Au bout de 24 h d'incubation à 37±1 °C, ensuite repiqués dans de la gélose nutritive (GN) incubées à la même à 37 °C pendant 18 heures..

L'absence ou présence de colonies est observée. L'absence de développement bactérien indique un effet bactéricide de l'H.E. en question, tandis que la présence de colonies bactériennes nous renseigne sur un effet bactériostatique.



**Fig.8** :illustration de la nature d'activité antibactérienne (bactériostatique / bactéricide)

### 2.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilutions en milieu solide(NCCLS, 2002)

Même si les H.E. sont considérées comme des additifs salubres (LAMBERT *et al.*, 2001), leur utilisation est souvent limitée par les critères organoleptiques de l'aliment. Pour cette raison, il sera nécessaire de déterminer la CMI (c'est à dire la plus faible concentration en huile capable d'inhiber toute croissance bactérienne sans affecter la qualité sensorielle de l'aliment), car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même (CAILLET et LACROIX, 2007). Du fait de la non miscibilité des H.E. dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant (Tween 80) à été nécessaire pour la réalisation de cette étude. De même que nos essais ont révélé que ce tensio-actif n'exerce aucune inhibition sur la croissance des germes testés. Le Tween 80 permet une bonne dispersion de l'H.E. dans le bouillon MH d'une part et l'homogénéité du mélange d'autre part.

- **Préparation de l'émulsion d'H.E.**

Une solution mère d'H.E. de 20 mg / ml (HE/milieu de culture) environ 2% à été préparée comme suit :

- ✓ Mélanger 500 mg d'HE (environ 0.5 ml) avec 0.5 ml de Tween 80
- ✓ Ajouter 25 ml de milieu MH à ce mélange
- ✓ Agiter le tout jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

Une série de dilution de chaque H.E. est préparée de chaque H.E. est préparée avec un intervalle de concentration en H.E. allant de : 2.0 % à 0,0195 %.

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

- ✓ Verser la moitié du premier flacon (solution mère) dans une boîte pétri.
- ✓ Ajuster la moitié qui reste avec 12.5 ml de milieu gélosé pour obtenir une dilution de 10 mg /ml.
- ✓ Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.019 mg/ml. La gamme de concentration finale ainsi obtenue correspond à : 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0,0156 ,0.0078 et 0.0039mg/ml.

La préparation de l'inoculum à été faite de la même manière que l'aromatogramme. L'ensemencement de la souche microbienne se fait par touche à l'aide d'un écouvillon et pipette pasteur stérile .L'incubation se fait dans les mêmes conditions décrites auparavant.

La lecture des résultats de fait à l'œil nu en observant s'il ya l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin.

La **CMI** se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

**Tableau VIII** :Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les valeurs de CMI (d'HE/ml).

Concentration	20	10	5	2,5	0,625	0.3125	0.156	0.078	0,039	0,0195
%(mg /ml)	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0.0312	0.0156	0,0078	0,0039

## 2.6. Combinaison entre les huiles essentielles

Dans le but mise en valeur d'un éventuel effet synergique entre les H.E.,différents rapports entre les d'H.E. sont effectués à savoir :  $[HE1/HE2] = 1/1$ ,  $[HE1/HE3]=1/1$  et  $[HE2/HE3]=1/1$  ,des aromagrammes ont été réalisés en imprégnant des disques des mélanges d'HE précédemment préparées que l'on dépose au centre des boîtes du milieu Mueller-Hinton ( MH) préalablement inoculé avec une bactérie test et on les dépose au centre des boîtes pendant environ 20mn . Après 24 h d'incubation à une T° de 37°C, on mesure les auréoles d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse et on les compare à celles obtenus avec les H.E.testée toutes seules.

## 2.7. Application des huiles essentielles sur la viande bovine

### 2.7.1. Préparation de la viande bovine (matricealimentaire)

Des muscles de viandes (Longissimusdorsi, pH initial 5.7) ont été obtenus directement à partir d'une carcasse bovine 72 heures *post-mortem* (Abattoir située au grand marché de Boufarik). Puis transportée dans une enceinte réfrigérante (Glacière) type Mobicool, UK de température  $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ , puis acheminée au Laboratoire de microbiologie de VENUS dans les 30 minutes qui suivent l'achat. Une fois arrivé au laboratoire, les muscles sont aseptiquement débarrassés de leurs couches superficielles, constituées de tissus conjonctifs et de matière grasse. La viande est ensuite découpée en Plusieurs lamelles fines, à l'aide d'un couteau en Inox stérile, désinfectée lui-même à l'aide de l'eau de javel diluée, (s'assurer de la propreté et l'hygiène des ustensiles, afin de ne pas favoriser la contamination croisée de la viande en question).



**Fig.9** : préparation de la viande bovine

### 2.7.2. Contrôle microbiologique préalable de la viande bovine fraîche

Avant inoculation avec les différentes souches bactériennes et l'addition des différentes huiles essentielles, la viande est aussi préalablement analysée pour déterminer une éventuelle présence de bactéries, ainsi que la détermination de la charge bactérienne initiale (flore aérobie mésophile totale ou dite encore germes aérobies mésophiles totaux). 10 g de broyat de viande sont ajoutés à 90 ml d'eau peptonée préalablement préparée et stérilisée dans l'autoclave. Des dilutions multiples, sont préparées en utilisant le même diluant à raison de 1ml de la solution du départ (solution mère) dans 9 ml d'eau peptonée. Pour chaque dilution en ensemence deux boites. Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) à été déterminer selon la norme : NF V08-011 (1998) en utilisant le milieu de culture agar PCA. Les boites sont par la suite incubées à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures.

La recherche des coliformes est réalisée dans les bouillons B.L.B.V.B à base de bile et vert brillant. Le dénombrement des coliformes totaux à été déterminé selon la norme NF V08-050-1999. L'incubation à été réaliser à  $44^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures ( $\pm 2$  heures). Les Coliformes fécaux

ont été déterminés selon la norme NF V 08 -060-1999. Les Staphylocoques présumés pathogènes sont déterminés selon la norme (ISO 15213-2003) : les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 heures en utilisant le milieu Baird- Parker. La recherche des salmonelles a été réalisé selon la norme ISO 6579 (1993) .Elle comporte trois étapes, le pré enrichissement, l'enrichissement et l'isolement .Dans chaque étape les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.Le dénombrement des germes anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) est effectué sur le milieu TSN (Tryptone Sulfite Néomycine) à 37°C pendant 20h+/- 2h selon la norme (NF V08-061 – 1996).

### **2.7.3. Optimisation de la CMI appliquée à la viande**

Quelques limites existent à l'utilisation des huiles essentielles comme agents de conservation dans les aliments, notamment le pouvoir aromatisant, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les concentrations d'huiles utilisées sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment. La concentration en huile essentielle qui est nécessaire pour qu'elle exerce son pouvoir antimicrobien dans une matrice alimentaire doit être supérieure à celle appliquée *in vitro*. Burt. (2004) a suggéré que les valeurs des CMI des huiles obtenues « *In vitro* » doivent être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 à 100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire.

- **Choix du coefficient correcteur**

Par mesure de précaution, nous avons jugé utile de multiplier les valeurs des CMI obtenues, par un coefficient de **2**, car nous estimons que les valeurs des CMI sont relativement élevées, l'odeur que les HE dégagent est forte et pour éviter tout surdosage.

- **Protocole expérimental**

Le test de l'activité antimicrobienne des l'H.E appliquées sur la viande est réalisé en utilisant le même principe que protocole expérimental cité par Dr. DJENANE et ces collaborateurs. (2007).

### **2.7.4. Inoculation de la viande par des souches bactérienne**

Nous avons réalisé successivement les étapes suivantes:

- Préparation des morceaux de viandes de manière à ce qu'elles aient le même poids (50gr).



**Fig.10 :** Morceaux de viandes préparées, poids 50gr / morceau

**Remarque :** Les échantillons de viandes seront préparés selon les bonnes pratiques de manipulations, placés sous une feuille d'aluminium stériles avant leur inoculation. On mentionne le nom de la souche et la date de l'inoculation.

- Inoculation de chaque morceau de viande avec une charge bactérienne de  $10^6$  UFC/ml à l'aide d'un écouvillon de manière à couvrir toute la surface.



**Fig.11 :** Inoculation des morceaux de viandes par des bactéries pathogènes.

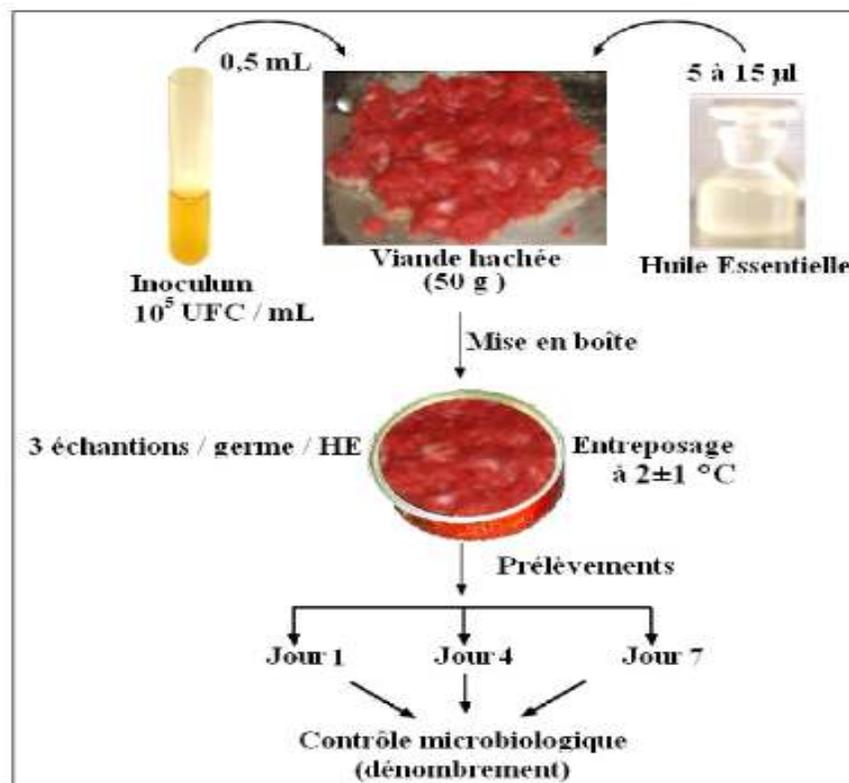
- Pulvérisation des HE diluées à la CMI multiplié par un facteur de 2 sur chaque morceau de façon à les couvrir totalement à une distance de 20 cm des morceaux. Les HE utilisées sont : l'origan, le thym et le Laurier noble.



**Fig.12 :** Ajout des HEs a une concentration 2x CMI

- Les échantillons traités sont ensuite placés dans des barquettes en polystyrène, puis recouverts avec des sachets en plastique stérile. Les échantillons de viande étaient conservés à une T° de réfrigération: 4 +/-1 °C pendant une semaine(7 à 8 jours).
- Les échantillons témoins de chaque groupe sont traités avec de l'eau distillée stérile (50gr de viande + Souche pathogène + EDS).conservés dans les mêmes conditions.
- Les analyses microbiologiques sont réalisées pour un intervalle de 03 jours, on rappelle sur une durée de stockage de 7- 8 jours au frais.

**50 g de viande bovine fraîche + souche pathogène+ H.E de concentration (2 x CMI).**



**Fig. 13:** Schéma du test de l'activité antibactérienne des H.E. sur une viande contaminée par les souches pathogènes (protocole expérimentaleselon Djennane .2007).

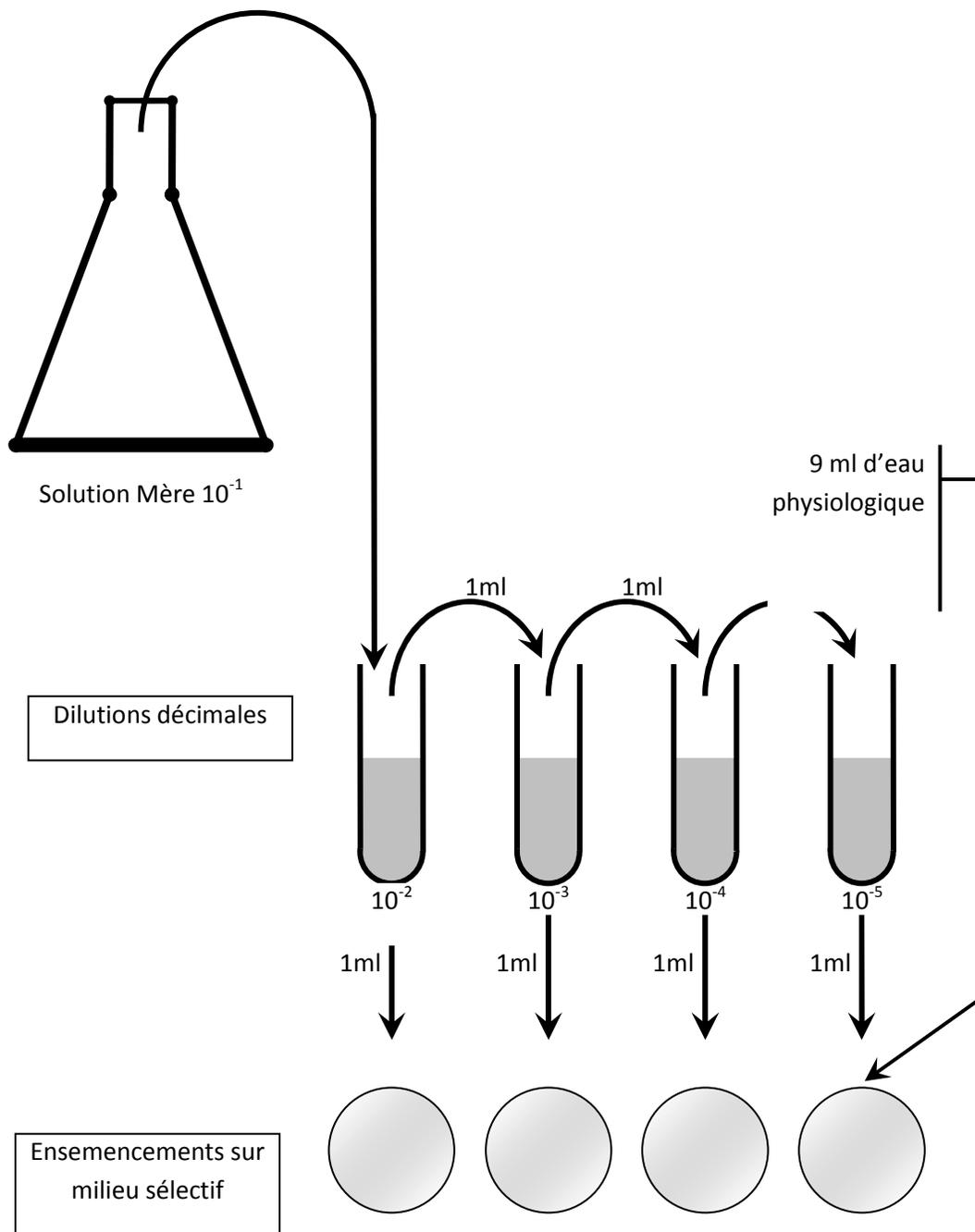
### 2.7.5. Test de l'effet des H.E. sur la conservation de la viande par des analyses Microbiologiques

Pour déterminer l'efficacité inhibitrice des H.E. sur les bactéries pathogènes présentes dans la viande, des analyses microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique microbienne de chaque espèce en présence et en absence d'H.E. Toutes les analyses ont été réalisées en duplicata.

La cinétique microbienne de chaque espèce a été mesurée au 1<sup>er</sup>, 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pendant une durée globale de conservation de sept (07) jours. Les échantillons ont été conservés au réfrigérateur. Pour chaque prélèvement, 25 g de viande de chaque échantillon étudié sont placés puis dilués dans 225 ml d'eau peptonée(EP) à 0.1%. Chaque échantillon est homogénéisé à l'aide d'un Stomacher pendant 1 minute. Des dilutions décimales sont préparées par dilution de 1 mL dans 9 mL d'eau peptonée stérile (0.1%). Deux boîtes de pétri sontensemencées pour chaque dilution enversant 1 ml de chaque suspension dans de la gélose en surfusion, chaque germe a étéensemencé sur son milieu sélectif.

Le dénombrement d'*E. coli* a été déterminé en comptant les boîtes dans un milieu Gélose VRBL ou VRBG incubées (37 °C pendant 24 h pour les totaux et 44°C pour les fécaux).

Celui de *S. aureus* a été déterminé dans un milieu Chapman (Biomérieux® SA- France) incubées à 37 °C pendant 48 h, *Pseudomonasaeruginosa* dans milieu gélosé pseudo agar les salmonelles dans lagéloseHéktoen ou milieu SS. Le nombre de bactéries est exprimé en  $\text{Log}_{10}$  d'unité formant colonie/g (Log 10 UFC /g). (Selon le schéma de la figure14).



*Fig. 14 : Schéma de l'ensemencement des milieux sélectifs à partir de la solution mère de chaque échantillon*

Les boîtes ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 H et la lecture a été faite par comptage direct des colonies (à l'œil nu).

### 2.7.6. Analyses sensorielles

Les échantillons de viande contenant les différents volumes en H.E. correspondantes ont été mélangés manuellement en utilisant des gants en latex pour bien incorporer l'HE. Les différents échantillons ont été cuits dans un four à gaz butane puis servis aux dégustateurs dans des petits plats en plastiques jetables. Le panel des dégustateurs est constitué par six (06) personnes âgées entre 26 et 40 ans (3 femmes et 3 hommes), l'ensemble des dégustateurs sont des étudiants (es) et des professeurs de l'Université de Blida (département de chimie et de cosmétologie. Les tests de dégustation ont été réalisés dans les conditions (température ambiante, lumière jour...) du laboratoire de Recherche de l'ENS de Kouba selon la méthode décrite par DJENANE *et al.* (2001). Les six dégustateurs ont été entraînés au départ par des tests préalable(viandenon traitées par les huiles essentielles), ces tests ont étaient inspirés de la méthode de « *American Meat Science Association guidelines* ».

Le panel a été soumis un test olfactif sur les viandes avant et après cuisson (sans huile et sans sel) ainsi qu'à un test gustatif avant et après assaisonnement (sel uniquement). Les attributs sensoriels à déterminer sont des critères organoleptiques (goût et odeur). Ces deux critères ont été structurés sur une échelle de 5 valeurs :

- 1 : Imperceptible
- 2 : Faiblement perceptible
- 3 : Moyennement perceptible
- 4 : Fortement perceptibles
- 5 : Très fortement perceptibles

Les résultats ont été exprimés selon les scores prédominants octroyés par les panelistes

### 2.8. PHMétrie

Le pH de la viande est mesuré à l'aide d'un pH mètre type HANNA 211 model 2012. Après avoir homogénéisé 3g du produit dans 27 ml d'eau distillée pendant 10 à 1300 rpm à l'aide d'un ultra – Turrax T25 macevator( Janke § Kinkel , Staufen , Germany ).

## Partie II

### **Evaluation de l'activitéantioxydantedes huiles essentielles étudiées (origan, thym et laurier) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH**

Ces dernières années, l'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse (ex : BHT, BHA) est remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels (BOUGANDOURA, et *al.*, 2012) Désormais, l'intérêt est porté sur les antioxydants naturels, grâce à leurs propriétés thérapeutiques qui ont augmenté considérablement. Des recherches dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (POPOVICI et *al.*, 2009).

Les antioxydants naturels les plus connus sont la  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants possèdent des groupes phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) et super oxydes ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ) (POPOVICI et *al.*, 2009).

Dans le but de l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées et pour mieux l'estimer et déterminer son pouvoir, on a opté à la mettre en évidence par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

#### **❖ Principe de la méthode de piégeage du DPPH**

Cette méthode est basée sur la réduction du radical DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 15). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire (POPOVICI et *al.*, 2009).

Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée, caractérisée par une absorbance dans une solution d'éthanol centrée à environ 517 nm.

Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite DPPH-H (2) avec perte de cette couleur violette en une couleur jaune pâle (MOLYNEX *et al.*, 2004).



**Fig. 15:** Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie (Molyneux, 2004).

### Appareillage et réactifs

Le matériel suivant a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait des clous de girofle :

- ✓ Un spectrophotomètre UV-visible de marque Chimadzutoype 1605 à double faisceau (figure 3.8).
- ✓ Une balance sensible de marque Scaltec type ISO 9001, avec une précision de 0.01 mg.
- ✓ Des tubes à essai avec leurs supports.
- ✓ Deux pipettes de 1ml graduées et une micropipette (pipette de précision).
- ✓ Papier aluminium, pour préserver les solutions à l'abri de la lumière.
- ✓ Une fiole de 100 ml, pour préparer la solution de DPPH.

Les différents produits utilisés sont regroupés dans le tableau IX.

**Tableau IX :** Produits et standards utilisés, leurs marques et degrés de pureté

Produits et standards	Marques	Pureté
DPPH	Fluka	97%
Méthanol	Merck	99,5%
BHT	Sigma-Aldrich	>99%
BHA	Sigma-Aldrich	>99%
Vitamine E	Sigma-Aldrich	>99%

Le pouvoir antioxydant de nos H.E. a été testé par la méthode au DPPH décrite par Burits et Bucar , ( 2000 ) avec quelques modifications.

### 1. Préparation de la solution DPPH

Le DPPH (2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est solubilisé dans le méthanol absolu pour avoir une solution de concentration de 0.004%, en raison de 4 mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol.

### 2. Préparation des échantillons(Standards et H.E.)

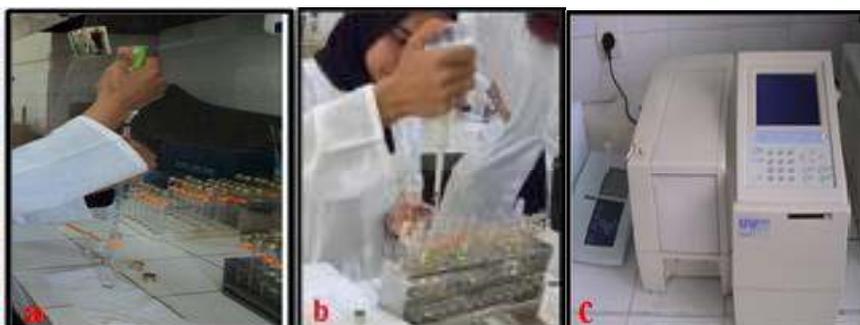
Les échantillons d' H.E. ont été préparés par dissolution d'une quantité appropriée d'H.E. dans 1ml de méthanol (mg/ml). Cette solution dite solution mère, subit ensuite des dilutions ou solutions filles pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de micro litres ( $\mu$ l).

En parallèle, des solutions méthaloïques, de la vitamine C, vitamine E, BHT et BHA ont été préparées par dissolution de 0.2 mg de chaque standard dans 1ml de méthanol. L'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

Dans des tubes secs et stériles, on introduit les différentes concentrations de la solution à tester, et des échantillons standards (figure 3.8a), compléter ensuite jusqu'à 1ml avec du méthanol absolue a laquelle on additionne 1 ml de la solution DPPH( figure 308b).

Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 1 ml méthanol et 1 ml de la solution DPPH.

Après agitation à l'aide d'un vortex, les tubes sont incubés pendant 30min à une température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'O<sub>2</sub> l'atmosphérique.



**Fig.16:** Différentes étapes de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH

### 3. Lecture des résultats

La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en utilisant des cuves en quartz de 2 ml (fig.17).



**Fig.17:** cuves en quartz de 2 ml

### 4. Détermination du pourcentage d'inhibition (Sharififare et al., 2007).

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH à 50% (EC50), les résultats sont exprimés en activité antioxydante, qui exprime la capacité de piégeage du radical libre et elle est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. L'activité antioxydante « AA% » est donnée par la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = ([\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}}] / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

Soit:

**AA** : Activité antioxydante.

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

**Abs<sub>control</sub>**: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution **méthanol + DPPH**.

**Abs<sub>test</sub>** : Absorbance à 517 nm de l'échantillon.

### 5. Détermination du temps d'équilibre EC 50(Sharififare et al., 2007).

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité de capter les radicaux libres. Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical et la puissance d'un antioxydant, nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par mesure de l'abaissement d'absorbance de nos H.E., ainsi que les étalons d'antioxydants à la concentration qui correspond à la valeur de EC50 (autrement appelée la valeur IC50).

La valeur EC50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de **50%** de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de la solution de DPPH. Cette valeur est déterminée graphiquement.

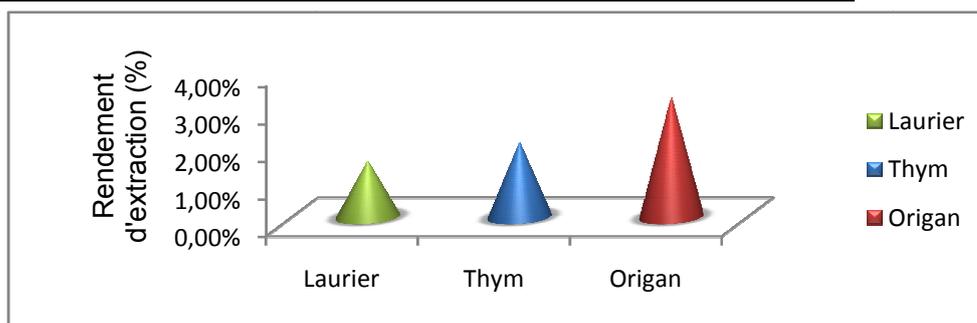
**Partie I**

**Les en huiles essentielles**

**1.1 Rendement**

**Tableau X :** Le rendement (%) en H.E. des différentes plantes utilisées.

H.E.	Thym	Laurier	Origan
Rendement(%)	<b>2 %</b>	<b>1.5%</b>	<b>3.2%</b>



Les résultats représentés dans le tableau X et la figure 18, montrent que les résultats de rendement de l'extraction des du thym, laurier et l'origan sont respectivement : 2%, 1.5% et 3,2%.

L'H.E. de *Thymus vulgaris* de la région de Bougara représentant un rendement de 2%. Les résultats obtenus sont presque similaire à ceux cités dans la littérature scientifique et les travaux précédant de Haddouchi et al (2009), en effet le rendement de l'H.E. du thym est appréciable par rapport à celui donné par : Dob et al. (2006), obtenu à partir des tiges et des feuilles (0.9%). Ce rendement est considéré comme important et intéressant pour l'exploitation industrielle.

Les feuilles de laurier noble de la région de Chrèa donnent un rendement de (1.5%), ce rendement est appréciable à l'échelle industriel. En comparant nos résultats avec ceux donnés par BARDEAU (2009), nous constatons que le rendement en huile essentielle de laurier noble est compris dans l'intervalle donné par ce dernier qui varie entre 1 à 3%, les mêmes résultats ont été obtenus par Berzani et Hanniche 2013.

Concernant le rendement obtenus des feuilles d'origan (3,2%) est supérieur comparé à celui rapporté par Baser et al qui est de l'ordre de 0.66% pour l'espèce *Origanum floribundum* de Chrèa et presque similaire à celui cité par Azzoudj (1999).

D'après comme Bekhechi , et al, 2008. Abdeouahid qui est de l'ordre de 3,53% à 3,95% pour *Origanum glandulosum* d'Algérie.

Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en H.E. 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 de séchage, les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, présence de parasites, de virus et mauvaises herbes (Bajpai *et al.*, 2008; Kelenet Tepe., 2008).

On peut dire que les quantités obtenus en H.Es pour les trois plantes utilisées ; dans la pratique restent satisfaisantes pour mener à bien une telle étude car les quantités en H.E. nécessaires sont généralement de l'ordre de microlitres ( $\mu$ l).

### 1.2 Caractéristiques organoleptiques des H.E. extraites

**Tableau XI** : résultats des caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées

H.E./ propriétés	couleur	Odeur	Aspect
laurier	Incolore	Très forte et caractéristique (épicee, camphrée)	Liquide Mobile Limpide
Thym	Jaune pale	Douce agréable	Liquide
Origan	Jaunâtre à brun foncé	Très piquante fortement aromatique	Liquide Limpide mobile

Selon (Bardeau, 2009), L'essence de feuilles de laurier est un liquide pâle, d'odeur agréable, douceâtre et de saveur un peu acre.

L'essence de thymus est de couleur jaune d'odeur aromatique acre, de saveur fortement piquante. L'HE d'Origan a une odeur caractéristique, aromatique, phénolique, agréable avec un fond légèrement épicee. Les paramètres organoleptiques des trois huiles essentielles étudiées sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR 2000.

### 1.3. Caractéristiques physicochimiques

**Tableau XII**: résultats des caractéristiques physicochimiques des huiles étudiés

H.E.	Laurier	Thym	Origan
Densité relative	0,910 Norme AFNOR : (0,907-0,914)	0,917 Norme AFNOR ( 0,9-0,955)	0.923
Indice de réfraction	1,465 Norme AFNOR : (1,464-1,466)	1,470 Norme AFNOR 1.495 à 1.505	1,504 Norme AFNOR : (1,50-1,51)

Le premier paramètre à discuter est la densité, car d'après les résultats présentés dans le tableau XII, on peut dire que les résultats des H.E.s de laurier et du thym sont conformes aux normes internationales (AFNOR 2000) et similaires à ceux citées dans la littérature scientifique.

Le deuxième paramètre est l'indice de réfraction : qui est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Les valeurs d'indices de réfraction obtenues sont très élevée en comparaison avec celui de l'eau distillée qui est de l'ordre (1.333). Cette différence montre la richesse de l'huile en composées chimiques.

L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande.

L'indice de réfraction (Ir) de l'H.E. d'*OrigaumFloribundum* est supérieur à celui d'*Origanum floribundum* (1.48) trouvé par Boulaghmane (2012). Celui de *thymus vulgaris* (thym) est similaire aux résultats obtenus par : Haddouchi et al (2009) ; Bouhdid et al.2006).

L'HE de laurier présente un Ir conforme aux normes en vigueur.

D'après Boukhatem et al (2010), l'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés, une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé. Les résultats d'indice de réfraction obtenus pour les trois huiles essentielles étudiées sont conformes aux normes citées par AFNOR 2000.

#### 1.4. Analyse CG/SM des trois plantes

- L'analyse chromatographique par CG/SM de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* de la région de Bouguaraest caractérisée par la présence d'un composé majoritaire qui est le Thymol (**37.7%**), le p-Cymène, le  $\gamma$ - Terpinène, le Carvacrol et le  $\beta$ -Myrcene avec des concentrations de, 14.2, 10.1, 8.4, 7.1 % respectivement.

Nos résultats sont similaires aux travaux réalisés par Sokmen et al. , 2004 pour l'espèce *Thymus spathulifolius de Sivas*, de la Turquie, avec le thymol comme composé majoritaire (36,5 %).

- L'analyse chromatographique par CG/SM de l'HE de l'origan provenant de la région de Chréa avec l'espece *Origanum floribunduma* permis d'identifier 55 composés , le composé majoritaire est le carvacrol avec un taux de **29,6 %** suivie par deux hydrocarbures monoterpéniques : p-Cymène, , Terpinène avec des teneurs de 18,5 et 13, 7 respectivement. Par contre le thymol est présent avec uniquement 8,4 %.

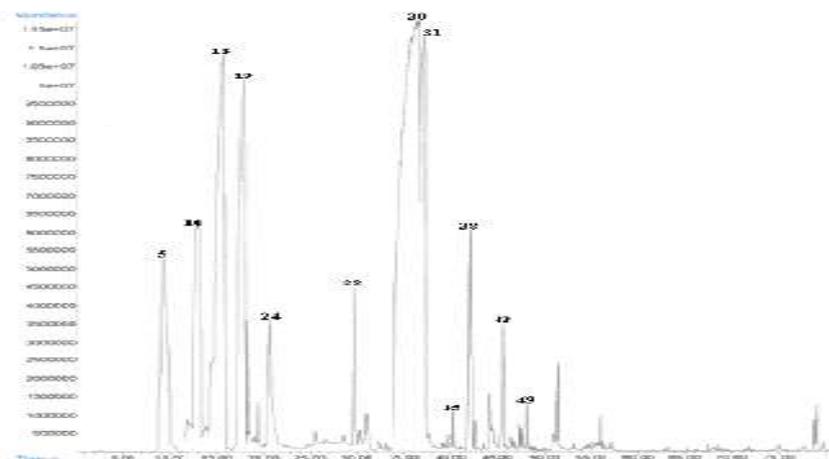
Nos résultats sont similaires aux travaux de Belhatab et *al.*, 2005 pour l'espèce *Origanum glandulosum* de la région de Sétif avec un taux de carvacrol de 47,0 %, ainsi qu'aux travaux de Azzoudj, 1999 pour l'espèce *Origanum floribundum* de la région de Chréa (Carvacrol avec un taux de 50,4 %).

- La CPG/SM pour l'HE de laurier noble (*Laurus nobilis*) a révélé la présence de 47 composés dont le taux est supérieur à 0,05% dans cette HE. Ses composés majoritaires sont dans un ordre décroissant: le 1,8 Cinéole (**39,98%**), pour le reste, on a l'Acétate de terpényle (12,10%), le Sabinène (8,15%),  $\alpha$ -Pinène (6,10%), le Linalol (5,05%),  $\beta$ -Pinène (4,55%), Méthyleugénol (4,04%). Les résultats sont présentés dans le tableau XIII.

Ces résultats sont similaires à une étude menée par Oussalah et ses collaborateurs (2006), sur une HE de *Laurus nobilis* provenant de plantes d'origine slovène montre une absence de Limonène dans la composition de cette HE (non-détecté) mais que le 1,8 Cinéole y représente le composé majoritaire avec un taux de 49%. Les résultats sont présentés dans le tableau VII.

L'Acétate de terpényle avec un taux de 12,10% représente le second composé majoritaire dans notre HE. Cependant, dans l'étude d'Oussalah et ses collaborateurs (2006), il représente lui aussi le second composé majoritaire mais à un taux inférieur (9,92%) pour une HE de la même espèce.

Le Sabinène, troisième composant majoritaire est représenté dans une proportion de 8,15% dans notre HE. Dans l'étude d'Oussalah et ses collaborateurs (2006), ce composé représente également le troisième composé majoritaire avec un taux de 7,61%.



**Fig19** : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*

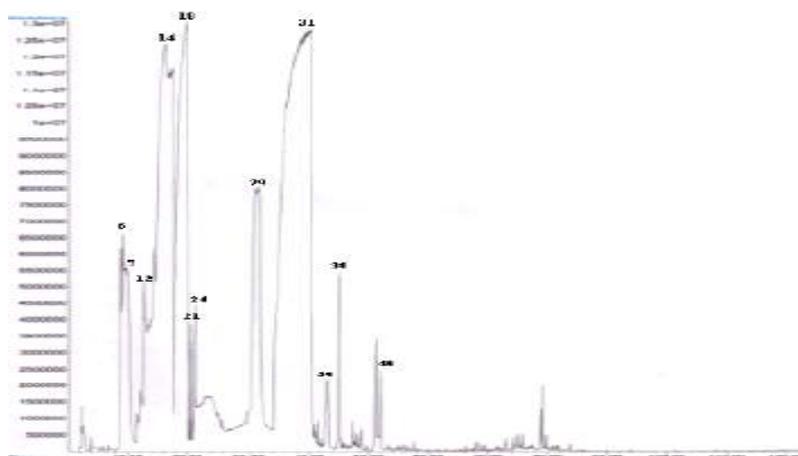


Figure 20: Chromatogramme de l'huile essentielle d'Origanum vulgare

Tableau. XIII : Analyse chromatographique (CPG/SM) de l'HE de Laurus nobilis

Temps de Rétention (mn)	Identification	% Aire
3,725	Cis-3-Hexénol	0,05
5,187	Tricyclène	0,02
5,301	$\alpha$ -Thuyène	0,65
5,511	$\alpha$ -Pinène	6,10
5,925	Camphène	0,67
6,715	Sabinène	8,15
6,820	$\beta$ -Pinène	4,55
7,273	Mycrène	0,75
7,768	$\alpha$ -Phellandrène	0,16
7,973	$\delta$ -3-Carène	0,29
8,239	$\alpha$ -Terpinène	0,59
8,649	p-Cymène	1,17
8,954	<b>1,8 Cinéole</b>	<b>39,98</b>
9,134	Trans- $\beta$ -Ocimène	0,09
9,568	cis- $\beta$ -Ocymène	0,50
10,015	$\gamma$ -Terpinène	1,09
10,411	4-Thujanol trans	0,23
11,368	Terpinolène	0,27
11,592	2-Undécanone	0,04
11,892	4-Thujanol cis	0,18
12,111	Linalol	5,05
15,435	Boméol	0,17
16,120	Terpinèn-4-ol	2,92
16,935	$\alpha$ -Terpinéol	2,42
17,316	Méthylchavicol	0,05
20,754	Acétate de linalyle	0,19
22,378	Acéates de bomyle	0,46
23,044	2-Undécanone	0,12
26,411	Acétate de terpényle	12,10
26,882	Eugénol	1,55
27,359	Acétate de néryle	0,12
28,759	$\beta$ -Elémène	0,29

29,901	Méthyleugénol	4,04
30,211	$\beta$ -Caryophyllène	0,63
32,082	Acétate de cinnamyle	0,11
32,225	$\alpha$ - Caryophyllène	0,08
32,635	Aromadendène	0,04
33,882	D Germacène	0,10
34,149	Patchoulène	0,10
36,473	$\delta$ -Cadinène	0,15
37,702	$\beta$ -Bisabolène	0,05
38,749	Elimicine	0,15
39,483	Spathulénol	0,19
39,644	Oxyde de caryophyllène	0,31
43,473	$\beta$ -Eudesmol	0,10
43,844	Valencène	0,06

## 2. Tests de sensibilité microbienne envers les H.E.

L'activité antimicrobienne des H.E.s étudiées (laurier, origan et thym) vis-à-vis des souches pathogènes communément associées aux maladies d'origine alimentaire (*E.coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S.entiritidis*) est évaluée qualitativement et quantitativement par la méthode de diffusion sur gélose ou aromagramme, tout en déterminant les valeurs de CMI correspondantes. Les mesures des halos d'inhibitions nous ont permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité à l'H.E. donnée. Les résultats des tests d'inhibition de l'activité antimicrobienne sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau XIV :** Récapitulatif des aromagrammes des H.E. étudiées vis à vis des souches bactériennes pathogènes.

H.E./ souche/ Ø (mm)	Origan	Thym	Laurier
<i>S.aureus</i>	50	45	24
<i>E.coli</i>	26	37	14
<i>Ps.aeruginosa</i>	17	09	08
<i>Salmonella entiridis</i>	47	12	15

Le diamètre des zones d'inhibitions nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés à l'huile essentielle en adoptant la méthode de CHIFUNDRA *et al.* (1990) appliquée aux antibiotiques :

- Diamètre compris entre 0 et 9 mm : souche résistante.
- Diamètre compris entre 10 et 15 mm : souche peu sensible.
- Diamètre compris entre 16 et 20 mm : souche sensible ou intermédiaire.
- Diamètre plus de 20 mm : souche très sensible.

D'une manière générale, les résultats montrent une grande variabilité des qualités bactériostatiques des H.E.s vis-à-vis des différentes souches.

Selon Chang *et al.* (2001) et Oussalah (1) *et al.* (2007), le pouvoir antimicrobiennes HE est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaires ;
- Concentration de ces composés ;
- Nature et structure des groupements fonctionnels ;
- L'interaction probable entre les différents constituants (synergie).

La souche *Staphylococcus aureus* à Gram positif semble la plus sensible, cette bactérie qui a montré une inhibition de croissance plus élevée (50mm) résultat similaire à celui trouvé par Boulagenem (2012) qui a révélé une activité importante pour la même souche avec *Origanum floribundum* avec une zone d'inhibition de 45mm. Cette constatation nous paraît intéressante surtout que la bactérie *S.aureus* est pathogène pour l'homme.

D'après Kalemba & Kunicha (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux HEs dépend des propriétés de l'HE et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram (-). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles (Abdul Rahman *et al.*, 2010). En revanche, *Staphylococcus aureus* est moins sensible.

Parmi les Gram (-), les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent les plus résistantes, cela est lié à sa grande capacité de développer des résistances car le comportement de cette souche n'est pas étonnant parce qu'elle a une capacité de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation) (Abi-Ayad *et al.*, 2011).

Les travaux notamment ceux de Ouattara *et al.* (1997); Hammer *et al.* (1999); De Billerbeck *et al.*, (2002); Souza *et al.* (2006a); Ahmad *et al.* (2006b); Ağaoğlu *et al.* (2007); Derwich *et al.* (2010) et Bari *et al.* (2010) ont confirmé la grande résistance des bactéries Gram - par rapport aux Gram+. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l'huile essentielle étudiée d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries Gram - qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrant d'autre part (Inouye *et al.*, 2001; Bagamboula *et al.*, 2004 ; Upadhyay *et al.*, 2010).

On note que l'HE de thym et de laurier exerce une activité faible vis-à-vis de la souche *pseudomonas aeruginosa*, l'HE d'origan fait exception. Plusieurs auteurs rapportent la faible sensibilité de la souche en question vis-à-vis de l'HE de *Thymus vulgare* (Thuille *et al.*, 2003 ; Bouhdid *et al.*, 2006 ; Haddouchi *et al.*, 2009).

A l'inverse, CELIKEL & KAVAS (2008) ont souligné, que l'action des HEs volatils a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram (-) et (+). Cependant, quelques HEs semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries Gram (+) que sur les bactéries Gram (-). Les mécanismes d'action des HEs et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés.

Les principaux composants actifs des HEs contre les agents pathogènes d'origine alimentaire contiennent généralement 1% des composés phénoliques tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol (DORMAN & DEANS, 2000 ; Lambert et al., 2001) ; le citral, le 1, 8 cinéole et linalol (Cristiani et al., 2007).

### 2.1. Spectre d'activité des huiles étudiées vis-à-vis des souches pathogènes

Les deux HEs d'origan et de thym, ont présenté une forte activité antibactérienne. Cette grande activité peut être liée à la présence des composés phénoliques majeurs : carvacrol pour l'origan (Résultats similaires à ceux obtenus par Belhattab et al., 2005 ; Azzoudj et al., 1999) et thymol pour le thym. Par ailleurs Dob et al. (2006) ont mené une étude sur les thymus de l'Afrique du nord, ont démontrés que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de la Tunisie, ce qui est le cas pour notre HE du thymus. Ces deux composés phénoliques sont en effet connus par leurs propriétés antimicrobiennes (Ettayebi et al., 1999 ; Ultee et al., 2000), car la composition chimique des HEs et leurs composants peuvent jouer un rôle important dans l'activité antimicrobienne. (SI et al., 2006) ont aussi démontrés cette activité. En effet Les HE sont essentiellement constituées d'hydrocarbures monoterpéniques.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et d'origan est supposée être due à leurs constituants phénoliques (Sivropoulo et al., 1996, Davidson et Naidu, 2000, Karamanet al., 2004). De plus, après leur pénétration dans la cellule, le carvacrol ainsi que le thymol peuvent interagir avec des composants intracellulaires et provoquer la mort cellulaire, exemple : par altération des protéines de structure (Kawakishi et Kaneko, 1987). L'amphipathicité des composant phénoliques comme le thymol et le carvacrol peut expliquer leur interaction avec les biomembranes et donc l'activité antimicrobienne (Cristiani et al., 2007).

Selon des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1999) ont également montré que le thymol possède une forte activité antimicrobienne et antifongique contre de nombreuses espèces comprises *Aspergillus sp*, *S.aureus* et *E.coli*

Lambert et al. (2001) et Juven et al. (1994) ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaire et fait augmenter la perméabilité de la

membranecellulaire bactérienne. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure (Trombetta et *al.*, 2005).

Il a été montré que le carvacrol interagit avec la membrane cellulaire où il se dissout dans la bicouche phospholipidique et aligne les chaînes d'acide gras. L'interaction des composants lipophiles avec les composants de la membrane phospholipidiques cause d'importants changements dans la structure de celle-ci (Ultee et *al.*, 2000). Ces changements de structure physique causerait une altération et une déstabilisation de la membrane, en augmentant la fluidité membranaire et de ce fait sa perméabilité (Ultee et *al.*, 2000). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémices de leur mort (Helander et *al.*, 1998; Lambert et *al.*, 2001). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines huiles essentielles (Cox et *al.*, 2000).

« C'est ce qui explique l'importance et l'efficacité de ces deux HEs (origan et thymé) ».

D'après Guinoiseau, (2010) les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol, sont fait du caractère acide de leur constituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les HEs riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clous de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes. Conner, (1993) a aussi montré que ces HE révèlent une forte capacité inhibitrice contre divers microorganismes pathogènes et d'altération dans différents aliments.

L'HE de laurier à aussi présenter une activité antibactérienne intéressante mais moindre que celle des deux autres, probablement, liée à la présence de son composé majoritaire qui est le : 1, 8 cinéole.

Dorman et Deans (2000) ont confirmé que l'activité antimicrobienne de laurier est tributaire à sa composition chimique. En effet SAYYEH et al (2002), ont montré que l'HE de laurier noble est constituée principalement par le 1,8 cinéol (44.12%), eugénol (26.15%), méthyleugénol (10.75%), sabinene (6.20%), 4-terpinol (3.60%),  $\alpha$ -pinene (2.74%) et  $\beta$ -pinene (2.05%). Suite à ces résultats SIMIC (2005), révèle que le pouvoir antimicrobien de laurier noble est attribué principalement à sa teneur élevée en 1,8-cinéol, eugénol, et méthyleugénol.

D'autre part, selon Knowles et *al.* (2005), l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, est due aux terpènes phénoliques qui agissent en se fixant sur les groupes amines

et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires.

On constate que nos résultats sont en concordance avec ceux de la bibliographie scientifique.

## 2.2. Effet de la combinaison des deux huiles essentielles

### 2.2.1. HE d'origan + HE de Laurier:

Les résultats des aromagrammes du mélange des deux HE pures d'origan et du laurier à volume égale, montrent que les diamètres d'inhibition obtenu avec le mélange est inférieur à la somme des deux diamètres d'inhibition des deux huiles seuls (**figure**). Nous pouvons conclure que les deux huiles ont un effet antagoniste l'une vis à vis de l'autre.

### 2.2.2. HE d'origan + HE Thym:

Les résultats d'aromatogramme du mélange à volume égale montre que les diamètres des zones d'inhibitions obtenus du mélange est supérieur à celui obtenue des deux HE seules ou testées séparément. En effet le carvacrol associé à son isomère le thymol se sont avérés être des puissants inhibiteurs de plusieurs germes microbiens. Ces composés phénoliques seront particulièrement utiles pour réduire la charge bactérienne. Le rapport carvacrol / thymol doit être choisi pour optimiser les effets synergiques

**2.2.3. HE Laurier + HE Thym:** Résultat non présentés, par défaut de contamination des boites.

## 2.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

**Tableau XV :** regroupent les CMI, correspondant à chaque souche bactérienne testées, avec la nature de l'activité antibactérienne de chaque germe étudié. ND : non déterminé

CMI des trois plantes			
Souche / HE / type de mécanisme d'action	Thym	Origan	Laurier
<i>S.aureus</i>	0,06 % (Bactéricide)	0,015% (Bactéricide)	l'HE de laurier vis à vis des trois souches bactériennes étudiées est la dilution 1 /16 qui correspond à 59,70µl /ml (résultat pris par le binôme qui la réalisé par méthode de dilution, en travaillant sur la même espèce de la même région). <i>Pseudomonas</i> non déterminée.
<i>E. Coli</i> Bactéricide	0,25 % (Bactéricide)	0,03 % (Bactéricide)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	1 % (Bactériostatique)	ND (Bactériostatique)	
<i>Salmonella enteris</i>	0,125% (Bactériostatique)	0,06% (Bactériostatique)	

Selon Penaler et ses collaborateurs (2005), la CMI varie suivant la variété de la plante de laquelle est extraite l'HE et selon le germe étudié.

### 3. Application des huiles essentielles sur la viande

L'évolution des esprits et le refus du « tout chimique » qui se manifeste de plus en plus ouvrent un peu plus la porte au « retour au naturel », c'est-à-dire au respect de l'essentiel, la vie.

Bien qu'il y ait beaucoup d'études focalisées sur les propriétés biologiques des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles, les applications sur les aliments sont très peu (Raza *et al.*, 2009; Foda *et al.*, 2010; Ghasemi *et al.*, 2010). Ceci est dû en fait à la complexité de la création de nouveaux conservateurs, efficaces et sûrs.

#### 3.1. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la viande avant inoculation

Les analyses microbiologiques de la viande bovine avant toute inoculation, montre une conformité aux normes en vigueur. On note une absence de salmonelles, des coliformes fécaux, des anaérobies sulfito-réducteurs (ASR), des staphylocoques présumés pathogènes.

La charge de la flore aérobie mésophiles totale est en général inférieure au seuil critique décrit par les normes en vigueur.

#### 3.2. Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur la viande après inoculation

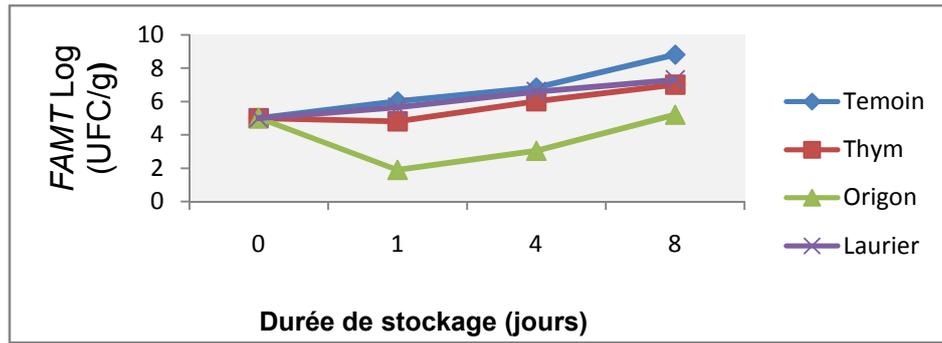
Les figures : 21, 22,23, 24 et 25 montrent respectivement les résultats du développement de la Flore aérobiemésophile totale ( *FAMT* ), *S.aureus* , *E.coli* , *Pseudomonas aeruginosa* et *S.enteridis* sur la viande bovine conservée à température de réfrigération (réfrigérateur de type ENIEM à une porte ) en présence des trois huiles essentielles cités précédemment dits échantillons traités ( 50 g de viande +  $10^6$  UFC / g de la bactérie en question + HE ).Un échantillon témoin ou dit encore : contrôle, qui ne contient pas l'HE, mais uniquement de la viande inoculée par les bactéries pathogènes .

On note que d'après l'ensemble des figures le nombre de bactéries dans les viandes témoins est significativement supérieur par rapport au nombre de bactéries dans les échantillons traités avec les types d'HE.

#### Remarque :

On tire l'attention concernant la conservation des échantillons contrôles (qui ne contiennent pas l'HE), que leur entreposage n'était pas dans le même réfrigérateur, ils étaient séparés, afin d'éviter leur voisinages avec les échantillons traités avec l'HE en question, afin d'éviter aussi l'effet d'influence des composés volatiles des HE sur les échantillons contrôles, qui s'en suit par une diminution notable de sa charge bactérienne au cours du temps. (Problème déjà rencontré lors des travaux précédant des étudiants de Dr. Djennane. Ce qui a influencé sur la cinétique bactérienne de tous les témoins de leur étude.

### 3.2.1. Effet sur la flore aérobie mésophile totale (FAMT)



**Fig.21** :Inhibition de la FAMTpar les HEs d’origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours.

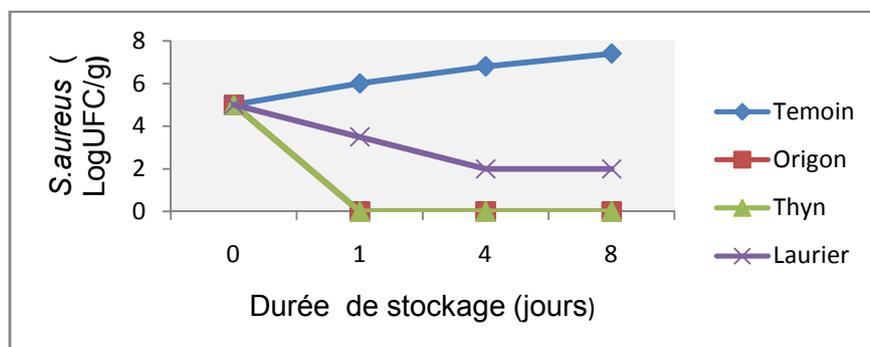
D’après l’allure de la courbe présentée dans la figure 21, la FAMT à connu une augmentation significative pour les trois HE, mais cette flore n’a pas dépassé le seuil critique admis par la réglementation Algérienne décrite dans le J.O.R.A.D.P.1998 ( $5.10^5$  germes /g de produit a analysé), au bout de 08 jours de conservation au frais.

On note que cette augmentation de charge en matière de FAMTpeut être due à une multiplication des bactéries Gram positif (Clark et *al.*, 1980 ).

L’origan et le thym semble présenter une flore inférieure à celle de laurier, bien que la charge des trois HE est inférieure à celle de l’échantillon témoin ou contrôle. Ces résultats pourraient être expliquer par le fait que le thym et l’origan surtout contiennent des substances bactériostatiques, voir même bactéricides (Boyer et *al.*, 1995) contribuent à la réduction de la FAMT. Ce résultat est constaté par plusieurs auteurs.

Pour les échantillons témoins ou contrôle on note une augmentation de la FAMT qui dépasse le seuil critique de  $5.10^5$  UFC/g.

### 3.2.2. Effet sur *S. aureus*



**Fig.22** :Inhibition de *S. aureus* par les HEs d’origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours.

Il s'avère que la présence de ces trois HE permet une réduction significative au nombre logarithmique de *S.aureus*, pendant toute la période de conservation.

D'après l'allure du graphe, on peut dire que **l'HE delaurier** à montrer une diminution très importante de la charge microbienne durant les 05 premiers jours de conservation, cette diminution est d'environ 03 cycles logarithmiques de  $5 \log_{10}$  UFC /g jusqu'au  $3.5 \log_{10}$  UFC /g, ensuite elle se stabilise à cette charge jusqu'au 8ieme jour d'entreposage au frais.

**l'HE duthym** (*Thymus vulgaris*): d'après le graphe , on note que cette huile à a permis une réduction très considérable de la charge bactérienne , interprétée par une chute libre , après 24 heures d'entreposage d'ailleurs le nombre de *S.aureus* a atteint une valeur nulle , ce qui explique que l'HE du thym exerce un effet léthal sur la bactérie cible ou autrement dit ; un effet bactéricide .Ce résultat , confirme celui obtenue *in vitro* , et en corrélation avec la bibliographie scientifique .Ainsi Karaman et *al.* (2001) ont montré que les HE du thym présentent des activités antibactériennes et antifongiques .De même, l'activité bactéricide du thym, a été aussi démontré par Rasooli et *al.* (2002), et par Tepe et *al.* (2005).

Il est à noter que l'HE de thym à une variabilité exceptionnelle en fonction de son environnement à savoir : (thym à thymol, à Carvacrol, à l'inalol, à géraniol et à thyanol (Joualt .2012) d'où intérêt de faire une CPG /SM est nécessaire a fin de déterminer la fraction active responsable de cette efficacité antimicrobienne.

**l'HE d'origan** : d'après le graphe ci-dessus, une très forte réduction du nombre de *S.aureus* a été enregistrée .En effet, une réduction de 100% (effetbactéricide)due probablement a la présence du carvacrol ,composantmajoritaire d'origan .On note que le même phénomène observé que celui du thymol car le thymol et le carvacrol sont des composants actifs des deux HE, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de la mort .leurs huiles ont donc bien des propriétés bactéricides.

Sogdic et Ozcan. (2003), Pibiri (2006), Kabouche et *al.* (2005) et Sari et *al.* (2006), ont également confirmé la forte sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de toute les HE de thym de l'origan ce qui confirme les résultats rapportés par la bibliographie scientifique.

Dans un abstract paru 2001 dans le journal de l'American College of Nutrition, 18 souris ont été contaminées par injection par le *Staphylococcus aureus* .Trois des six souris ayant reçu de l'huile essentielle d'origan ont survécu à l'infection contre seulement deux des animaux ayant reçu des antibiotiques, de la vancomycine .Les six souris n'ayant reçu aucun traitement sont mortes en trois jours.

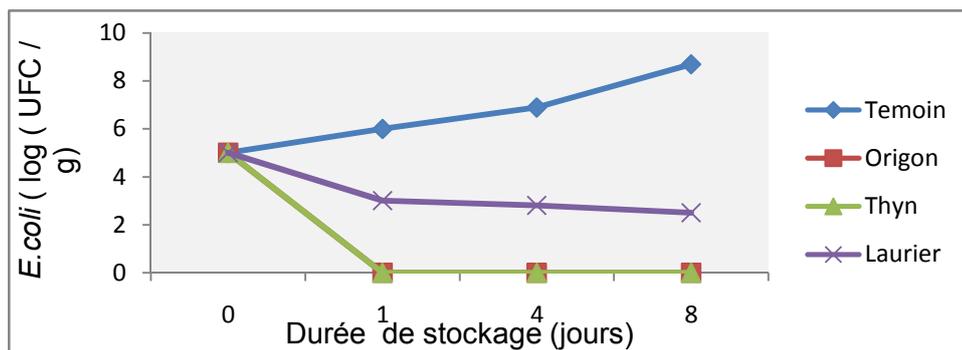
Selon Bagamboula et *al.* ., 2004 ; Baydar etal ., 2004 , ont montré que les différentesconstituants des HE possèdent une activité antimicrobienne et les constituants volatils majeurs ont des propriétés antimicrobiennes les plus importantes : carvacrol chez

l'origan , eugénol chez les clous de girofle , linalool chez le coriandre et le thymol chez le thym.

Ces travaux sont similaires à ceux prouvés in vitro, ainsi que par la littérature et les publications scientifiques.

Pour le l'échantillon témoin ou contrôle (50g de viande + *S.aureus* +ED) qui ne contient pas d'HE, d'après le graphe, nous observons que le témoin voit sa charge microbienne augmenter progressivement au cours du temps, on passant de la valeur 5 log 10 UFC /g à la valeur 7.4 log 10 UFC /g au bout de 08 jours.

### 3.2.3. Effet sur *E. coli*



**Fig.23** :Inhibition d'E.coli par les HEs d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours.

D'une manière générale, lors de l'application de ces HE sur la viande inoculée, ya eu une réduction notable et considérable de la charge bactérienne de la souche *E. coli* pour les troishuiles.

**L'HE de laurier** : on observe une diminution progressive de la charge microbienne réduite après 03 cycles logarithmiques du premier au 8ieme jour d'entreposage au frais.

**L'HE du thym** : phénomène similaire a celui de la souche bactérienne *S.aureus* , car d'après le graphe il ya une réduction très considérable de la charge bactérienne voir même réduite à 100% figurée dans le graphe par une chute libre , interprétée aussi par un effet létal ou bactéricide vis-à-vis de la souche *E. coli* , confirmé par plusieurs auteurs .

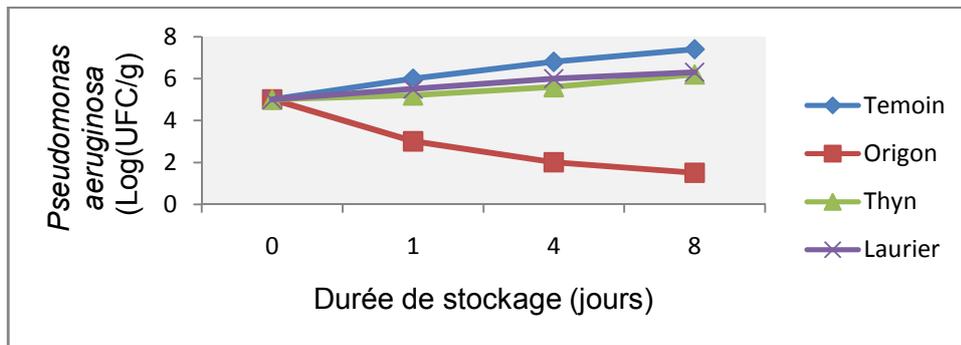
« la molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur diverses souches bactériennes comme *E. coli* et *S.aureus* sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions Potassium (K+) » (Walsh et Maillard,2003).

**L'HE d'origan** : tout comme le thym, il présente le même phénomène, le composant en question qui est le carvacrol, car d'après Kaloustian et al., 2008 )prouvent que l'H.E. d'origan est un antimicrobien très intéressant , plusieurs personnes l'utilisent pour combattre les rhumes , et autres infections respiratoires , d'où son HE est intéressante comme bactéricide contre plusieurs pathogènes notamment *E. coli* et *S. aureus* .

Kim et al ., 1995 , ce sont intéressés a *E. coli* O 157H7 , leurs résultats montre que la croissance de cette souche est complètement inhibée par le : citral , le carvacrol , le géraniol , perillaldehyde à 0.5 g/l.

Egalement Helander et ses collaborateurs (1998), ont montré que des changements morphologiques au niveau de la membrane externe d'*E. coli* sont observés suite à son exposition au carvacrol , un composé majoritaire de l'origan .

### 3.2.4. Effet sur *Pseudomonas aeruginosa*



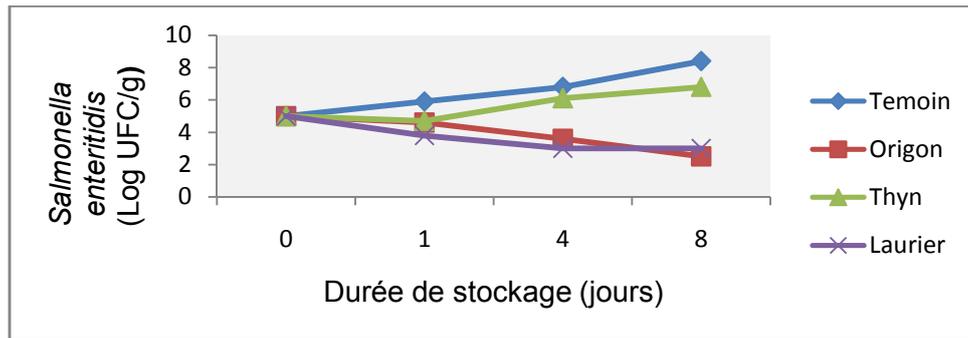
**Fig.24 :** Inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par les HEs d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours.

**L'HE de thym:** On observe une légère augmentation de la charge bactérienne vis-à-vis de cette souche mais l'huile de thym présente une charge moindre que de celle de laurier, mais cette cinétique reste inférieure au seuil et ne le dépasse pas (selon la réglementation en vigueur) ; tout en sachant que la cinétique de l'échantillon contrôle (témoin) est beaucoup plus supérieure que celui des échantillons traités. En effet la molécule du thymol n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (Walsh et Maillard ., 2003 ).

**L'HE d'origan :** Son effet est évident dès le premier jour de stockage, on note d'après l'allure de la courbe une réduction de la charge bactérienne jusqu'au dernier jour de stockage. Car seules les HEs d'origan et du romarin détruisent les *pseudomonas aeruginosa* (Baratta M.T et al., 1998 ).

A titre de rappel, on note que les bactéries Gram positif sont généralement plus sensibles aux effets des phénols et poly phénols . Cette résistance plus élevée chez les bactéries Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles étant donné que la bactérie *pseudomonas aeruginosa* est une bactérie BGN présentant à sa membrane externe formée de LPS (lipopolysaccharides).

### 3.2.5 .Effet sur *Salmonella enteritidis*



**Fig.25 :** Inhibition de *Salmonella enteritidis* par les HEs d'origan, thym et laurier appliquées sur la viande bovine fraîche stockées à 4°C pendant 8 jours.

**L'HE de laurier :** durant les 05 premiers jours, fait prendre à la courbe une allure semblable à celle de l'HE d'origan .A partir du 5ieme jour, ya une diminution très importante de la charge bactérienne jusqu'au 8ieme jour avec une diminution de plus de 3 cycles logarithmique.

L'huile de thym présente une activité moindre.

Par classement on aura : l'HE d'origan > HElaurier> l'HE de thym.

Des chercheurs ont testés l'effet de l'HE de laurier, d'origan de coriandre contre plusieurs bactéries, ils ont observés que l'HE d'origan manifestait l'activité la plus large contre presque toute les bactérie testées ( Barrata et al ., 1998 ).

D'après Juven et coll.1994ont obtenus une diminution importante des cellules vivantes de *salmonella thyphimirium* en la traitant par l'HE de thym et ces constituants actifs.

Plusieurs études portés par Kim et ces collaborateurs (1995), ont porté la sensibilité des *Salmonelles* à différents composés d'HE .Le composé le plus efficace est le carvacrol .

D'après Hulin et coll (1998) et Ultee et coll (1999), le carvacrol semble être un puissant inhibiteur de croissance de bactéries telle que *Bacillus cereus* et *Salmonella sp.* De même Bagamboula et coll (2004) ont récemment montré un effet inhibiteur du carvacrol sur deux espèces de *shigella*.

Nos résultats sont en concordance avec ceux réalisés *in vitro*, revue dans la discussion synthèse.

### 3.3.Synthèse sur l'effet des HE appliquées sur la viande inoculée par les bactéries pathogènes :

Nous pouvons déduire,grâce aux profils chromatographiquespubliées dans la littératurescientifique en ce qui concerne nos HEs étudiées, que les résultatsobtenus pour ce qui est de la CG/MS,les trois HE étudiées sont constituées de composés majoritaires à savoir le : carvacrol, thymolet le 1, 8 cinéol,sont considérés par beaucoup d'auteurs comme des antibactériens et antifongiques potentiels(sans oublier leurs pouvoir antioxydant revue dans la partie II de nos résultats).

Une question à soulevée c'est de se demander si leurs effets antimicrobiens ne sont pas une synergie entre toutes les molécules composante, ou au contraire, ils ne reflètent que les molécules majeurs présentes. En effet le thym se classe en premier des HE testées, et le thymol est le premier parmi les composants testées .Logique . Pourtant il est intéressant que le halo d'inhibition de l'HE de *Thymus vulgaris* est en moyenne plus que le double de la taille de celui du thymol seul, autrement dit l'HE complète du thym possède une activité bactéricide deux fois plus importante que son composant supposé le plus actif seul. Plusieurs auteurs ont confirmé ces résultats ( Dorman et al ., 2002 ; Klaric et al ; Inouye et al ., 2006 ). Même phénomène se produit avec l'eugénol et l'HE de clous de girofle qui a un effet inhibiteur plus important que son composant actif, qui est l'eugénol.

Ces travaux mettent en évidence le fait que c'est bien l'ensemble des molécules que vient la totalité de l'efficacité de l'HE, et non d'un seul « principe actif » qu'il est illusoire de vouloir isoler. Jouault.(2012).

Néanmoins certains chercheurs, ont signalé qu'il existe une relation étroite entre la composition chimique en éléments les plus abondants et l'activité antimicrobienne.

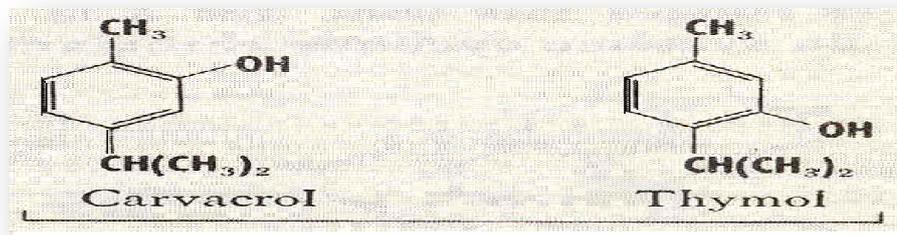
Bien que l'efficacité d'une HE est due en grande partie à sa composition chimique , et que cette composition dépend de plusieurs facteurs aussi bien climatiques que techniques , c'est pourquoi , et afin de pouvoir mieux se fier au chémotype , il faut standardiser les conditions de récoltes ou alors réaliser après chaque extraction une CPG qui accompagnera le flacon d'HE pour être sure de sa composition chimique , dans le but de l'utiliser d'une manière plus efficace et de pouvoir étudier plus précisément ses effets , seule ou couplée à d'autres molécules , facteurs au agents ( recherche d'effets synergiques ).

Concernant l'effet des HE appliquées sur la viande bovine fraîche, nous remarquons que la tendance est différente, car il ya une différence d'effets de nos HE vis-à-vis des souches bactériennes étudiées .Car plusieurs facteurs influencent les propriétés antimicrobiennes.

Pour le l'échantillon témoin ou contrôle (50g de viande + *S.aureus* +ED) qui ne contient pas d'HE, nous constatons que la charge microbienne à augmenter progressivement au cours du temps pour tous type de germe microbien.

Les deux HE d'origan et thym semblent efficaces, car d'après Kaloustian et al. (2008), confirment que ce sont les phénols(thymol et la carvacrol ) qui donnent a l'HE le caractère antimicrobien .Par ailleurs ces résultats sont en accord avec ceux donnés par Valeroet Frances ( 2006 ) et Horváth et al. ( 2006 ).Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions de potassium dans les cellules microbiennes (*E.coli* et *S.aureus* ) en contact avec l'HE ,cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversible au niveau de la membrane de la bactérie , le thymol et le carvacrol , des composants actifs d'huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides, il semble que

les deux phénols sont similaires et présentent un effet bactéricide vis-à-vis des deux bactéries précitées, car le carvacrol et /ou le thymol sont des *isomères de position*. Les effets bactériostatiques sont montrés par le reste.



**Fig.26:** structure du carvacrol et du thymol (isomères de position).

Plusieurs auteurs comme (Shapiro et Guggenheim, 1995, Dorman et Deans, 2000, Bagamboula et al., 2004, Pibiri, 2006). Selon Walsh et al. (2003) ont confirmé que l'action du thymol est aussi comparable à celle de son isomère le carvacrol.

Vient en 3ième position l'HE de laurier qui a joué un bon rôle concernant son action sur les trois souches bactériennes sauf, *Pseudomonas*, qui paraissait la plus résistante (même phénomène pour l'HE thym). Cette huile a diminué de manière considérable (après les deux autres) la charge bactérienne tout au long de la durée de conservation des viandes au réfrigérateur.

On rappelle que la diminution des charges bactériennes pour l'HE de laurier, est due probablement à son composé majeur qui est le 1, 8 cinéol (39,98%), composé majoritaire (selon Flamini et al., 2007 est à 48.38%), présente un effet antibactérien modeste mais qui jouerait un rôle dans la perméabilité de la membrane externe (Apadopoulos et al., 2008), en effet d'après CARSON et ses collaborateurs (2006), il augmente la perméabilité membranaire pour faciliter le passage des autres composants dans la cellule. Ces résultats coïncident en général avec ceux obtenus *in vitro*.

Il est bien connu que le pouvoir antimicrobien des HE dans les matrices alimentaires est généralement réduit une fois comparé au travail *in vitro*, du fait de la présence de graisses, des hydrates de carbone, de protéines, de sels et de pH (facteurs intrinsèques), influence fortement sur l'efficacité de ces agents (Burt, 2004; Caillet et Lacroix (2007) ont aussi soulevés plusieurs facteurs (voir chapitre III).

Pour ce qui est de facteurs influençant comme la composition chimique de l'aliment, selon (Caillet et Lacroix, 2007), une huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou en protéines. Il est à noter que plusieurs études ont montrés l'impact de la nourriture des animaux (type d'alimentation des bétails) sur la qualité et la composition de leurs viandes.

En effet, une étude menée par Coulon et Priolo (2002), montre qu'une augmentation du niveau de la ration alimentaire augmente la teneur en lipides de la viande blanche de dinde.

D'après Bussata et ces collaborateurs (2008) qui ont examiné l'effet de l'HE *d'origanum majorana* sur la croissance de plusieurs espèces bactériennes dont *E.coli* dans une saucisse fraîche. L'HE et la saucisse ont été mélangés avec du NaCl.

En effet Wendakoon et Sakaguchi (1993), ont montrés que l'addition du chlorure de sodium (Na cl) aux HE augmente leur activité antimicrobienne. Les résultats de notre étude ont montrés que les effets antibactériens étaient satisfaisant due probablement à l'ajout du NaCl.

Il est établit que l'efficacité de l'HE peut être influencé par la température de stockage ou encore la quantité d'oxygène dans l'emballage, cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites (Caillet et Lacroix, 2007) même si Shekarforouchet ses collaborateurs (2007) ont monté que l'effet de l'HE de l'Origan sur *E. coli* appliquée sur une viande blanche est plus important lorsque les échantillons sont entreposés à 10°C que lorsqu'ils le sont à 4°C.

Durant notre travail une importance considérable à été accordée à un des paramètres les plus importants qui est le potentiel d'hydrogène (pH). En règle générale, la sensibilité des bactéries aux substances antibactériennes semble aussi augmenter avec la diminution du pH de l'aliment qui est un facteur important, affectant l'activité d'une substance antimicrobienne. Car à faible pH, l'hydrophobicité de certaines molécules augmente et par conséquent, elles se répartissent convenablement dans la phase lipidique du produit. Ces molécules peuvent aussi se dissoudre plus facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne et renforcer ainsi leur action antimicrobienne (Japon-Lujan et al., 2006). D'après nos résultats obtenus expérimentalement, les valeurs de pH obtenus reflète que ya pas une différence significative entre les échantillons au cours du stockage. En effet les valeurs de pH pour tous les échantillons étaient au voisinage de 5,6 à 5,8. Ce fait pourrait être expliqué par le pouvoir tampon de la viande.



**Fig.27** :photo montrant la différence entre viande inoculée avec une bactérie pathogène avec et sans HE ( Djenane, 2007 )

#### 4. Résultats des analyses sensorielles de la viande

Les réponses données par le panel test sensoriel sont résumés dans le tableau XVI. Des tests des analyses sensorielles ont été programmés, et des concentrations variables en HEs (CMIx2). Ces HE sont utilisés dans cette étude pour étudier l'impact de l'effet de la concentration (optimisation des tests sensoriels) sur les propriétés organoleptiques de la viande à savoir : l'odeur et le goût.

En général, les HE possèdent des odeurs assez forte et puissante ce qui peut être un facteur limitant pour leurs applications dans des denrées alimentaires .Cependant, selon Caillet et Lacroix(2007), les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'HE selon le type d'aliment considéré. Les HE s les mieux adaptées pour l'application sur la viande et les produits carnés sont : l'eugénol, la coriandre, clous de girofle, l'origan et le thym.

Des chercheurs de l'université de Gand, en Belgique, ont étudié l'effet des HE du basilic et du thym et de leurs principaux composants (thymol, estragol, carvacrol, linalol et *p*-cymène). Ils ont testé leur impact sur le développement de bactéries *Shigella* par une méthode de diffusion sur gel d'agar et directement sur de la laitue.

Selon leurs résultats, l'application d'une solution d'HE du thym, du thymol, ou du carvacrol, concentrée à 0,5 % a entraîné une diminution significative de la population de la bactérie. En portant les concentrations à 1 %, la décontamination a amené la population à un niveau indétectable (Zarnovican, 2004).

Tout d'abord l'application de ces trois (03) HE sur la viande aux concentrations indiquées semble amélioré la stabilité antimicrobienne de cet aliment, d'une part .D'autre part, l'ajout de ces HE en tant qu'additif naturels contribue à une amélioration des caractéristiques organoleptiques, essentiellement le goût et l'odeur ; sans oublier que ces HEs ont un pouvoir antioxydant de longue durée, empêchant l'apparition des goûts de rance (traités dans partie II de la partie expérimentale).

D'après SANCHEZ et al. ( 2003) ont rapporté que l'usage d'extrait d'origan à différentes concentrations a permis de retarder l'apparition des signes d'altération organoleptique des produits carnés , également d'après Dorman et Deans (2000 ) , qui ont observés l'activité antibactérienne de cératines HEs des plantes telles que : l'origan (*Origanum Copactum* ) , contre 25 genre bactériens *in vitro*. Ils ont conclu que l'ajout de ces extraits aux produits alimentaires ne causerait aucune modification des propriétés organoleptiques , et retardait la contamination microbienne .

On souligne également que le panel des consommateurs n'a pas perçus d'odeur extrême liée à la présence de ces HE dans la viande, car la majorité de cette odeur disparaît après

cuisson des viandes due à la perte des composés volatils odorants sous l'effet de la chaleur. Quant à l'assaisonnement, il n'apporte pas de changement significatif au goût, probablement parce que les HE sont connus pour être rehausseur de goût.

Plusieurs auteurs ( Lachwicz et coll ., 1998 ; Cosentino et coll ., 19999 ; Nielson et Rios ., 20000 ; Skandamis et Nychas., 2001 ) , confirment que les HE sont utilisés dans la conservation des denrées alimentaires elles y sont rajoutées pour rehausserle gout et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires .

On observant les résultats de ces tests sensoriels, il apparait clairement que ces HE appliquées à leur CMI x 2 sur la viande ont un impact significatif sur les paramètres du goût et d'odeur des aliments (les deux paramètres sont perceptibles par les testeurs). Une étude réalisée par Caillet et Lacroix en 2007 montre cependant qu'un ajout en très faible quantité d'HE n'altère pas les qualités organoleptiques de l'aliment. Plusieurs travaux ont été réalisés dans ce contexte, à savoir : les propriétés organoleptiques d'une viande de bœuf hachée contenant 1% (volume/poids) d'HE d'origan ont été améliorées durant un stockage sous un emballage sous vide et sous une atmosphère modifiée à 5 °C (Skandamis et Nycha, 2001).

La conservation de la saveur de filets de boeuf traités avec 0,8 % (volume/poids) d'HE d'origan a été réussie, après un stockage à 5°C et après cuisson (Tsigarida et al ., 2000, Oussalah (2) et al ., 2006).

Il serait judicieux d'effectuer en parallèle des tests microbiologiques, des tests sensoriels afin de pouvoir déterminer la dose perceptible par nos sens (odorat et goût), et afin de ne pas déstabiliser le consommateur et éviter qu'il ne rejette les aliments traités avec des HE.

Par conséquent, les propriétés sensorielles en termes d'acceptabilité des viandes traitées avec ces composés sont en général acceptables par les panélistes.

Les réponses données par le panel pour ce test sensoriel sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau XVI:** Résultats du test sensoriel

	HE	Odeur avant cuisson	Odeur après cuisson	Goût avant assaisonnement	Goût après assaisonnement
Testeur 1	Témoin	1	1	1	1
	Origan	4	2	3	3
	Thym	3	1	3	3
	Laurier	3	1	2	2
	mélange	4	3	2	3
Testeur 2	Témoin	1	1	1	1
	Origan	3	1	3	4
	Thym	3	2	1	3
	Laurier	2	1	2	2
	mélange	4	2	3	3
	Témoin	1	1	1	1

Testeur 3	Origan	3	1	4	4
	Thym	3	2	3	2
	Laurier	2	1	3	3
	mélange	3	2	1	4
Testeur 4	Témoin	1	1	1	1
	Origan	4	2	3	3
	Thym	2	1	2	2
	Laurier	3	1	2	2
	mélange	3	1	3	3
Testeur 5	Témoin	1	1	1	1
	Origan	4	1	2	4
	Thym	3	1	2	2
	Laurier	2	1	2	2
	mélange	3	1	4	4

L'origan est l'HE la plus forte en odeur et en goût. En effet, elle est la seule HE à savoir obtenu des valeurs de 4 (fortement perceptible) et a reçue à la note de 3 (moyennement perceptible), alors que l'HE du thym est moins forte, celle de laurier est moins forte aussi en odeur et en goût que l'HE d'origan.

On note que les goûts forts et acres de ces huiles rendent la viande plus appréciée du point de vue organoleptique.

## Partie II

### Test anti-radicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre

#### II.1.La détermination de la valeur EC50

L'EC50 a été apparemment introduit par Brand-williams et ses collaborateurs et elle a été ensuite employée par plusieurs groupes de chercheurs pour représenter leurs résultats.

Elle définit la concentration efficace de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre « DPPH ». Les différentes figures présentées ci-dessous présentent les valeurs EC50 des différentes des huiles étudiées.

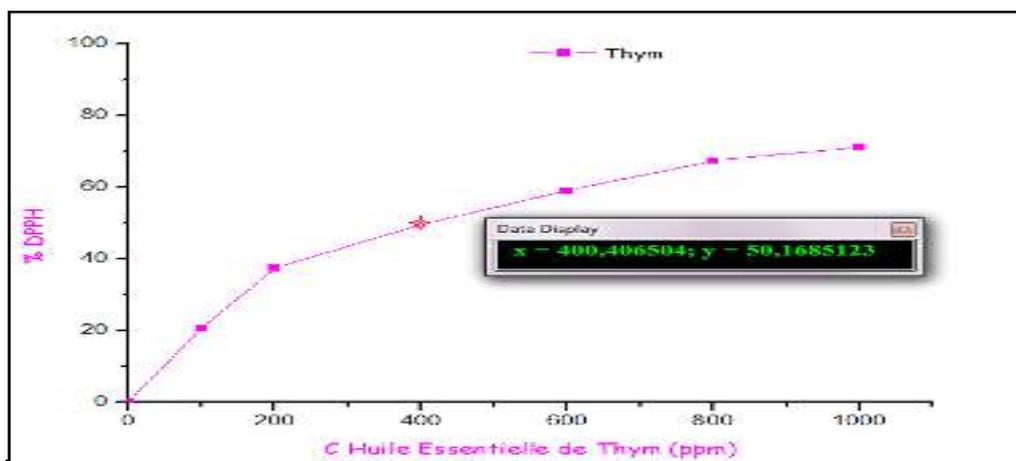
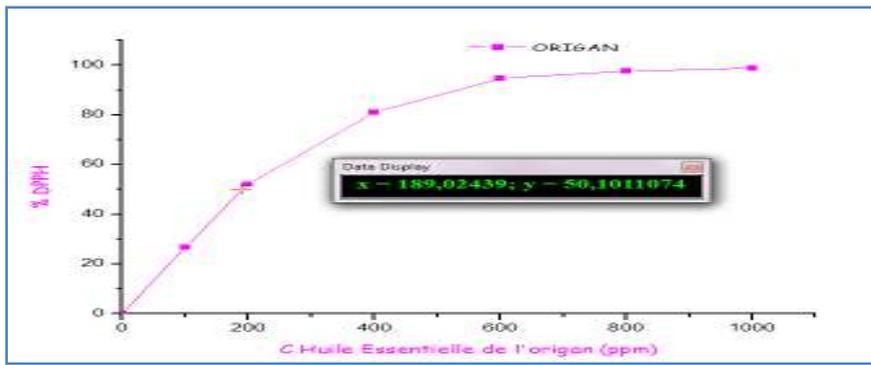
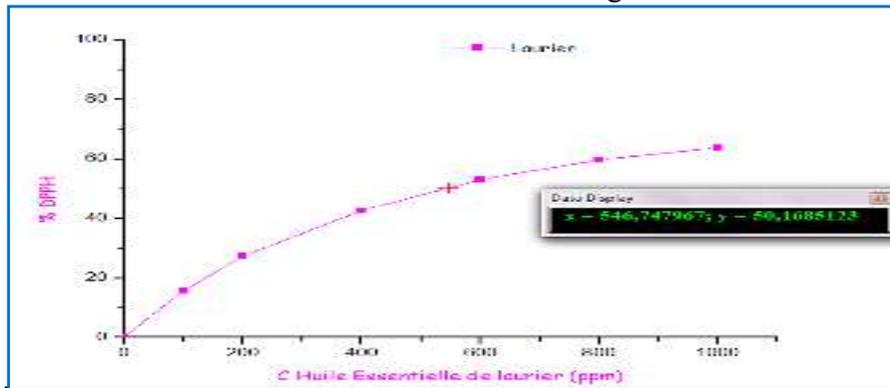


Fig.29 : variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de l'HE de Thym

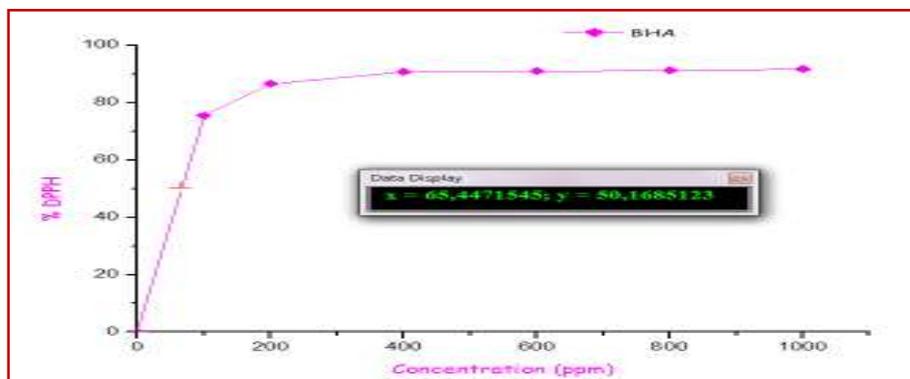


**Fig.30** :variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de l'HE d'origan

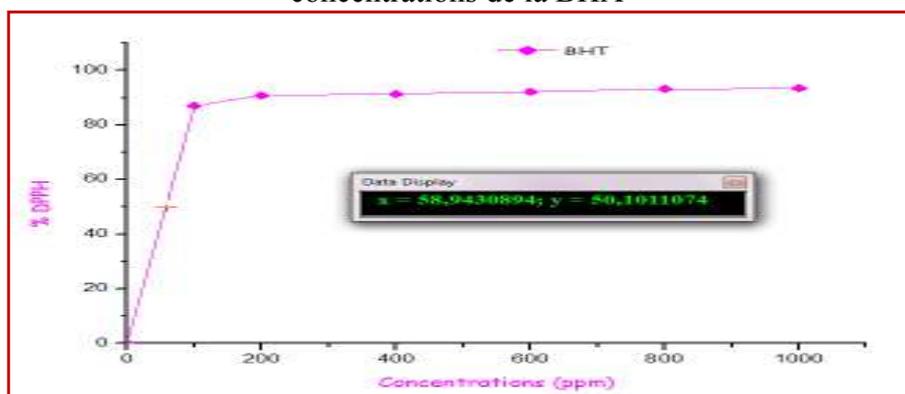


**Fig.31** :variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de L'HE de laurier

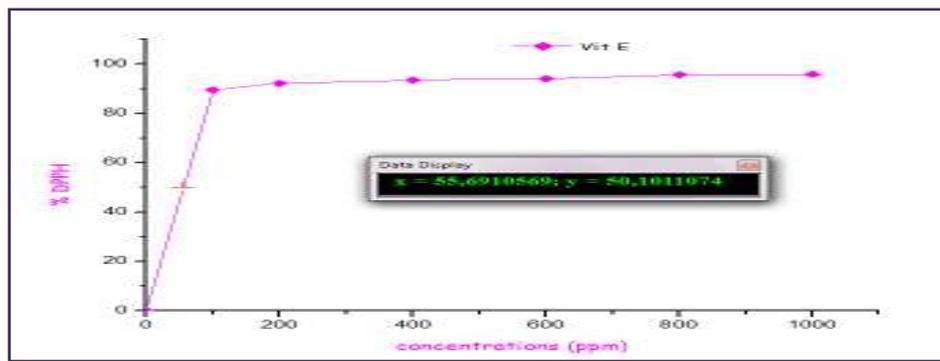
- Détermination de la EC 50 des différents antioxydants de synthèse (BHA, BHT, Vit E) les résultats sont présentés dans les graphes des figures ci \_ dessous.



**Fig.32**: variation du taux de piégeage du DPPH ( I%) en fonction des différentes concentrations de la BHA

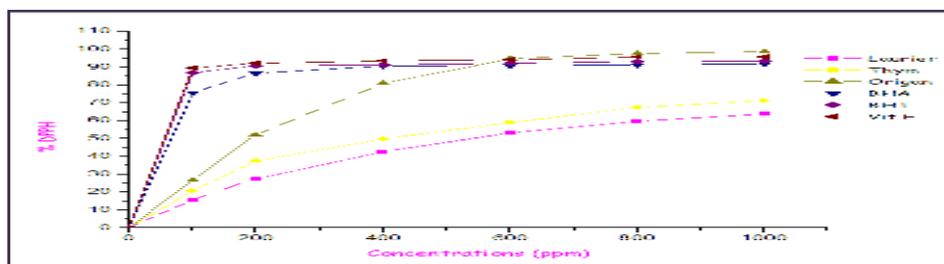


**Fig.33** :variation du taux de piégeage du DPPH (I%) en fonction des différentes concentrations de la BHT



**Fig.34 :** variation du taux de piégeage du DPPH ( I%) en fonction des différentes concentrations de la vitamine E

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles testées, il a été estimé par comparaison avec des antioxydants de synthèse (BHT, BHA et vitamine E). Les résultats obtenus sont illustrés par le graphe de la figure35.



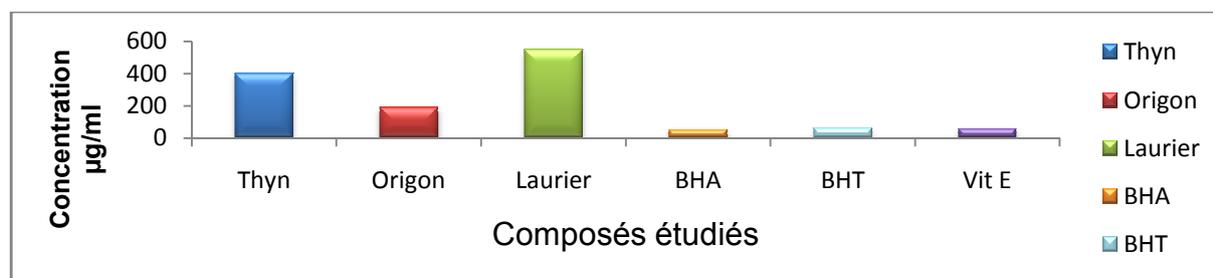
**Fig.35:** variation du taux de piégeage du DPPH ( I%) en fonction des différentes concentrations de nos HES avec les antioxydants de synthèse.

## II.2. Comparaison des valeurs des EC 50

Les EC50 des H.E. du thym, laurier et l'origan ainsi que les antioxydants standards BHA, BHT, et la vitamine E, sont déterminées graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en (%). Les résultats déduits sont regroupés dans le tableauXIV

**Tableau XVII :** les valeurs des EC des différentes plantes avec les antioxydants de synthèse

Composés	Valeurs des EC 50 (µg/ml)
Vitamine E	55,69
BHA	64,45
BHT	58,94
Thym	400,40
Origan	189,02
Laurier	546,75



**Fig.35 :** Comparaison des valeurs EC50 de nos huiles avec les antioxydants de synthèse et les antioxydants standards

### II.3. Discussion concernant l'activité antioxydante de nos huiles :

On peut dire que nos HEs présentent une activité antioxydante et que la capacité de piéger le radical libre DPPH est intéressante. Benzie et Strain (1996) ont considéré l'antioxydant comme toute, molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice. Cependant, le pouvoir antioxydant d'un antioxydant n'est pas nécessairement égale à sa capacité de réduire le DPPH

- **L'HE de *Thymus vulgaris*** : L'activité antiradiculaire et antioxydante de l'HE de *Thymus vulgaris* ont été testés par Bouhdid et ses collaborateurs (2006), par la même technique, le pouvoir antioxydant manifesté a été interprété par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'HE. La grande capacité de réduction des radicaux libres de l'essence de *Thymus vulgaris* est principalement due à son profil chimique riche en thymol.

L'activité antioxydante de cette essence a été évaluée au moyen du test DPPH et la concentration qui fournit 50% d'inhibition (EC50) calculée graphiquement à partir de la courbe de la figure 29 (au moyen du logiciel Origin) elle est de l'ordre de 400 µg/ml, mais le pouvoir antioxydant des antioxydants de synthèse reste supérieur à l'HE de thym étudiée, cette valeur est supérieure à celle obtenue par Amrati et al., 2011 (75, 97 µg/ml), avec l'HE de *Thymus zygis*, et pas loin à celle obtenue par Anahi et al. (2010) avec une valeur de EC50 qui est de l'ordre de 500 µg/ml pour la même essence. On peut dire aussi que la valeur trouvée pour notre essence est supérieure aux autres espèces de *Thymus* plusieurs travaux ont été réalisés dans ce contexte (BOUNATIROU et al., 2007 ; SAFAI-Ghomi et al., 2009 ; SOKMEN et al., 2004 ; STHL BISKUP et al., 2002).

Jukic et Milos (2005) : ont montré dans une étude portant sur l'HE de *Thymus vulgaris*, que les chémotypes phénoliques (thymol et le carvacrol), et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chémotypes phénoliques.

- **L'HE d'*Organum floribundum*** : avec une EC 50 égale à 189µg/ml, reste tjrs supérieure ceux de synthèse tout comme L'HE de thym et de laurier.

Car d'après BRUNTONS (1999) : « le thymol composé majeur de l'HE aussi bien que la carvacrol sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH et inhibent la peroxydation lipidique ».

En effet, les constituants phénoliques ( carvacrol et thymol ) ont déjà prouvé leur fort pouvoir antioxydant .Ces deux composés phénoliques et majoritaires respectivement des HE du Thym et d'Origan , grâce à leurs propriétés d'oxydoréduction , agissent en tant qu'agent réducteurs , donateurs de l'hydrogène et de l'oxygène singulier ( Rice –Evans et *al .* , 1995).D'après (Chikoune .2004) le carvacrol et thymol sont considéré comme étant des antioxydants primaires mais ils ne sont pas exclusivement responsables de cette activité puisque des composés minoritaires peuvent y participer.

Fessas et *al .*(2007 ) ont évalué l'activité antioxydante de deux HE d'origan et de la sauge à une concentration de 2,5% dans les viandes porcine et bovine conservées pendant une période de 12 jours à 4°C.L'HE d'origan parait plus puissante que la sauge qui a entraîné une baisse d'oxydation des lipides dans les deux types de viande.

« L'efficacité relative des HE de ces trois espèces peut être attribuée à la présence de composés phénoliques à savoir le thymol et le carvacrol qui sont considérés comme étant des antioxydants primaires mais ils ne sont pas exclusivement responsables de cette activité puisque d'autres composés dits minoritaires peuvent y participer ».

#### ❖ **L'HE de *Laurus nobilis*** :

Avec une valeur de EC 50 égale a 546,74 µg/ml cette huile, semble avoir une bonne activité antioxydante , due probablement a son composé majoritaire qui est 1, 8 cinéole , cette activité a été démontré et étudiée par Ferreira et ses collaborateurs en 2006 pour la même huile avec un extrait méthanolique et la décoction qui ont montré des valeurs élevées pour la même activité de chaqu'un de ces extraits.

Dans une autre étude, Demo et al. (1998) ont démontré la présence des tocophérols (vitamineE), principalement le tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenue dans la fraction apolaire par extraction hexane. Dans cette étude on rapporte que le contenu tocophérol est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles.

Ces résultats préliminaires ont confirmé que l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arome plaisant, mais probablement aussi a des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles et d'autres pièces de cette plante

Toutes les espèces étudiées manifestent une certaine activité antioxydante en comparaison avec les antioxydants de synthèse. Le degré d'inhibition de l'oxydation lipidique varie en fonction de la concentration de l'HE et de la méthode employée. Dans la majorité des cas l'HE d'origan reste toujours la plus active suivit par celle de thym et de laurier.

Cependant, on a prouvé que l'activité antioxydante des composés majoritaires testés séparément donne souvent des résultats inférieurs comparés à l'activité de la totalité de l'HE (Safaei-Ghomi et *al.*, 2009). En général, les interactions synergiques entre les différents constituants d'une HE sont à l'origine d'un pouvoir beaucoup plus important (Ruberto et Berrata (2000); Vardar-Unlu et *al.*, 2003).

On conclusion, le pouvoir antioxydant des HE testées et celui du BHT, BHA, et vitamine E dépend essentiellement de la méthode utilisée, de la concentration, de la nature et les propriétés physicochimiques et des substances antioxydantes employées (Koleva et *al.*, 2002).

Nos H.E en général, ont présenté un bon pouvoir antioxydant, ce qui est confirmé par la bibliographie

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés biologiques très intéressantes à mettre à profit pour préserver les viandes des pathogènes.

En se basant sur les résultats obtenus, on peut conclure que les HE étudiées exercent une activité antimicrobienne sur les souches étudiées, ainsi qu'une activité antioxydante intéressante. Les résultats obtenus suite à leur application sur une matrice alimentaire, nous laisse à penser que ces métabolites peuvent être utilisés comme agents de conservation naturels et efficaces utilisés pour limiter les empoisonnements d'origine bactérienne.

Il faut signaler que les activités biologiques d'une HE ne sont pas seulement dues aux composés majoritaires, mais plutôt à l'ensemble des composés de base. Cette étude mérite d'approfondir les mécanismes d'action de ces composés purifiés, et une recherche plus avancée sur la synergie de ces derniers. D'où la nécessité de faire une analyse aux HEs par un couplage CG/SM.

Les viandes traitées avec des HE ont présenté une amélioration prononcée, du point de vue organoleptique à savoir le goût et l'odeur mais aussi microbiologique.

En perspectives, il serait souhaitable :

- D'effectuer des analyses physicochimiques sur les viandes traitées tout comme : le suivi de la cinétique d'activité antioxydante durant le stockage de la viande par la méthode des **r-TBA**, l'indice de peroxyde, ainsi que l'effet sur l'azote basique volatil total.
- Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments, tout comme la vérification de leur innocuité par des tests de toxicité et d'allergénicité.
- Afin d'améliorer la stabilité de l'HE et sa disponibilité biologique, des techniques récentes d'encapsulation en liposomes semblent résoudre ce problème, et nous laissent un grand espoir quant à la facilité d'utilisation future des HEs dans différents aliments.
- Des combinaisons de ces huiles avec d'autres substances naturelles (bactériocine) ou avec un conditionnement de la viande sous atmosphère modifiée riche en CO<sub>2</sub> permettent de bénéficier d'une plus longue conservation et la sécurité sanitaire du produit.

- Les HES à activité bactéricide, et fongicide, et antioxydante peuvent être inclus dans la composition de solutions volatiles, pour une pulvérisation directe sur les carcasses de viandes pour éviter d'éventuelles contaminations et prolonger la durée de stockage au frais.

- Les HES étant volatils, on peut envisager leur utilisation en tant qu'agent de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air des systèmes de climatisation, notamment, dans les locaux d'abattage et de stockage des carcasses de viandes

(le « *Paragerm* », solution volatile utilisée pour la désinfection des locaux s'est révélé sans toxicité pour l'homme aux doses utilisées).

À l'issue de ce travail, nous pouvons confirmer l'intérêt des HES offrant ainsi un patrimoine à préserver, à valoriser et à exploiter dans les industries agroalimentaire (IAA), en tant que conservateurs « bio » .

## Annexe

### Matériel non biologique

Appareillages	Verreries et autres	Réactifs et solutions
- Balance analytique - Chauffe ballon - Support - Réfrigérant - Thermomètre - Hotte - Bain marie - Bec bunsen - Etuve d'incubation -Plaque chauffante -Balance hydrostatique -Réfractomètre -Vortex	- Ballon de 1000ml - Entonnoir - Béchers - Ampoule à décantation de 500 ml - Pipettes - Poire - Flacon ombré - Fioles jaugées - Eprouvette - Tubes à essai stériles - Pipettes graduées - Boites de pétri - Disques en papier - Pince de laboratoire -Seringue -Cristallisoir	- Eau distillée - Sulfate de sodium $Na_2S$ - Ethanol -Diethyl ether -Méthanol -Phénol phtaléine -Hydroxyde de potassium -Carraghénine -Tween 80 -Eau de javel -Eau physiologique

#### Tests de confirmations biochimiques

- **Coloration de Gram**

Les souches que nous avons utilisées ont été préalablement confirmé par le service donneur, mais nous avons précédé a confirmer quelques paramètres biochimiques et culturaux.

Pour chacune des souches un pré-enrichissement a été effectué sur le milieu d'isolement sélectif puis une coloration de Gram a été réalisée après 24h d'incubation à 37°C selon les étapes suivantes :

- ✓ Préparer un frotti ;
- ✓ recouvrir le frotti avec de violet de Gentiane ; laisser agir 1 mn ; rincer à l'eau distillée ;
- ✓ verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 mn ;
- ✓ décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- ✓ fixation avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ; - sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;
- ✓ observation au microscope optique à l'objectif x40 ensuite passage au x100 avec l'ajout de l'huile à immersion, les Gram+ se colorent en violet tandis que les Gram- apparaissent colorés en rose. Le tableau III montre les observations notées

- **Test de l'oxydase**

Ce test permet de différencier les bactéries Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont oxydase négatif, des bactéries Gram négatif de la famille des *Pseudomonaceae* qui sont oxydase positif (Selon le schéma ci-dessous).

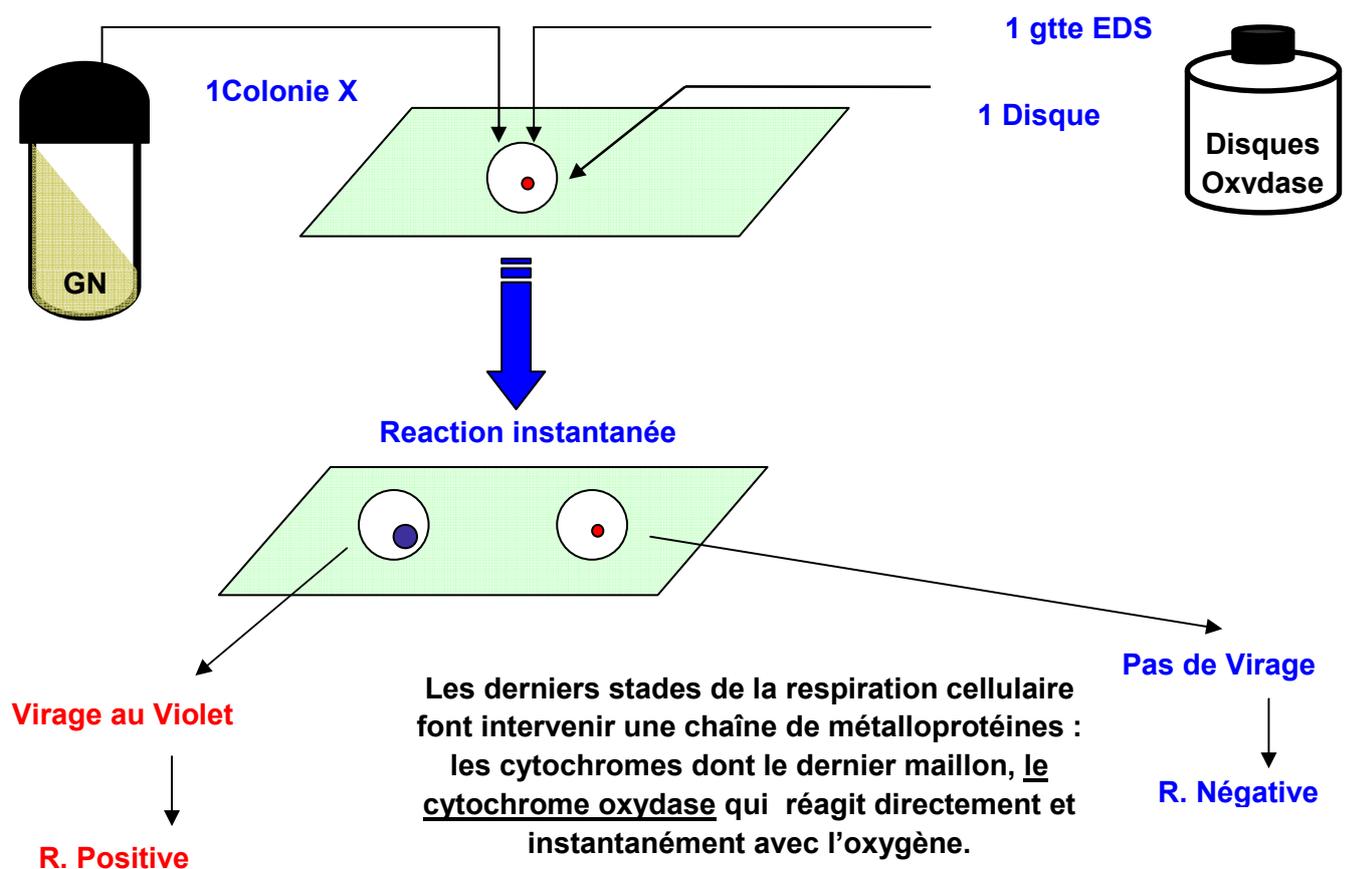
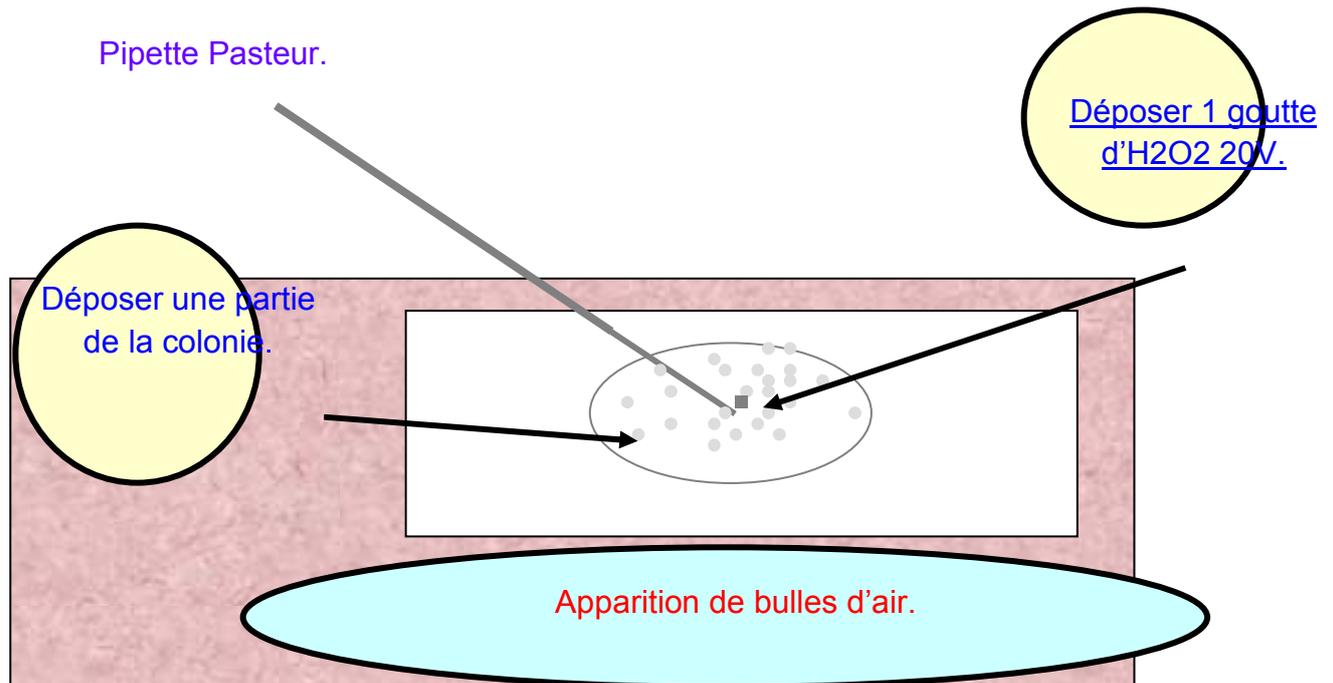


Fig.36: Schéma illustrative test d'oxydase ( Dr. Lebres 2004 , IPA ).

➤ **Confirmation de l'espèce *Staphylococcus aureus***

• **Test de la catalase**

Ce test permet de différencier les bactéries Gram Positifs de la famille des *Micococcaceae* qui sont catalase positive, des bactéries Gram positif de la famille des *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae* qui sont catalase négative.



Observation à l'œil nu ou au microscope.

La catalase agit en dégradant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (eau oxygénée) en H<sub>2</sub>O et oxygène et l'effervescence se traduit par un dégagement gazeux, ce qui signifie que cette souche est à catalase +.

Fig.37: Schéma illustrative test de catalase (Dr. Lebres 2004, IPA).

• **Test de Coagulase libre** (d'où le nom de Staphylocoagulase)

Parmi les cocci à Gram+ et catalase+, les souches de *S. aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté de lapin en 24 h, les autres espèces et sous-espèces de staphylocoques d'origine humaine ne possèdent pas la coagulase libre sauf *S. schleiferis* subsp. *Coagulans* (DELARRAS, 2007). La production de coagulase permet de différencier *S. aureus* de *S. epidermidis* et des *Micrococcus*.

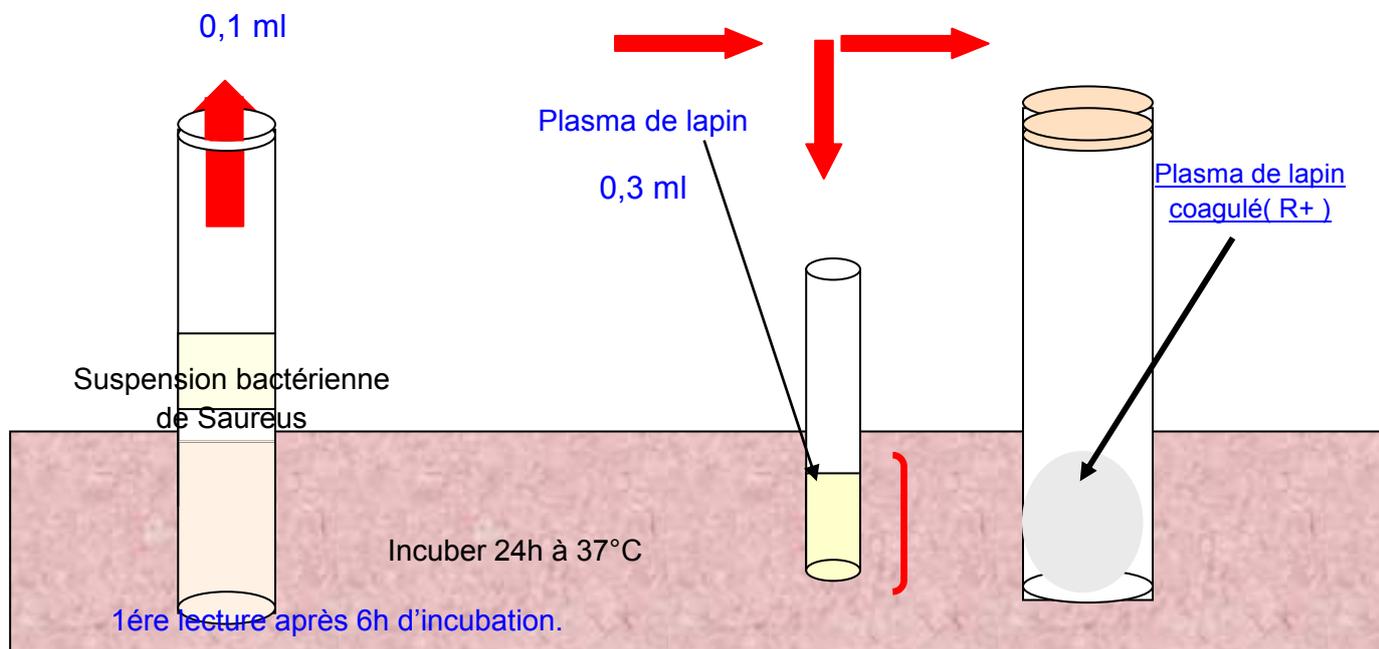


Fig.38: Schema illustratif test de Coagulase ( Dr. Lebres 2004 , IPA ).

## Thym

Tableau XVI: Analyse semi quantitative de l'HE de l'HE de thym de Bouguara par CG/SM

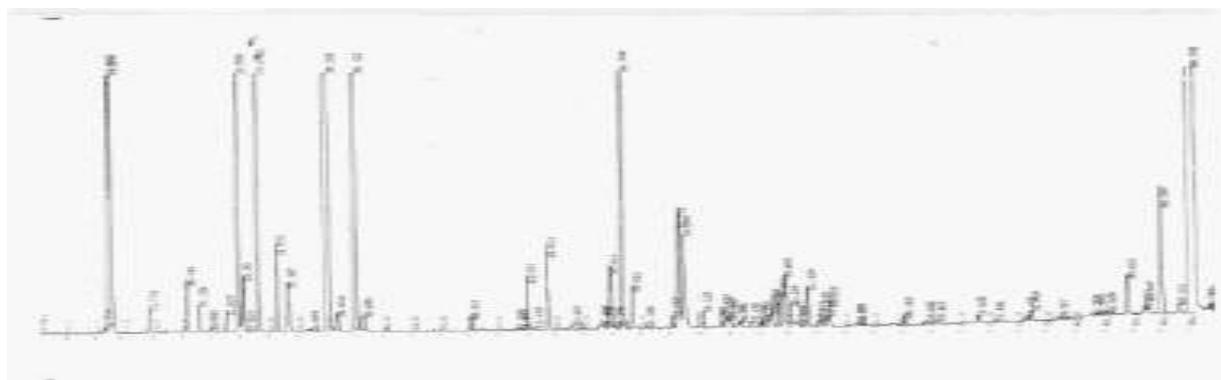


Figure 39 : Chromatogramme de l'HE de *Thymus Vulgaris*

## Origan

R	Composé R	IR <sub>R</sub>	%	Identification <sub>R</sub>
1R	Methyl isovalerate <sub>R</sub>	765R	01R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
2R	(E)-2-Hexenal <sub>R</sub>	850R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
3R	3-hexen-1-ol <sub>R</sub>	862R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
4R	3-Heptanone <sub>R</sub>	887R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
5R	Tricyclene <sub>R</sub>	923R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
6R	α-Thujene <sub>R</sub>	925R	3.7R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
7R	α-Pinene <sub>R</sub>	939R	2.2R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
8R	Camphene <sub>R</sub>	951R	01R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
9R	Sabinene <sub>R</sub>	973R	02R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
10R	β-Pinene <sub>R</sub>	978R	03R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
11R	1-Octen-3-ol <sub>R</sub>	988R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
12R	β-Myrcene <sub>R</sub>	992R	2.9R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
13R	α-Terpénone <sub>R</sub>	1017R	05R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
14R	β-Caryophyllène <sub>R</sub>	1026R	13.5R	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
15R	Limonène <sub>R</sub>	1044R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>
16R	β-Phellandrene <sub>R</sub>	1045R	tc	c <sub>R</sub> g <sub>R</sub>

Tableau : Analyse semi quantitative de l'HE de l'origan de Chr a par CG/SM

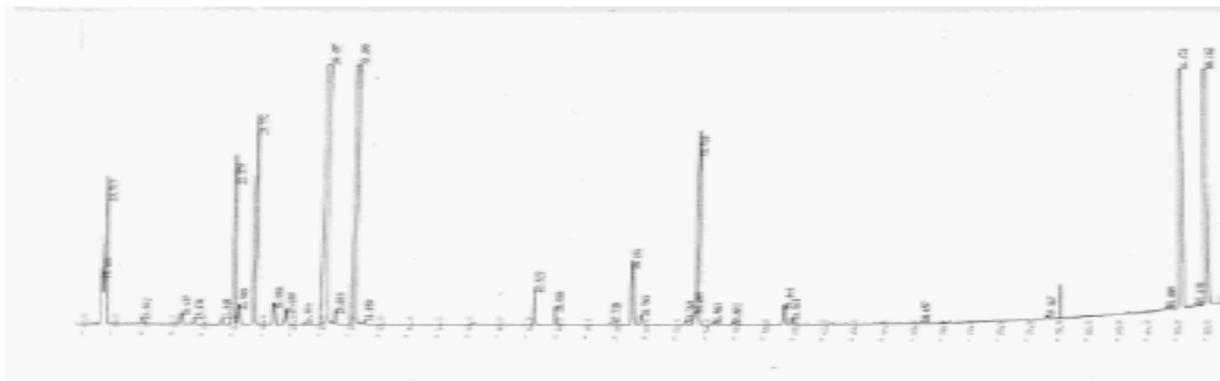
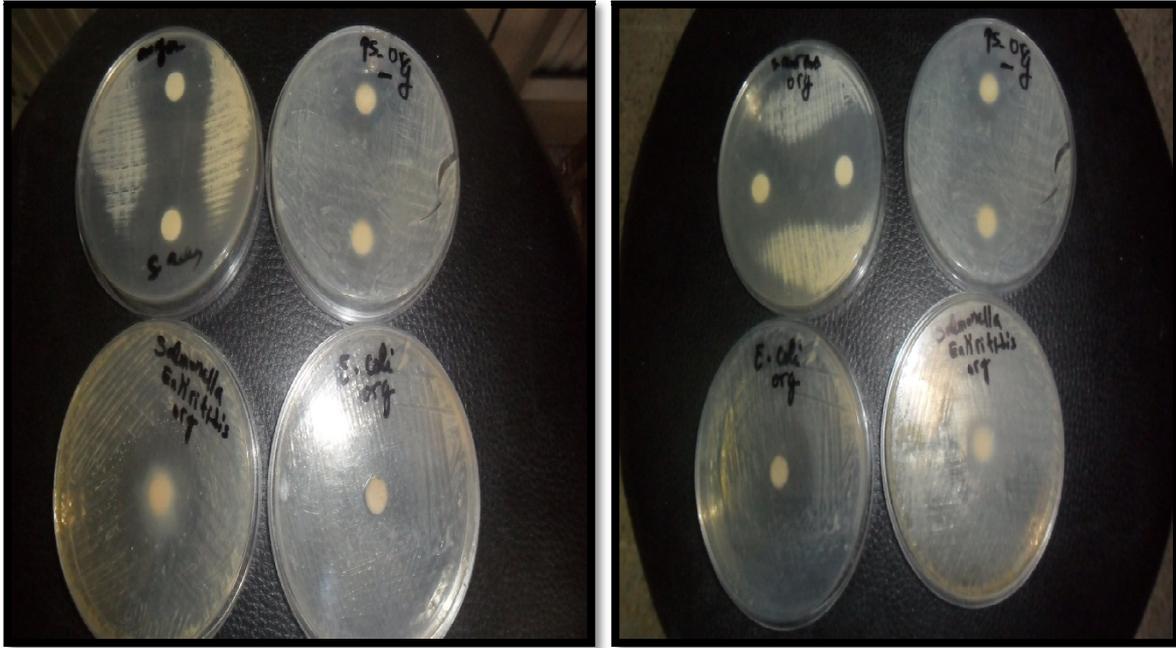


Figure 40 : Chromatogramme de l'HE d'Origanum floribundum



*Figures 41 : aromatoigrammes de l' HE d' origan*



*Figures 42 : aromatoigrammes de l' HE de laurier*



Figures 43 : aromagrammes de l' HE de thym

- 1. Abdul Rahman M.S., Thangaraj S., Salique S.M., Khan K.F. and Natheer S.E., 2010.** Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. Internet Journal of Food Safety, Vol.12, pp. 71-75.
- 2. Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A. and Rebiahi S.A., 2011.** Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). J. Nat. Prod. Plant Resour., 1 (1): pp. 33-36.
- 3. Afnor, 2000.** Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- 4. AFSSA (Association Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2006).** Hygiène domestique. CHU Bordeaux, (France).
- 5. Ağaoğlu S., Dostbil N. and Alemdar S., 2007.** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bull Vet Inst Pulawy 51, pp.53-57.
- 6. Agnet. (2011),** formation Nosoclean , contrôle microbiologique des aliments –Manuel technique . , polytech Département STIA ).
- 7. Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A. and Ahmad M., 2006b.** Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. Internet Journal of Food Safety, Vol. 5, pp.56-60.
- 8. Ahmad N. (2005).** Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis, J. Drug. Target. 13, 555-61.
- 9. Alais C., Linden G. et Midlo L., 2003.** Biochimie alimentaire. Ed : Dunod, 245 (5) :51-71.
- 10 .Alitonou G.A., Avlessi F., Sohounhloue K.C. Allisnet D., (2008).** Aromathérapie - Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. Fondation pour le Libre Choix.
- 11. Amarti F. et al. 2008.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. Phytothérapie, 6, 342-347.
- 12. Amiot J. (2005)** *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- 13. Pariente L. (2001)** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.

14. **Anahi DS, Sofi LA, Mendes MD, (2010)** Antioxydant activity of six portuguse thyme spieces oils .J Flavour Fragr 25 : 150-5.
15. **Anon, 2003.** Major groups, families and Genera: Lamiaceae (Labiatae). Science and Horticulture, Royal Botanic Garden. Kew UK.
16. **Avril J.L. (2000).** Bactériologie clinique. 3ème Edition.
17. **Azzoudj S., 1999.** Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'Origanum et thymus spontanées en Algérie. Thèse Ing., Institut d'Agronomie, Blida.
18. **Bagamboula C. F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004).** Inhibitory effect of thyme and basil es sential oils, carv acrol, th ymol, estragol, linalool and p-cymene toward s Shigelle sonnei and S. flexneri. Food Microbiology. 21, 33-42
19. **Bajpai V.K., Shukla S. and Kang S.C., 2008.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of Silene armeria L. Bioresource Technology 99: pp.8903- 8908.
20. **Bardeau F., 2009.** Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edit LANORE. Paris: 333p
21. **Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A., 2010.** Antibacterial and antifungal activity of Solanum torvum (Solanaceae). Int. J. Agric. Biol., 12: pp. 386-390.
22. **Barla A., Topçu G., Öksüz S., Tümen G., Kingston D.G.I., (2007)** Identification of cytotoxicsesquiterpènes from Laurus nobilis L., *Food chemistry* **104**: 1487-1484.
23. **Barral J., Boivin J., Coudurier S., Desmazieres C., Gonzalez A., Guidez F., Lapotre A., Megy F. (2007).** Valorisation des effets antimicrobiens de l'huile essentielle de lavandin Grosso. ONIPPAM, 1- 67.
24. **Baser K.H.C., Ozek T., Kurkuoglu M and Tumen G. ,1992** .Composition of the essential oil of Origanum sipyleum of Turkish origin. Journal of Essential Oil Research, 4, 139-142.
25. **Baser K.H.C., Ozek T., Tumen G. and Sezik E., 1993.** Composition of the essential oils of Turkish Origanum species with commercial importance. Journal of Essential Oil Research , 5619-623.
26. **Bassole H.N., Kabore Z. and Traore A.S., 2002.** Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. Pharm. Med.trad.afr, Vol.11, pp. 113-122.

- 27. Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., and Karadogan T., 2004.** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control 15: pp.169-172.
- 28. Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T. (2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Control. 15, 169-172.
- 29. Bekhechi, C., Atik- Bekkara, F., Abdelouahid, D.E.** « composition et activité antibacterienne des huiles essentielles d'Origine glandulosum d'Algerie », departement de biologie, universite Abou Bekr Belakaid, Imma Tlemcen, Tunisie, édition Springer, (2008), p153, 157.
- 30. Belletti N., Nidagijimana, M., Sisto C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. & Gardini F. (2004).** Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52 (23), 6932-6938.
- 31. Beirão A.R.B. and Bernardo-Gil M.G., 2006.** Antioxidants from Lavandula luisieri. 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal ; 8p.
- 32. Bekhechi C., Atik-bekkara F., Abdelouahid D. E., 2008.** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie. *Phytothérapie*.6 153–159.
- 33. Belghazi L., Lahlou N., Alaoui I., Abousaouiria T., Habti N., Tantaoui IA., Talbi M., Blaghen M., Fellat-Zarrouk. (2002).** Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de biochimie. Casablanca. *Biochimie et santé*, 38-40.
- 34. Belhattab R., Larous L., Cristina Figueiredo A., Santos Pedro A. G., Barroso José G. et Pedro Luis G., 2005.** Origanum glandulosum Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragrance Journal*, 20, 209–212.
- 35. Beloued A. (2005)** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger. Pp : 124.
- 36. Benjilali B., Tantaoui-Elara A., Ismaïli-Alaou M., et Avadi A., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome XX, n° 2, p. 155-167.
- 37. Berghe V. A. et Viletinck, A. J., 1991.** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*. 6: 47-68.
- 38. Bougandoura N. ( 2012 )** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.

- 39. Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J., 2006.** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09- 12 Mai 2006.
- 40. Boukhatem, M.N.,** « Extraction, caractérisation des huiles essentielles du *Geranium rosat* et formulation d'une pommade à effet cicatrisant », thèse de magistère en Biotechnologies végétales, faculté des sciences agro-alimentaire et biologique, Université Saad Dahleb, Blida, (2010), p106
- 41. Boulaghmen, F.,** « Extraction des huiles essentielles de l'origan », mémoire de magister en biologie, Département de biologie, Faculté des Sciences Agro-vétérinaires et biologiques, Université Saad Dahleb-Blida, (2012), p49, 80, 95.
- 42. Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., Zucca, J.** La microflore de la viande. In : Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Paris : Lavoisier, 1996. TOME 1, 336-345.
- 43. Bousbia N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie).
- 44. Boyer J., Claude J, et Aube G. (1995),** la charcuterie de poisson et fruit de mer. Les publications du Quebec 1995.P: 55-60.
- 45. Bratta M.T. et al.,** Chemical and antioxidative activity of laurel , sage rosemary , oregano and coriander essential oils , J.Essent , oil Res ., 1998, 10 : 618-27.
- 46. Brosse J., 2004.** Larousse des Arbres : dictionnaire des arbres et des arbustes. Edit Messageries : Canada : 571p.
- 47. Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3ème édition, Paris.
- 48. Brunetons J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, Tech. et doc., 3èmeEd., Paris. Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1999. Monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland: OMS.
- 49. Burits M., & Bucar F.,2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 14, p:323–328.
- 50. Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: areview. International Journal of Food Microbiology 94, pp.223-253.
- 51. Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C., Rodrigues M.R.A., Corazza F.C., Corazza M.L., Vladimir O. J., Cansian R.L (2008).** Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology. 25, 207-211.

- 52. Caillet S. et Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). pp. 1-8.
- 53. 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).
- 54. Caldefie-Chezet F., Guerry M., Chalcat J.C., Fusillier C., Vasson M.P. & Guilloteff J., 2003.** Anti-inflammatoire et bactéricide de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* sur les polynucléaires neutrophiles humains : étude in vitro. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142, pp.113-142.
- 55. Carmo M.M., Frazao S. and Venancio F., 1989.** The chemical composition of Portuguese *Origanum vulgare* oils. Journal of Essential Oil Research, 1, 69-71.
- 56. Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V., 2006.** *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clinical Microbiology Reviews. 19 (1): 50–62.
- 57. Carson C.F., Riley T. V. (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology. 78, 264-269
- 58. Cattoir V., 2006.** Etude in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène. Cours de DCEM1 - Faculté de Médecine de Créteil, France.
- 59. Cavalli, S.** Application de la méthode HACCP en établissement d'abattage : modèles théoriques et essai de mise en place. Th. : Med.vet. : Lyon. E.N.V.L. : 2003 ; thèse n°14. 132 p.
- 60. CE, 2001.** Commission Européenne : proposition de la commission en matière de lutte contre la résistance microbienne. Bruxelles. In Kechkar M., 2008. Extraction de Silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine. Algérie, 99p.
- 61. Celikel N. & Kavas G. (2008).** Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech Journal of Food Science, 26, 174-181.
- 62. Chami F., 2005.** Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.
- 63. Chahardehi A.M., Ibrahim D., and Sulaiman S.F., 2010.** Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of *Pilea microphylla*. *International Journal of Microbiology*, Article ID 826830, 6p

- 64. Chifundra K., Bury W M., Kizungub, 1990.** Screening photochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomocus* L., short communication phytotherapy. (535, 539) pp
- 65. Chikhoun A., 2004.** Huiles essentielles d'espèces endémiques algérienne : composition chimique et l'activité antioxydante vis a vis de l'huile de tournesol. Mémoire Ingénieur, INA, Alger, 118.
- 66. Chikhoun et Amirouche.,** « huiles essentielles de Thym et d'Origine », thèse de magistère en Agronomie option sciences alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, (2007), p178.
- 67. Clevenger JF ( 1928 )** Apparatus for the determination of volatile oil, J Am Pharm assoc 17 : 336-341.
68. Cohen N. et Karib H., 2006. Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés: Un réel problème de santé publique?. Les technologies de l'aboratoire. 1 : 4-9.
- 69. Collins, D. S., Gracey, J. F.** Food poisoning and meat microbiology. In: Meat hygiene, ninth edition. London : Baillière Tindall, 1992. 222-250.
- 70. Conner D.E. (1993).** Naturally occurring compounds. In: Antimicrobials in Food Davidson P, Branen AL, Marcel Dekker publishing company New York.
- 71. Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999)** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett. Appl. Microbiol. 29:130-35.
- 72. Coulon J.- B., Priolo A., 2002.** La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. INRA Productions Animales. 15 : 333-342.
- 73. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol. 88, 170-175.
- 74. Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M. G., Micieli D., 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 : 6300–6308.
- 75. Davidson P.M., Naidu A.S., 2000.** Phyto-phenol. In: Naidu, AS. (Ed.), Natural Food and Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL, 265–294.
- 76. Deans S.G., Svoboda K.P., 1989.** Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. Journal of Horticultural Science, 64,205–210.
- 77. Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS- EHESP, 87p.
- 78. Delarras C. (2007),** Microbiologie Pratique pour le laboratoire d' analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

- 79. Demirci F., Guven K., Demirci B., Dadandi M.Y., Baser K.H.C. (2008).** Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. *Food Control*. 19, 1159- 1164.
- 80. Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., Ddegirmencioglu A., (2004)** Mathematical modeling and the Determination of some Quality Parameters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3) :325-335
- 81. Demo A., Petrakis C., Kefalas P., Bosliou D., 1998,** Nutrient antioxidants in some herbs and mediterranean plants leaves. *Food Research international*. **31** (5) : 351-354.
- 82. Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2010.** GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.
- 83. Devriese L.A, Vancannayt M., Baele M., Vanechoutte M., De Graf E., Snauwaert C., Cleenwerck I., Dawynot P., Swincx J., Decostre A. & Staphylococcus pseudointermedius sp ;** a coagulase positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1569-1573.
- 84. Djenane D., Meddahi A. & Roncales P. (2006).** Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, 26, 37-73.
- 85. Djenane D., Sánchez-escalante A., Beltrán J.A. & Roncalés P. (2002).** Ability of tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, 407-415.
- 86. Djenane D., Yangüela J., Amrouche T., Boubrit S., Bousaad N. & Roncales P. (2009).** Algerian *Pistacia lentiscus* and *Satureja hortensis* essential oils ATCC 13932 inoculated in meat. New challenges in food preservation. Processing-Safety- Skandamis P.N. and Nychas G.J., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011 – 1022.
- 87. Dob T, Dahmane D, Chetghoum C-**Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *thymus algeriensis* –The international journal of Aromatherapy Vol016 ; PP 95-100.2006.
- 88. Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. & Menut C., 2010.** Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 1 (4): pp. 606-611.
- 89. Dorantes L., Colmenro R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E. & Solano C. (2000).** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology* **57**, 125-128.
- 90. Dorman D.H.G., Bachmayer O. , Kosar M . et Hiltunen R . , 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.

- 91. Dorman H. J. D. et Deans S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 308-316.
- 92. Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008.** Chemical composition, *antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus*. (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: pp.3632-3639.
- 93. Ettayebi K., Yamani J.E. & Rossi-Hassani B.D., 2000.** Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 183 (1), pp.191-195.
- 94. Fadli S., Kessi A., 2005.** Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles du thym et de l'origan : *Thymus numidicus* Poiret et *origanum floribundum* Munby. *Memoire Ingénieur*, INA, Alger, 92.
- 95. Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. & El-Baroty G. S. A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oil s. *Journal of Food Protection*, 52, 665-7.
- 96. Fasseas M.K. Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M. & Zervas G. (2007).** Antioxydant activity in meat treated with Oregano and Sage essential oils. *Food Chemistry*, 106, 1188-1194.
- 97. Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. (2006)** the in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacology*. 108: 31-37.
- 98. Fisher K., Rowe C. & Phillips C. (2007).** The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and food. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 495-499.
- 99. Foda M.I., El-Sayed M.A., Hassan A.A., Rasmy N.M. and El-Moghazy M.M., 2010.** Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science* ; 6 (5) : pp. 272-280.
- 100. Fosse, J., Magras, C.** Dangers biologiques et consommation des viandes. Paris : Lavoisier, 2004. 220 p.
- 101. Freeman L., Carel Y. (2006).** Aromathérapie. NUTRA NEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé. [http:// www. nutranews.org](http://www.nutranews.org)
- 102. Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007.** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- 103. Garland S., 1980.** Le livre des herbes et des épices. Ed.Fernand Nathan, Paris, 288.

- 104. Gergis V., Spiliotis V. & Poulos C., 1990.** Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sidertis spies* pharmacology, 45-70.
- 105. Guesmi A. et 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, 2002, Tunis.
- 106. Ghasemi P.A., Rahimi E. & Moosavi S.A., 2010.** Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95-3, pp.219-223.
- 107. Giordani R., Kaloustian J. (2006).** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytotherapie*. 3,121-124.
- 108. Gordon M.H., 1990.** The mechanism of antioxidant in vitro. "Food antioxidants": Ed. HUDSON B.J.F. pp: 1-18.
- 109. Guesmi A. et 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, 2002, Tunis.
- 110. Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998)** Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food chemistry*. **63** (3) : 373-383.
- 111. Guinoiseau, E.,** « molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, et identification et mode d'action », thèse de doctorat, école doctorale environnement e société, Faculté des sciences et techniques, Université de Corse-Pasquale Paoli, (2010), p53-54.
- 112. Guiraut J. P., 2003.** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. pp. 110-112.
- 113. Gutierrez J., Bourke P., Lonchamp J., Barry-ryan C., 2008.** Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- 114. Haddouchi. F., Lazouni. H. A., Meziane. A. et Benmansour. A., 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*. 05(2): 246 – 259.
- 115. Hadizadeh I., Peivastegan B. and Hamzehzarghani H., 2009.** Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences* 6 (5): pp. 857-861.
- 116. Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.

- 117. Hanniche N, Rebzani F** - Etude comparative du rendement et des effets : antimicrobien et anti-inflammatoire des huiles essentielles de laurier noble (*Laurus nobilis* L.) provenant de deux régions d'Algérie. Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie. université Saad Dahleb - Blida. 2013
- 118. Hao Y. Y., Brackett R. E., Doyle M. P., 1998.** Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiology*, (15) 367-378.
- 119. Haraguchi H., Saito T., Ishikawa., Date H., Kataoka S., Tamura Y., Mizutani K., 1996.** Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, 62, 217-221.
- 120. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K. and Mattila T., 1998.** Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- 121. Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et anti oxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister, Tizi-Ouzou. 120p.
- 122. Himed, 2011.** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine, Algérie. 91p.
- 123. Ho C.L., Wang E.I.C., and Su Y.C., 2009.** Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. *林業研究季刊*31 (2) : pp. 77-96.
- 124. Ho C.L., Wang E.I.C., Yu H.T., Yu H.M. and Su Y.C., 2010.** Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. *林業研究季刊*32 (1) : pp.63-76.
- 125 .Horváth G.Y ,Kocsis B , Botz L , Németh J , Szabó L.G.y**-Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioantography-*Proceeding of the 7th Hungarian congress plant physiogy* , S3-P03 *Acta biologica Stegediensis* ; Vol.46 ; N°3-4 ; PP 145-146.2002.
- 125. Hsieh R.J. & Kinsella J.E. (1989).** Lipoxygenase Generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissues . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 279-286.
- 126. Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002)** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedicul Analysis* **29**: 691-700.
- 127. Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18, 563-582.
- 128 .Hussain A.I., 2009.** Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Doctorale thesis, Pakistan ; 257p.

- 129 .Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., 2010.** Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: pp.1070-1078.
- 130 .Hussain A.I., Anwar F., T.H.S. Sherazi and Przybylski R., 2008.** Chemical composition. antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108: pp.986-995.
- 131. Inouye S. et Abe S. (2007).** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*. 1, 2-4.
- 132 .Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H., 2001.** *Microbiol. Immunol.*, 43, pp.201– 208. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
- 133.Iserin P. (2001)** Encyclopédie des plantes médicinales. *2ème Ed. Larousse. Londres* Pp : 143 et 225-226.
- 134. Jalas J., 1971.** Note of *Thymus L. (Labiatae)* in Europe.I. Supraspecific classification and nomenclature. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 64, 199-215.
- 135. Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brule G., 2006.** *Science des aliments, stabilisation biologique et physico-chimique*, volume 1. Ed. *Tec. & Doc.*, Lavoisier, pp. 95–151.
- 136 .Joly B. et REYNAUD A. (2002).** *Entérobactéries : Systématique et Méthode de diagnostic*. Tec & Doc, Lavoisier.
- 137. Joualt S.2012** .La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. These de doctorat , université de Lorraine . France , P 89,92-93.
- 138. Jouve J. L. (1990).** *Microbiologie alimentaire et filière des viandes*. *Viandes et Produits Carnés*, 11; 6 ; bis 6 ter, 207-213.
- 139. Juven B. J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H.. 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626-631.
- 140.Kabouche A., Kabouche Z. et Bruneau C., 2005.**Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* (Poiret) from Algeria.*Flavour and Fragrance Journal*, 20, 235–236.
- 141. Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria.*The International Journal of Aromatherapy*, 15, 129–133.

- 142. Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 15, 129–133.
- 143. Kalembe D. & Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829
- 144. Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.-F., 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*. 6: 160–164.
- 145. Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H. (2003)** Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* **401** : 7786.
- 146. Karagozlu N., Ergonul B., Özcan D., 2011.** Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, Turkey.
- 147. Karaman S., Ilcim A., Digrak M., 2004.** Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Origanum bargyli* Mouterde from Turkey. *Journal of Essential Oil Research : JEOR*,16, 517-519.
- 148. Kawakishi S., Kaneko T., 1987.** Interactions of proteins with allyl isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35 : 85–88.
- 149. Kelen M & Tepe B . (2008 )** Chemical composition , antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* . 99, 4096-4104.
- 150. Kim D.k. et Lee C.Y., 2004.** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (44) : 253–273.
- 151. Kim J. Marshall MR. Wei C.** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 43. (1995). pp. 2839-2845.
- 152. Klaric M.S., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. & Pepeljnak S., 2006.** Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (1): pp. 36-42.
- 153. Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M. (2004)** Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*. **65** : 3279-3287.
- 154. Knowles J. R., Roller S., Murray D. B. and Naidu A. S., 2005.** Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 797–803.

- 155. Koleva I. I., Van Beek T. A., Linssen J. P. H., De Groot A., et Evstatieva L. N., 2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 8–17.
- 156. Koochmaraie M., Arthur T.M., Bosilevac J.M., Guerini M., Shackelford S.D., WHEELER T.L. (2005).** Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*. **71**, 79-91.
- 157. Kuete V., Penlap beng V., Etoa F-X., Modjo S.L., Bogne P., Assob J. C., Lontsi D., 2004.** Activités antimicrobiennes de l'extrait total et des fractions de jus de fruit de *Citrus medica* lin. (Rutaceae). *Pharmacie Médecine Traditionnelle Africaine*.13 : 91-101.
- 158. Kulevanova S. and Panovska T.K., 2001.** Antioxidant activity of essential oils of different wild *Thymus* . Species. *Bull. Chem. Technol. Macedonia*, 20, 1, pp.61-66.
- 159. Labie C. (1993).** Problemas en los cambios intracomunitarios de la carne. *Eurocarne*, **21**, 19- 28.
- 160. Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcok A. and Coventry M.J. (1998)** The synergetic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum*) against acid tolerant food microflora. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 209-214.
- 161. Lacroix M., Saucier L., OUSSALAH M., CAILLET S., ET SALMIERI S., 2005.** Développement de films antimicrobiens résistants à l'eau à partir de polymères naturels destinés aux viandes et aux produits carnés.
- 162. Iahlou M. (2004).** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18, 435-448.
- 163. Laib I. :** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Diplôme de Magister en Sciences alimentaires, Option : Technologie alimentaire, Université de MENTOURI -CONSTANTINE.2011.
- 164. Lambert R. J. W., Skandamis P. N. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91- 3, 453-462.
- 165. Larousse. encyclopedie des plantes medicinales, 2001.** Identification, Préparations, Soins. Edit Larousse : 335p.
- 166. Larpent J.P. (1997).** Microbiologie Alimentaire, Techniques de laboratoire. Tec & Doc, Lavoisier, pp 1074.
- 167. Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. et Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. (30) : 1076-1081.

- 168. Mann C. M., Cox S. D. & Markham J. L., 2000.** The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Letters in Applied Microbiology*, 30, 294–7.
- 169. Mann C.M0, Cox S.D. & MARKHAM J0L0 ( 2000)** The outhr membrane of ( tea tree oil). Letters in Applied Microbiology, 30, 294-297.
- 170. Mau J-L., Huang S-J, Chen C.-C. (2004).** Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorate* mycelia. *Food Chemistry*. 86, 25-31.
- 171.MERENS A. (2008).** Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. Saint-Mandé, Lyon. pp
- 172. Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, UniversitéAbou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- 173. Moll M., 1998.** Additifs alimentaires et auxiliaires technologique. Ed. DUNOD. Paris. pp. 89-99.
- 174. Molyneux P., 2004.** Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26 № 2. 212p.
- 175. Morales R., 1997.** Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19, 249-262.
- 176. Morales, R. (2002)** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
- 177 .Morelle J., 1988.** Peroxydes lipidiques, radicaux libres, vieillissement et lipoaminés acides : Parfums, Cosmétiques, Arômes, (79) : 71-78.
- 178. Motlagh A.M., JOHNSON M.C. & RAY B. (1991).** Viability loss of food-borne pathogens by starter culture metabolites.*Journal Food Protection*, 54, 873-878.
- 179. Namiki M. (1990).** Anti oxydants / a ntimutagens in food Critic al reviews in Food. *Science et nutrition*. **29**, 273-300.
- 180. Nedorostova L., Koucek P., Kokoska L., Stolcova M., Pulkrabek J., 2009.** Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*. 20 : 157–160.
- 181. Nessrien M.N.Y. and Mohamed A.T., 2007.** Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1): pp. 01-09.
- 182. Nielsen P.V. and Rios R. (2000)** Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food. Microbiol.* 60: 219-229

- 183. Nissen L.R.L., Byrne D.V., Bertelsen G. & Skibsted L.H. (2004).** The antioxidant activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science*, 68, 485-495.
- 184. Norme ISO 15213 (2003).** Microbiologie directive générale concernant le dénombrement des Staphylocoques coagulase positive.
- 185. Norme ISO 6579 (1993),** microbiologie – directives générales concernant les méthodes de recherche de *salmonella*.
- 186. Norme NF.V08.011 (1998).**Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.
- 187. Norme NF.V08.050 (1999).** Microbiologie directive générale concernant le dénombrement des coliformes totaux.
- 188. Norme NF.V08.060 (1999).** Microbiologie directive générale concernant le dénombrement des coliformes fécaux.
- 189. Norme NF.V08.061 (1993).** Microbiologie directive générale concernant le dénombrement des anaérobies sulfite-réductrices.
- 190. Olivero-Verbel J., González-Cervera T., Güette-Fernandez J. Jaramillo-Colorado B. and Stashenko E., 2010.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(4): pp.568-574.
- 191. Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Begin A., 1997.** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol*, 37, pp.155-162.
- 192. Oussalah (1) M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2007.**Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 414-420.
- 193. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*. 73 : 236–244.
- 194. Özcan M., J.-C. Chalchat (2004)** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J.Plant Physiol.* 30 (4) : 68-73.
- 195. Padulosi S., 1997.** Oregano. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, Valenzano (Bari), Italy; IPGRI: Rome, Italy.

- 196. Palmer S., Stewart A., Fyfe J.L. (1998).** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*. 26, 118- 122.
- 197. Pamphile M., Randrianasolonjanahary H. & Razafindrajaona J.M., 2009.** Etude des substances Actives de *Cinnamosma fragrans*. Actes du symposium biomad. Université de Mahajang. 22p.
- 198. Panizzi L., Flamini G., Gioni P.L. & Morelli I., 1993** composition and antimicrobial properties of essential oils of four mediterranean lamiaceae. *J. Ethnopharmacologie* , 39,169-170.
- 199. Papadopoulos C. J., Carson C.F., Chang B. J., Riley T. V., 2008.** Role of the MexAB-OprM Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* in Tolerance to Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Monoterpene Components Terpinen-4-ol, 1,8-Cineole, and  $\alpha$ -Terpineol. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 6 : 1932–1935.
- 200. Pariente L. (2001)** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. *2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.
- 201. Pauli A. (2001).** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International*
- 202. Peiffer B. (2000).** Intoxications causées par *Bacillus cereus*. file <http://www.bacillus.cereus.htm>
- 203. Pellecuer J., Jacob M., Simon de Buechberg M. & Allergriani J., 1980** therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana L.*). *Acta Horti* ., 96,35-39.
- 204. Penaler P., Huerta B., Borge C., Astorga R., Romeo R., Pere A., 2005.** Antimicrobial activity of live essential oil against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *APMIS*. 113 : 1-6.
- 205. Petkov V., Roussinov K., Todorov S., Lazarova M., Yonkov D. and Draganova S., 1984.** Pharmacological investigations on *Rhaponticum carthamoides*. *Planta Med.*, 50: pp. 205- 209.
- 206. Pibiri M.C., 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Suisse.
- 207. Pibiri M.C., 2006.** Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52.
- 208. Pierre M. & Iys M., 2007.** Secrets de plantes pour se soigner naturellement. Edit Artemis: 464p
- 209. Piyo A., Udomsilp J., Khang-Khun P. and Thobunluepop P., 2009.** Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *As. J. Food Ag- Ind. Special Issue*, S2-S9.
- 210. Poletti A. (1988)** Fleurs et plantes médicinales. *2ème Ed. Delachaux & Niestlé S. A. Suisse*. Pp : 103 et 131.

- 211. Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.
- 212. Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., 2010.** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. *Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie (serie nouă)*, vol. 19 №1, pp. 23-30.
- 213. Rasooli I. and Mirmostafa, A., 2003.** Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2200–2205.
- 214. Rasooli I. and Owlia P., 2005.** Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: pp.2851-2856.
- 215. Rasooli I. et Mirmostafa SA (2002).** Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia* 73(3) -244-250
- 216. Rasooli I., bagher R.M., ALLAMEH A., (2006).** Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus Niger* by essential oils from *Thymus Eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*. 17, 359-364.
- 217. Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008.** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry*; pp.135-140.
- 218. Raza S. A., Rehman A., Adnan A. & Qureshi F., 2009.** Comparison of antioxidant activity of essential oil of *Centella asiatica* and Butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions. *Biharean Biol.* 3, Vol. 3, N°1, pp.71-75.
- 219. Rhayour K., 2002.** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.
220. Renerre M. (2000). In antioxidants in muscle. *FoodS* John Wiley, New-york, 113.
- 221. Reynaud J., 2002.** La flore du pharmacien. Edit Médicales Internationales .Paris : 257p.
- 222. Rice-evans C.A., Sampson J., Branley P.M., Hollowa D.E., 1997.** Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo. *Free Radical Research*. in AVLESSI F., DANGOU J., WOTTO V.D., ALITONOU G. A., SOHOUNHLOUE D. K., MENU C., 2004. Propriétéantioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie*. 7 : 1057–1061.
- 223. Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed. Lavoisier, Tec. Et Doc.1228-1242.

224. **Richard H., 1992.** Epices et aromates. Ed. Technique & Documentation - Lavoisier, Paris, 339.
225. **Richard H., Benjlali B., Bauquour N., Baritoux O., 1985.** Etude de diverses huiles essentielles de thym du Maroc. Lebensm-Wiss U-Technol.
226. **Roberfroid M., 2002.** Aliments Fonctionnels. Ed : Lavoisier, Paris, 475p.
227. **Rodriguez A., Batlle R., Nerin C., 2007.**The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging,Part II.Progress in Organic Coatings (60) 33–38.
228. **Rota r.M., Herrera A., Martínez R.M., Sotomayor J. A., Jordán M.J. (2008).** Antimicrobial act ivity and che mical co mposition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 19, 681-687
229. **Rož man T. and Jeršek B., 2009.** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93 ; N° 1, pp.51-58.
230. **Rozier J., Carlier V. et Bolnot F., 1986.** Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. É d. SAPALC. Paris. pp. 130-143.
- .231. **Ruberto G, Barrata MT (2000)** Antioxydant actitivity of essential oil component in two lipid model systems.Food chem. 69: 167-74.
232. **Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. et Kaabeche M., 2002.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 251-254.
233. **Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. and Bruni R., 2005.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: pp. 621-632.
234. **Safaei –Ghomi J, Ebrahimabadi AH , Djafari-Bidgoli Z, Batooli HG ( 2009 )** GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential aoil and methanol extracts of thymus caramanicus jalas ans its main constituent carvacrol.Food Ghem 115 : 1524-8.
235. **Sagdic O. and Ozcan M., 2003.** Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14, 141–143.
236. **Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., et al. (2002)** Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* 70 (26): 3097-3108.
237. **Sanchez-escalante A., Djenane D., Torrecano G., Beltran J.A. & Rongales P. (2003).** Stabilisation of colour and odeur of beef patties bu using lycopene rich tomato and peppers as a source antioxidants. *Journal of the Science of Food and*

- 238. Sari M., Biondi D.M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C. and Ruberto G., 2006.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 890–898.
- 239. Satrani B. et al ., 2008** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixus* Bull , soc.Pharm Bordeaux , 146,85-96.
- 240. Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M., 2002.** Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *laurus nobilis* against pentyletetrazol-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine* 9: 212-216.
- 241. Schuhmacher A. & Reichling P. (2003).** Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped *viruses Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 in vitro*. *Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510.
- 242. Shapiro S. and Guggenheim B., 1995.** The action of thymol on oral bacteria. *Oral Microbiology Immunology*, 10, 241–246.
- 243. Sharififar F. , Moshafi M.H. , Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., 2007.** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18, p: 800–805.
- 244. Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., DU Z., 2006.** Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 100 : 296–305.
- 245. Simic A., 2004.** The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phototherapy research* 18: 713-714.
- 246. Sivopoulou A, Papanikoalou E, Nikolaou C , et al.( 1996 )** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agric food Chem* 44 : 1202-5.
- 247. Skandamis P.N. and Nychas G.J.E. (2001)** Effect of oregano essential oil on microbiological and physicochemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1011-22.
- 248. Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006b.** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1), pp. 22-25.
- 249. Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006a.** Sensitivity of spoiling and pathogen foodrelated bacteria to *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: pp.527-532.

- 250. Stahl-Biskup E., 1991.** The chemical composition of Thymus oils: A review of the literature 1960-1989. *Journal of Essential Oil Research*, 61-82.
- 251. Svoboda K.P. and Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, Scotland, U.K., 17p.
- 252. Tang S., Shcchan D., Buckley D.J., Morrissey P.A. & Kerry J.P. (2001).** Anti-oxidant activity of added tea catechines on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 685-692.
- 243. Tassou C., Drosinos E. H., Nychas G.-J. E., 1995.** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*. 78 : 593– 600.
- 254. Tepe B., Sokmen M., Akpulat A. et Sokmen A., 2005.** In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food chemistry*, 92, 89-92.
- 255. Thuille N., Fille M., Nagl M. (2003)** Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*. 206 : 217-221.
- 256. Trombetta D. et al ., 2002.** Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant , B – unsaturated aldehydes. *Lett , Appl , Microbial* , 35, 285-290.
- 257. Tsigarida E., Skandamis P. and Nychas G.J.E., 2000.** Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere-packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 901–909.
- 258. Udomsilp J., Piyo A., Khang-Khun P. and Thobunluepop P., 2009.** Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, pp. 24-30.
- 259. Ultee A., Gorris L. M. G. and Smid E.J., 1998.** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85:211-218.
- 260. Ultee A., Kets E. P. W. and Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4606-4610.
- 261. Ultee A., Slump R.A., Steging G. and Smid E.J., 2000.** Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of Food Protection*, 63, 620-624.
- 262. Valero M., et Frances E., (2006).** Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *F microbiology* 23 (1) 68-73.

- 263. Valero M., Salmero M.C., 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 74 85 73–81.
- 264. Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M., Donmez E. and Tepe B., 2003.** Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 63–67.
- 265. Viaud H., 1993.** Cité par Michel Van hove. Aromathérapie. [www.naturehelps.com/France/Viand2.htm](http://www.naturehelps.com/France/Viand2.htm).
- 266. Vljjanen K., Sundberg S., Ohshima T. & Heinonen M. (2002).** Caroténoids as antioxidants to prevent photooxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 353-359.
- 267. Vokou D., Kokkini S. and Bessiere J.M. 1993.** Geographic variation of Greek oregano *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* essential oils. *Biochem. Systematics and Ecology*, 21, 287-295.
- 268. Walsh S. E., Maillard J.Y. Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 240-247.
- 269. Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F., 2010.** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- 270. Wendakoon C. N., Sakaguchi M. (1993).** Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection*. 56, 410-413.
- 271. Zaika L. L., 1988.** Spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its Determination. *Journal of Food Safety*. 9 (2): 97-118.
- 272. Zarnovican M.H., 2004.** Le contrôle des bactéries alimentaires par les huiles essentielles de basilic et de thym. *Bio clips*, 12. <http://www.foodnavigator.com/news/news>.
- 273. Zhiri A., 2006.** Science nutrition prévention et santé. NUTRA NEWS. Science, Nutrition, Prévention et Santé. Edité par la Fondation pour le Libre Choix.
- 274. Zweifel C., Baltzer D., Stephan R. (2005).** Microbiological contamination of cattle and pig carcasses at five abattoirs determined by swab sampling in accordance with EU Decision. *Meat Science*. 69, 559-566.



