

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Blida-1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie**  
**Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire**

**Thème**

**Evaluation de l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles *Rosmarinus officinalis* et *Cymbopogon citratus* en perspective de leurs utilisation comme conservateur de denrées alimentaires**

**Présenté par**

**soutenu le 08/10/2017**

**BOUDJEBIR Khadidja**

**Devant le jury**

<b>M<sup>me</sup> Ben manssour N.</b>	<b>MCB</b>	<b>Université de Blida</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> Boudjema N.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Blida</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> Cherif H.S</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Blida</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M.Boukhatem MN.</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Blida</b>	<b>invité</b>

**Promotion 2016/2017**

## Liste des tableaux

<b>TABLEAU</b>	<b>TITRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>1</b>	Différentes chémotype de Romarin	10
<b>2</b>	Souches bactériennes ATCC	18
<b>3</b>	Souches bactériennes isolées cliniquement	18
<b>4</b>	champignon	19
<b>5</b>	Composition chimique de romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	25
<b>6</b>	Composition chimique de citronnelle ( <i>Cymbopogon citratus</i> )	27
<b>7</b>	CMI des bactéries	30
<b>8</b>	CMI des levures	31
<b>9</b>	CMI des bactéries	40
<b>10</b>	CMI des levures.	41

## Liste des figures

FIGURE	TITRE	PAGE
1	Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries	5
2	<i>Rosmarinus officinalis</i>	9
3	<i>Cymbopogon citratus</i>	11
4	méthode d'aromatogramme	20
5	Méthode de microatmosphère	21
6	détermination de la CMI	23
7	méthode de filtration sur membrane	24
8	DZI des bactéries en aromatoigramme avec l'HE de <i>R.officinalis</i>	28
9	DZI des champignons en aromatoigramme	29
10	DZI des champignons en micro-atmosphère.	30
11	Résultats de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	33
12	Résultats de l'activité antifongique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	36
13	DZI des bactéries en aromatoigramme	38
14	DZI des champignons en aromatoigramme	39
15	DZI des bactéries en micro-atmosphère	39
16	DZI des champignons en micro-atmosphère	40
17	Résultats de l'activité antibactérienne de <i>Cymbopogon citratus</i> .	43
18	Résultats de l'activité antifongique de l'HE de <i>Cymbopogon citratus</i>	47
19	cinétique d'inhibition de <i>Saccharomyces cerevisiea</i>	48
20	Résultats de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire Jus Orangina® d'HE seule, en combinaison avec un traitement thermique et avec conservateur synthétique.	50

## *Remerciement*

Je veux exprimer ma vive reconnaissance à Madame **CHERIF H.S** maitre de conférences à l'université de Blida 1 pour son encadrement pour ses nombreux avis éclairés durant notre travail et pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Je remercie vivement Madame **BEN MANSSOUR N** maitre de conférences A à l'université de Blida et Madame **BOUDJEMA N** maitre de conférences A à l'université de Blida d'avoir accepté de juger ce mémoire.

Je remercie Monsieur **BOUKHATEM M.N** maitre de conférences A à de l'université de Blida qu'm'a beaucoup aidé pour réaliser ce travail de toutes ses connaissances précieuses pour sa disponibilité et de toutes sa gentillesse et son soutien, je le remercie d'avoir su me guider dans ce travail, d'avoir été présent chaque fois que j'en avais besoin.

Je tien à remercie Monsieur **OUSSADOU** chef d'option au département de Biologie et Physiologie Cellulaire pour son aide.

Je remercie Madame **KELLOU** chef de service au laboratoire de mycologie de l'Institut Pasteur, aussi mes remerciements vont à Monsieur **TEFAHI** chef de service de laboratoire d'hygiène de Blida pour sa gentillesse, son aide et son encouragement.

Je remercie Monsieur **LETTLOUT** et Madame **KHALDI** chefs de service de laboratoire d'hygiène de Tipaza.

## *Dédicace*

*A ma mère, à mon père.*

*A mes très chères sœurs : Yassamin et Ahlam.*

*A mes très chers frères : Abd-Elnour et Abd-Elkhader.*

*A mohamed boutaran et tous les membres de ma famille.*

*A ma très chère copine fatiha elkhedim.*

## Résumé :

La demande croissante de remplacer les additifs synthétiques a incité à la recherche des substances naturelles ayant un large spectre d'activité telles les huiles essentielles.

Nos huiles essentielles ont été extraites par entraînement à la vapeur l'eau, et l'analyse de la composition chimique a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

L'activité antimicrobienne a été évaluée par les méthodes d'aromatogramme, micro-atmosphère à trois concentrations et la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) sur 6 souches bactériennes (5 Gram- et 1 Gram+), 4 levures et 5 moisissures, et la filtration sur membrane pour évaluer l'effet conservateur.

L'huile essentielle (HE) de *Rosmarinus officinalis* été de chémotype  $\alpha$ -pinène (44.05%) tandis que *Cymbopogon citratus* été de chémotype citral (52.93%).

Le screening antimicrobien révèle que l'HE de *R.officinalis* exerce un effet modéré contre les espèces bactériennes avec des Diamètres de Zone d'Inhibition (DZI) de 12 à 20 mm, de 0 à 21 mm pour les levures et aucun DZI n'été enregistré dans le cas des moisissures à la concentration de 20  $\mu$ l. En ce qui concerne la micro atmosphère la fraction volatil n'à montrer aucun effet sur l'ensemble des espèces bactériennes et mycéliennes, seul pour *Candida tropicalis* et *Candida parapsilosis* on a obtenu des DZI de 65 et 70 mm en cas de 60  $\mu$ l.

Une CMI de 1% a été enregistrée pour *staphylococcus aureus* ATCC 25923, et de 2% pour les levures.

L'HE de *C.citratus* a exercé un effet significatif sur toutes les espèces microbiennes. des DZI de 23 à 50 mm dans le cas de 20  $\mu$ l a été observé pour les bactéries, de 32 à 90 mm pour les levures et une inhibition totale des moisissures. En phase vapeur l'HE de Citronnelle a présenté un effet remarquable sur l'ensemble des bactéries Gram- et *S.aureus* ATCC 25923, concernant les espèces fongiques une inhibition totale a été notée pour les trois concentrations.

La CMI été de 0.06% pour *S.aureus* ATCC 25923 et 0.125% pour *Candida albicans* et *Candida tropicalis*.

Les résultats de l'essai préliminaire de l'HE de *C.citratus* en tant que conservateur alimentaire dans le jus Orangina® a montré une inhibition totale des colonies levuriformes.

**Mots-clés :** *C.citratus*, jus *R.officinalis*, conservateur, aromatoigramme, micro atmosphère, CMI.

## Abstract

The increasing demand to replace the synthetic additives was encouraged to research natural substances having a broad spectrum of activity such essential oils.

Our essential oils were extracted by drive with the vapor water, and chemical composition analyzes was carried out by gas chromatography coupled with the mass spectrometry (CG/SM).

Antimicrobial activity was evaluated by the methods of disc diffusion, disc volatilization at three concentrations and the determination of the Minimal Inhibiting Concentration (CMI) on 6 bacterial strains (5 Gram- and 1 Gram+), 4 yeasts and 5 molds, and filtration on membrane to evaluate the preserving effect.

Essential oil (EO) of *Rosmarinus officinalis* was rich on  $\alpha$ -pinène (44.05%) while *Cymbopogon citratus* was rich on citral (52.93%).

Antimicrobial screening reveals that the EO of *R.officinalis* exerts a moderate effect against the bacterial species with Diameters of Inhibition Zone (DIZ) from 12 to 20 mm, 0 to 21 mm for yeasts and any DIZ recorded in the case of the molds with the concentration of 20  $\mu$ l. In disc volatilization the volatile fraction was not effect on the unit of the bacterial and mycelial species, only for *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* we have obtained DIZ of 65 and 70 mm in the event of 60  $\mu$ l.

MIC of 1% was recorded for *staphylococcus aureus* ATCC 25923, and of 2% for yeasts.

The EO of *C.citratus* exerted a significant effect on all the microbial species. DIZ from 23 to 50 mm in the case of 20  $\mu$ l were observed for the bacteria, from 32 to 90 mm for yeasts and a total inhibition of the molds. In vapor phase the EO of Lemongrass presented a remarkable effect on the unit of the bacteria Gram- and *S.aureus* ATCC 25923, concerning the fungic species a total inhibition was noted for the three concentrations.

MIC of 0.06% was recorded for *S.aureus* ATCC 25923 and 0.125% for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.

The test results preliminary of the EO of *C.citratus* as a food conservative in the juice Orangina® showed a total inhibition of the colonies.

**Key words :** *C.citratus*, juice *R.officinalis*, conservative, disc diffusion, disc volatilisation, MIC

## **Table des matières**

Introduction

### **Chapitre I : généralité sur les huiles essentielles**

I.1 Définition.....	1
I.2 Principaux constituants des huiles essentielles.....	1
I.3 localisation des huiles essentielles.....	2
I.4 Facteurs de variabilité.....	2
I.5 Propriétés des huiles essentielles.....	3
I.5.1 propriétés physicochimiques.....	3
I.5.2 Propriétés médicinales.....	4
I.6 Mode d'action.....	4
I 6.1 Mode d'action antibactérien.....	5
I 6.2 Mode d'action antifongique.....	6
I 7. Domaines d'applications.....	7
I.9 Monographie des deux plantes.....	8
I.9.1 Le Romarin.....	8
I.9.2 Citronnelle.....	11

### **Chapitre II : généralité sur les jus de fruits**

II.1 Définitions.....	13
II.2 Composition.....	13
II.3 Facteurs d'altération.....	14

### **Chapitre III : Matériel et Méthodes**

III.1 Matériel.....	17
III.1.1 Matériel végétal et huiles essentielles.....	17



III.1.2 microorganismes.....	18
III.1.3 Milieux de culture et agents chimiques.....	19
III .2 Méthodes.....	19
III.2.1 Etude de l'activité antimicrobienne.....	19
III.2.1.1 Méthode de l'aromatogramme.....	19
III 2.1.2 Méthode de micro-atmosphère.....	20
III 2.1.3 Détermination de la concentration minimal inhibitrice CMI par macro-dilution en milieu gélosé.....	21
III 2.1.4 Etude de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire.....	23

#### **Chapitre IV : Résultats et discussion**

IV.1 Résultats et discussion de la composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i> ...	25
IV.2 Résultats et discussion de la composition chimique de <i>Cymbopogon citratus</i> ....	27
IV.3 Activité antimicrobienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	28
IV.3.1 Résultats d'aromatogramme des bactéries .....	28
IV.3.2 Résultats d'aromatogramme des champignons .....	29
IV.3.3 Résultats de micro-atmosphère des bactéries.....	29
IV.3.4 Résultats de micro-atmosphère des champignons.....	29
IV.3.5 Résultats de la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) .....	30
IV.4 Activité antimicrobienne de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	36
IV.4.1 Résultats d'aromatogramme des bactériennes.....	36
IV.4.2 Résultats d'aromatogramme des champignons.....	38
IV.4.3 Résultats de micro-atmosphère des bactériennes .....	39
IV.4.4 Résultats de micro-atmosphère des champignons.....	40

IV.4.5 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....40

IV.5 Résultats et discussion de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire..47

Conclusion

Références

Annexes

## **Introduction**

La sécurité alimentaire est un problème de santé publique de plus en plus important (OMS, 2002).

Il a été estimé qu'autant de 30% des personnes dans les pays industrialisés souffrent d'une maladie d'origine alimentaire chaque année et en 2000 moins de deux millions de personnes sont mortes d'une maladie diarrhéique dans le monde entier (OMS, 2002).

Le contrôle de la détérioration des aliments et des bactéries pathogènes est principalement atteint par le contrôle chimique, mais l'utilisation de produits chimiques synthétiques est limitée en raison des effets indésirables, y compris la cancérogénicité, la toxicité, la tératogénicité et la période de dégradation lente des aliments (Faleiro, 2011).

Des recherches approfondies sur des additifs alimentaires naturels ayant un large spectre d'activité antioxydante et antimicrobienne et qui possèdent la capacité d'améliorer la qualité et la durée de conservation des denrées périssables Fratianni et al. (2010).

Pour cela, les plantes aromatiques représentent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans l'industrie des parfums, agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles ; ils sont alors appelés «plantes aromatiques». Ces derniers ont été traditionnellement employés 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. Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne 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 agro-alimentaires Burt, (2004) ; Gachkar et al. (2007) ; Rasooli et al. (2006).

Les huiles essentielles sont utilisées pour la conservation de plusieurs denrées alimentaires à titre d'exemple le Carvacrol est utilisé pour l'inhibition des amines biogènes produites par les micro-organismes d'altération alimentaire Ozgul et al. (2015), aussi l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* Labill. et son composé

majoritaire le 1,8-cineole ont été utilisés pour la préservation des denrées stockées **Vilela et al. (2009)**.

De ce fait l'objectif de notre travail est d'évaluer le potentiel antimicrobien de deux huiles essentielles *Rosmarinus officinalis* et *Cymbopogon citratus* et de réaliser un test préliminaire de l'huile essentielle comme étant un conservateur alimentaire.

## Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

### I.1 Définition

Une huile essentielle est l'essence extraite de la plante aromatique par différents procédés (distillation à la vapeur d'eau, hydro distillation, hydro diffusion, extraction par des fluides supercritiques) **Dorman (2000) ; Burt (2004) ; Bakkali et al. (2008) ; kalemba (2003).**

L'HE est défini par la pharmacopée européenne comme «produit de composition généralement assez complexe, refermant des produits volatils contenus dans les végétaux, plus ou moins modifiés au cours de la préparation».

L'Agence Française de Normalisation (AFNOR), qui travaille actuellement à l'élaboration de normes pour les huiles essentielles, définit ces dernières de façon plus restreinte comme des (produits obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche).

L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques **Millet (2013).**

### I.2 Principaux constituants des huiles essentielles

Les HE sont des mélanges de composés naturel très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations très différentes. Elles sont caractérisées par deux ou trois composants importants aux concentrations assez élevées (20-70%) comparées à d'autres qui sont présents seulement à l'état de trace **Bakkali et al. (2008).** Généralement les composés majoritaires déterminent les propriétés des HE **Burt (2004).**

#### I.2.1 Terpènes

Formés par la combinaison de différentes bases de 5 atomes de carbones, nommés Isoprènes.

Les principaux terpènes sont les Monoterpènes (C10) et les Sesquiterpènes (C 15), mais les Hémiterpènes (C5), les Diterpènes (C30), et les Tétraterpènes (C40) peuvent aussi exister **Bakkali et al. (2008).**

### I.2.2 Monoterpènes

Les Monoterpènes issus du couplage de deux unités isopréniques (C10) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante. C'est la classe la plus représentative des HE (90%) et contient une large variété de structures représentant différentes fonctions **Bakkali et al. (2008)**.

### I.2.3 Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont formés par l'assemblage de 3 unités d'isoprènes C15, et ont pour formule moléculaire C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>. Ce sont des composés insaturés. Il en existe des sesquiterpènes linéaires, ramifiés et cycliques. Les cycliques peuvent être mono, bi ou tricycliques **Bakkali et al. (2008)**.

### I.2.4 Composés aromatiques

Les huiles essentielles renferment aussi des composés odorants (phényl-propanoïdes) dont la biogénèse est différente de celle des terpènes **Bernard et al. (1988)**.

Parmi ces divers composés aromatiques, on peut citer :

- Les aldéhydes (anisique, cuminique, cinnamique).
- Les phénols et éthers (thymol, eugénol, anéthol).
- Les coumarines (bergapteine, ombellifèrone).
- Des composés acycliques tels que les acides organiques à faible poids moléculaire (acétique, formique, valérique) peuvent être également rencontrés.

### I.3 localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans les cellules glandulaires spécialisées, située en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors soit stockées dans une cellule transformée en cellule à essence, ou dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs voire des papilles **Eberhard (2005)**.

### I.4 Facteurs de variabilité

Selon : **Faleiro et al. (2003)**; **Jordán et al. (2013)** :

## Généralités sur les huiles essentielles

---

La composition chimique d'une plante aromatique varie selon :

- La nature de ces organes
- Les conditions de croissance
- Les conditions environnementales : la qualité et la quantité de la lumière, la température, l'indice de pluviométrie, les facteurs édaphiques et de stress
- Les conditions de culture : date de semis et de récolte, traitement phytosanitaires, emploi d'engrais, état de maturation et des conditions atmosphériques lors de la récolte, traitement après récolte (fermentation, séchage, transport, incision) et autres.

### I.5 Propriétés des huiles essentielles

I.5.1 propriétés physicochimiques :

- Elles sont liquides, parfois visqueuses (Myrrhe) ou cristallisées (Camphre) ; certaines cristallisent à faible température (Menthe).
- Les essences comme les Citrus (Citron, Mandarine, Pamplemousse...) sont sensibles à la chaleur et finissent par se décomposer.
- Elles sont volatiles (odorantes) ce qui permet leur entraînement à la vapeur d'eau lors de la distillation.
- Elles sont insolubles et plus légères que l'eau ce qui permet leur séparation.
- Elles sont totalement solubles dans les huiles végétales (meilleurs solvants et véhicules), dans les alcools et les solvants organiques.
- Elles sont colorées et tout le spectre de l'arc-en-ciel est représenté (jaune : Sauge sclarée).
- Elles sont dotées d'un pouvoir rotatoire, avec la faculté de dévier la lumière polarisée qui les traverse à droite ou à gauche.
- Elles présentent une densité proche de celle de l'eau, ce qui permet leur distillation.
- Elles sont inflammables et nécessitent de connaître leur point éclair pour leur stockage et leur transport (l'HE de Pin des landes étant la plus inflammable à cause de la térébenthine) **Zahalka (2014)**.

### I.5.2 Propriétés médicinales

#### I.5.2.1 Propriétés appétantes et digestives

La principale activité des plantes aromatiques consiste à stimuler physiologiquement la sécrétion d'enzymes des glandes salivaires, les sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales, ainsi que l'excrétion biliaire, ce qui se traduit globalement par un effet stimulant sur la digestion **Eberhard (2005)**.

#### I.5.2.2 Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

Les plantes aromatiques élaborent, comme la plupart des substances d'origine végétale, des molécules caractérisées par de nombreuses fonctions capables de piéger les radicaux libres, d'où leur effets antioxydants.

Les activités antioxydantes et antiradicalaires des épices et des aromates se conservent généralement même après la cuisson, comme cela a été démontré in vitro. Ainsi de nombreuses épices peuvent freiner la formation dans l'estomac de composés cancérigènes, comme la nitrosamine, et inhibent ainsi le développement tumoral **Eberhard (2005)**.

#### I.5.2.3 Activités anti-inflammatoires

Les constituants des huiles essentielles tels que les monoterpènes hydrocarbonés, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les alcools sesquiterpéniques ont montré une activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase qui est une enzyme responsable de la production de leucotriènes suspectés de jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer **Chao (2005)**.

#### I.5.2.4 Activités anthelminthiques

Certaines huiles essentielles sont reconnues pour leur action sur les vers intestinaux. Un des constituants ayant montré une activité anthelminthique est l'ascaridole qui reste le principal constituant actif de l'essence de *Chenopodium ambrosioides* et du Thymol **Satrija et al. (1995)**.

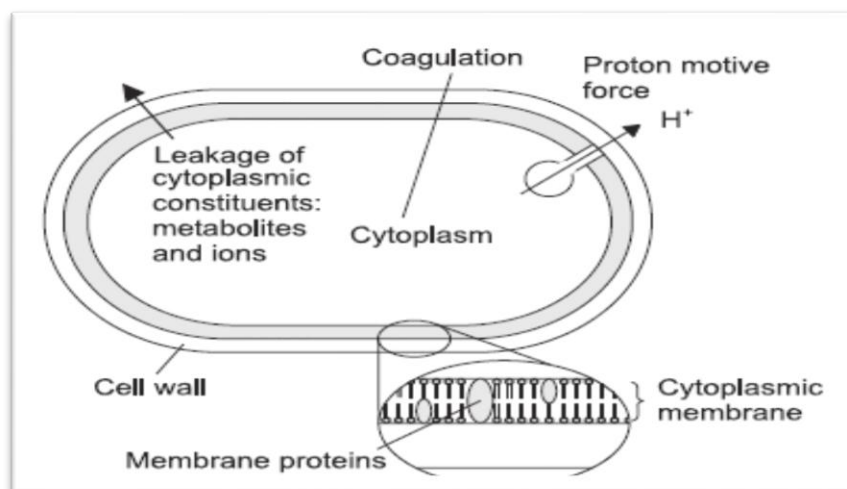
### I.6 Mode d'action

Vu le grand nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans l'HE, il est susceptible que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme



spécifique mais qu'il y a plusieurs cibles cellulaires **Skandamis et al. (2001)** ; **Carson et al. (2002)**.

Ainsi la principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire **Knobloch et al. (1986)** ; **Sikkema et al. (1994)**. Figure 1



**Figure1** : Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries (**Burt 2004**).

### I. 6.1 Mode d'action antibactérien

Le spectre d'action de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé) est très étendu. Cette huile agit sur de nombreuses espèces bactériennes, comprenant des bactéries Gram positives et Gram négatives, et se révèle très efficace contre les infections aux SARMs Cette activité est attribuée au terpinène-4-ol, qui est le composé majoritaire de l'huile **Hammer et al (2006)**. L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* perméabilise des liposomes **Cox et al. (2000)**. Ainsi, cette huile serait capable de perméabiliser les membranes plasmiques, entraînant chez *S. aureus* une perte d'ions potassium **Cox et al. (2000)**. L'huile essentielle ne lyse pas les bactéries comme cela a été démontré et observé en microscopie électronique **Carson et al. (2002)** ; **Reichling et al. (2002)**. Une perte de matériel cytoplasmique et la formation de structures ressemblant à des mésosomes (figure 2), structures retrouvées après un traitement à la vancomycine, sont observées avec le Terpinène-4-ol **Carson et al. (2002)**.

## Généralités sur les huiles essentielles

---

Des cellules de *L. monocytogenes*, exposées à l'huile essentielle de Thym, ont été observées en microscopie électronique à transmission **Rasooli et al. (2006)**. Les résultats montrent que :

*L. monocytogenes* exposée à 1/8 d'HE de *Thymus eriocalyx*, la cellule montre des dommages graves à la paroi cellulaire et aux organelles.

*L. monocytogenes* exposée à la dilution de 1/8 d'HE de *Thymus x-prolock* montre un endommagement de la paroi cellulaire et les organelles, le cytoplasme a perdu sa distribution et il y a un groupement de matériel cytoplasmique et les cellules se rapprochent entre elles.

*L. monocytogenes* exposée à la dilution 1/16 d'HE de *Thymus x-prolock* montre que la taille des cellules a diminué, la paroi cellulaire subit des changements dégénératives, les cellules se rapprochent les unes des autres.

Le pouvoir antimicrobien des HE est lié à leur composition chimique, en particulier à leurs composés majoritaires pour cela les études avec *B. cereus* ont prouvées que le Carvacrol agit sur la membrane cellulaire, où il se dissout dans la bicouche de phospholipide et se place entre les chaînes d'acide gras **Ultee et al. (2000)**. Ainsi que l'Eugénol composé majeur de l'huile de Clou de girofle **Farag et al. (1989)**, à des concentrations sub-létales, il empêche la production de l'amylase et des protéases par *B. cereus*. Aussi il entraîne une détérioration de la paroi et une lyse cellulaire **Thoroski et al. (1989)**.

### I.6.2 Mode d'action antifongique

Les huiles essentielles agissent sur la respiration de certaines levures **Cox et al. (2000)** et champignon filamenteux **Inoye et al. (1998)**. Ils peuvent inhiber les enzymes responsables de la régulation de l'énergie ou de la synthèse des composés structuraux **Burt (2004)**.

L'effet fongicide ou fongistatique des huiles essentielles sur les champignons filamenteux s'accompagne par des modifications morphologiques et une influence sur la morphogénèse hyphale **Bourel et al. (1995)**.

Les cibles principales des huiles essentielles sont la paroi, les membranes cellulaires et nucléaires. Les HE causent par conséquent une réduction de la production des spores et des aflatoxines **Rasooli et Owlia (2005)**.

### I.7. Domaines d'applications

Les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique dans les secteurs industriels :

#### I.7.1 Cosmétologie et parfumerie

Les huiles essentielles sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine... les huiles essentielles sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, etc (**Ouis, 2015**). Par exemple, le d-limonène, le géranyl acétate et le d-carvone sont utilisés dans les crèmes et les savons (**Abi ayad, 2009**).

#### I.7.2 Pharmacologie

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirops, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusions telles que : le Thym, la Menthe... (**Alloun, 2013**).

#### I.7.3 Désinfection des locaux

En milieu hospitalier, les HE deviennent un matériel intéressant pour la désinfection préventive, du fait de la complexité de leur composition chimique et de l'originalité de leurs activités antimicrobiennes (**Boumediene, 2014**).

Les H.E connaissent un intérêt tout nouveau pour le traitement de l'air, divers auteurs ont étudié cette suggestion et l'ont appliqué pour assainir l'air des hôpitaux, des installations collectives et même pour conserver et désinfecter les musées et leurs archives **Debilierbeck et al. (2002) ; Pihiri (2006) ; Dehillerheck (2007); Morisetie, (2007)** elles sont également appliquées dans la désinfection des locaux de soin des cabinets dentaires **Brisset et Lécolier (1997)**.

#### 1.7.4 Aromathérapie

Les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de

la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries. La listerine qui est une solution constituée d'HE de Thym et d'Eucalyptus possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire. Les huiles essentielles de Thym et de Romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires **Brisset et Lécolier (1997)**

### 1.7.5 Agroalimentaire

En industrie alimentaire on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée ainsi une qualité organoleptique meilleure.

Cependant, les produits naturels sont généralement des alternatives aux conservateurs synthétiques, et parmi eux les huiles essentielles qui sont employées couramment comme conservateurs **Bassanetti et al. (2016)**.

-Le Carvacrol a été utilisé pour la prévention des aliments contre la formation des amines biogènes **Zogul et al. (2015)**.

Le composé majoritaire de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* le 1,8-cineole, a été évalué pour son efficacité contre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* responsables de l'altération des denrées stockées **Vilela et al. (2009)**, aussi que les HE sont utilisées pour les denrées suivantes : fromage à pâte molle **Smith-palmer (2001)** ; **Olmedo (2013)**, le stockage des graines **Lee (2004)**, produits périssables **Holley (2005)**, emballage actif **Gutierrez (2010)** ; **Ribeiro-Santos et al. (2017)**, légumes secs **Laib (2013)**, lait **Ben Jemaa et al. (2016)**, volaille **Rocío Teruel (2015)**.

## I.9. Monographie des deux plantes

### I.9.1 Romarin *Rosemarinus officinalis*

#### I.9.1.1 Description de la plante

Cette plante peut atteindre 2m de hauteur. La racine est profonde et pivotante. La tige est tortueuse, anguleuse et fragile. Les feuilles coriaces, opposées, rigides, brillantes, à bords repliés, verdâtres en-dessus, plus ou moins hispides, blanchâtres en dessous. Les fleurs bleues s'épanouissant tout au long de l'année attirent de nombreux insectes. Le fruit est une baie ovale, sèche et lisse **Damerdji (2015)**. Figure 2



**Figure 2 :** *Rosmarinus officinalis* Eberhard (2005)

### I.9.1.2 Systématique

Selon **Cronquist, 1981** la position taxonomique de *Rosmarinus officinalis* est comme suite :

Règne :Plantae

Division :Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L

### I.9.1.3 Habitat

Originnaire des régions méditerranéennes, en Algérie *Rosmarinus officinalis* L. est une espèce des régions du nord essentiellement dans l'ouest de l'Oranie. Cette plante participe d'une façon dominante à des groupements s'organisant le plus souvent dans les zones sèches avec très peu de pluviométrie, elle domine largement l'étage semi-aride voir même aride. Elle apprécie les climats chauds, modérément secs **Heinrich et al. (2006)**.

## Généralités sur les huiles essentielles

### I.9.1.4 L'huile essentielle de Romarin

Suivant l'origine géographique, la composition chimique du *Romarin officinal* varie pour donner trois HE très différentes au niveau de l'odeur et de leurs propriétés thérapeutiques.

**Tableau 1 : Différentes chémotypes de Romarin Zahalka (2014)**

	Romarin à cinéol	Romarin à verbénone	Romarin à camphre
Origine	Maroc, organe distillé : rameaux	France, organe distillé : rameaux	France (Midi), organe distillé : rameaux.
Principes actifs	oxydes : 1,8 cinéole (60 %) cétones : Camphre (10%)	cétones : Verbénone (30%) camphre (7%)/ oxydes : 1,8 cinéole (20%) / esters acétate de bronyle	Cétones : Camphre (30%) Oxydes : 1,8 cinéole (30%) Monoterpène (40%) : $\alpha$ et $\beta$ -pinène.
Propriétés	mucolytique, expectorante, anticatarrhale Anti-infectieuse respiratoire et fongicide	régulatrice hépatique, cholérétique, cholagogue Mucolytique, expectorante Tonique générale	Décontractant musculaire Cardiotonique (à faible dose) Emménagogue Cholérétique et cholagogue Mucolytique

### I.9.1.5 Principales utilisation

#### Culinaire

- Le Romarin est une épice typique des cuisines, Italienne, Espagnole, et Provençale mais aussi des adeptes en Angleterre. Il fait partie intégrante du plat national Mexicain (rosmaritas).
- Les feuilles fraîches ou sèches, parfument agréablement les viandes, les poissons gras et le foie.

## Généralités sur les huiles essentielles

---

- Les extraits de romarin, notamment ceux dénués d'HE sont utilisés en qualité d'antioxydants pour la conservation des produits alimentaires riches en graisses **Eberhard (2005)**.

### I.9.2 Citronnelle *Cymbopogon citratus*

#### I.9.2.1. Description de la plante

Les feuilles persistantes sont étroites, retombantes à bords coupants et sont munies de graine. Les feuilles sont de couleur gris vert, pouvant atteindre 30 cm à 1 m de long, 1 à 2 cm de large. La Citronnelle possède des tiges aériennes et des rhizomes. Le système racinaire est fasciculé. *Cymbopogone citratus* est une espèce qui fleurit rarement ou presque pas, même en saison pluvieuse (**Van Damme, 2001 ; Pousset, 2004**). Figure 3



**Figure 3 : *Cymbopogon citratus* Eberhard (2005)**

#### I.9.2.2 Systématique

selon **Granda et Gutierrez, 1986**. La position taxonomique de *Cymbopogon citratus* est comme suite :

Règne : plantae

Division : Magnoliophyta

Classe :Liliopsida

Ordre : Cyperales

Famille : Poaceae

## Généralités sur les huiles essentielles

---

Genre : *Cymbopogon*

Espèce : *Cymbopogon citratus*

### I.9.2.3 Habitat

La Citronnelle est une plante tropicale, présente dans le sud-est asiatique, en Inde, mais aussi en Afrique et en Amérique du Sud. Elle pousse dans des terrains légers, bien drainés, fertiles, elle craint les températures froides (en dessous de -7 °C). Elle résiste d'autant mieux au gel qu'elle se trouve dans un sol plutôt sec en hiver, et elle préfère une exposition ensoleillée. **(Eberhard, 2005)**

### I.9.2.4 L'huile essentielle de la plante

Les principaux constituants biochimiques de la plante :

- Aldéhydes monoteréniques : Citral (néral, 25 à 35% ; Géraniol 35 à 47 %)
- Alcools monoterpéniques : Géraniol (1.5 à 8 %)
- Ester monoterpéniques : acétate de géranyle (0.5 à 6%)
- Carbures monoterpéniques : Limonène (0. A 3.5 %)
- Carbures sesquiterpéniques :  $\beta$ -caryophyllène (0.2 à 3.5%), **(Millet, 2013)**.

### I.9.2.5 Principales utilisation

L'huile essentielle sert à parfumer les produits d'entretien, les désodorisants et les gels douche. En l'industrie alimentaire, elle est employée pour aromatiser les pâtisseries et les sucreries ainsi que les limonades. C'est également un agent répulsif contre les insectes, notamment les moustiques. **(Eberhard, 2005)**

Thérapeutique :

Les douleurs articulaires ; musculaires ; mycoses cutanées ; antiviral atmosphérique ; calmante... **(Eberhard, 2005)**



## Chapitre II : Généralité sur les jus de fruits

### II.1 Définitions selon La réglementation (décret du 1erseptembre 2003)

#### II.1.1 Jus de fruits

Jus obtenu à partir de fruits par des procédés mécaniques, fermentescible mais non fermenté, possédant la couleur, l'arôme et le goût caractéristique du fruit dont il provient. Dans le cas des agrumes, le jus de fruits provient de l'endocarpe ; toutefois le jus de limette peut être obtenu à partir du fruit entier (**Elisabeth, 2008**).

La commercialisation se fait après pasteurisation avant embouteillage sachant qu'à l'exception des jus de poires ou de raisins, l'addition de sucres est autorisée soit pour corriger l'acidité, soit à des fins d'édulcoration. Les jus peuvent de plus être restaurés en vitamines (notamment en vitamine c) et en sels minéraux (calcium) qui auraient été perdus lors du processus d'élaboration en quantité au moins égales à celles présentes dans le produit de départ. La teneur de cet ajout doit être mentionnée sur l'emballage. (**Elisabeth, 2008**).

#### II.1.2 Jus de fruits à base de concentré

Produit obtenu, à partir de jus de fruits concentré, après restitution de la proportion d'eau extraite de jus lors de la concentration, l'eau ajoutée présentant des caractéristiques appropriées, notamment des points de vue chimique, microbiologique et organoleptique, de façon à garantir la qualité des jus. La restitution de son arôme se fait au moyen des substances aromatisantes, récupérées lors de la concentration du jus de fruits dont il s'agit ou du jus de fruits de la même espèce et qui présente des caractéristiques organoleptiques et analytiques équivalentes (**Elisabeth, 2008**).

#### II.1.3 Boissons aux fruits

Ce sont des boissons à base d'eau qui contiennent des fruits et/ou du jus de fruits en quantité variable. Elles peuvent être sucrées, carbonatées et aromatisées. Dans certaines nouveautés, l'eau est partiellement remplacée par du lait.

## II.2 La composition

Selon **Jeantet (2007)**, un jus de fruit peut être composé généralement par :

## Généralités sur les jus de fruits

---

-l'eau : le constituant le plus abondant d'un jus de fruit est naturellement l'eau qui représente entre 75 et 90% de la masse.

-le sucre (100 à 200 g/l), selon la norme internationale du codex alimentarius CODEX STAN 247-2005, les sucres entrant dans la composition des jus de fruits, sont : sucre blanc, dextrose anhydre, glucose et fructose, dans des proportions variables selon les fruits.

-les acides organiques (2 à 15g/l) : les principaux acides utilisés dans l'industrie de boisson sont : l'acide malique, l'acide ascorbique, l'acide tartique et l'acide citrique (**Nagy et Shaw, 1990**)

-les arômes : (0.02% du poids total), jouent un rôle dans l'appréciation organoleptique du produit (**Nagy, 1980**)

- Les éléments minéraux : la concentration totale des minéraux dans un jus de fruit dépend de l'origine de fruit. Cependant, le potassium est le minéral le plus abondant (**Arena et Campisi, 1980**).

-les pectines (0.1 à 2g/l) jouant un rôle dans la stabilité colloïdale et la clarification du jus.

-les composés aminés : intervenant dans les réactions de brunissement non enzymatique, ils présentent une teneur de : 0.05 à 0.5g/l **Apfelbaum et al (2004)**.

-les composés phénoliques : substrat du brunissement enzymatique, sont également impliqués dans l'amertume du jus. Leur teneur est de 0.1 à 5g/l (**Lorient, 1998**).

-Solutés peu abondants : comme les composés volatiles et les vitamines qui participent aux qualités aromatiques et nutritionnelles des jus de fruits (**Bourgeois, 2003**)

-Additifs alimentaires : un additif alimentaire correspond à toute substance d'origine naturelle ou synthétique ajoutée de manière intentionnelle et durable à un aliment dans un but technologique (fabrication transformation, préparation, conservation) ou organoleptique. L'additif reste présent dans l'aliment consommé, comme par exemple les conservateurs (**Multon 2002**).

### II.3 Facteurs d'altération

#### II.3.1 Altération microbiologique

## Généralités sur les jus de fruits

---

II.3.1.1 Hygiénique : caractérise un risque pour la santé du consommateur. Une fois le produit altéré, il conduit à des intoxications alimentaires plus ou moins graves selon la nature et le nombre de microorganismes mise en cause (**Bourgeois et leveau, 1991**).

II.3.1.2 Commercial : caractérise le risque d'altération pour abaisser sensiblement la qualité organoleptique du produit au cours de la conservation (**Bourgeois et leveau, 1991**).

### II.3.1.2.1 Modification de l'aspect

Selon **Bourgeois (1996)** la modification d'aspect se fait à différents niveaux :

-Apparition d'une opalescence ou d'un trouble dans les boissons limpides (levures dans les boissons à base d'extrait, levures ou bactéries lactiques dans les boissons au jus de fruits) ;

-Formation d'un anneau, surtout dans les sirops (levures osmotolérantes)

-Apparition de flocons dans des boissons gazeuses (levure) dans des boissons plates (levures ou moisissure ; *Acetobacter*)

-Apparition d'un dépôt (levures)

-Augmentation de la viscosité, gélification (bactérie lactique)

-Diminution du trouble dans des boissons naturellement troubles (organismes pectolytique)

-Décoloration de boissons aux colorants naturels (levures ou bactéries).

### II.3.1.2.2 Augmentation de la pression dans les récipients

Ce phénomène a différentes conséquences telles que le giclage, bombage de contenants non rigides, éclatement (généralement levures fermentation ; parfois bactéries lactiques hétéro fermentaires) (**Bourgeois, 1996**).

### II.3.1.2.3 Modification de l'odeur et de gout

Selon Bourgeois, 1996 la modification de l'odeur et de gout et attribuée à :

-Diminution de goût (levures)

-Odeur et goût de bière (levures)

- Gout aigre (bactérie lactique ou acétique)
- Odeur et goût de beurre (bactéries lactiques)
- Odeur de moisi (moisissure)

### II.3.2 Altérations physicochimiques

La richesse des fruits en plusieurs éléments nutritifs comme les enzymes, les sucres, les acides aminés et la vitamine C peut être la cause principale de l'altération physicochimique.

#### II.3.2.1 Dégradation de la vitamine C

L'une des principales dégradations dans les jus est l'altération de la vitamine C qui peut être provoquée par l'emballage utilisés et les conditions de stockage

Les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur l'altération de la vitamine C sont :

L'oxygène la température la lumière le pH les enzymes et les sels minéraux

**(Gassier, 2000)**

#### II.3.2.2 Brunissement enzymatique

On appelle brunissement enzymatique la transformation enzymatique dans ses premières étapes et en présence d'oxygène, de composés phénoliques en polymère colorés, le plus souvent bruns ou noirs en passant par des teintes intermédiaires de rose rouge ou bleue. Les pigments sombres qui se forment à la fin de cette chaîne de réaction sont désignés par le terme général mélanine **Jeantet et al. (2006)**.

#### II.3.2.3 Brunissement non enzymatique

Le brunissement non enzymatique désigne un ensemble très complexe de réaction entre le sucre et les acides aminés, cette série de réaction s'appelle réaction de Maillard, aboutit à la formation de composés qui modifient la couleur typique en une couleur atypique (brune ou noire). La dégradation thermique des sucres (caramélisation), de l'oxydation chimique des phénols ou des réactions chimiques intervenant au cours de l'oxydation participent aussi au brunissement non enzymatique **Jeantat et al. (2006)**.

### III. Matériel et Méthodes

Notre étude expérimentale c'est étalée sur une période de 6 mois : de mois de février à juillet 2017.

Les différentes expérimentations que nous avons réalisées ont eu lieu dans les structures suivantes :

- ✓ Laboratoire d'hygiène de Blida.
- ✓ Institut Pasteur d'Alger (IPA).
- ✓ Laboratoire d'hygiène de Tipaza.

#### III.1 Matériel

##### III.1.1 Matériel végétal et huiles essentielles

Nous avons utilisées deux huiles essentielles appartenant à deux plantes :

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis*), et la Citronnelle (*Cymbopogon citratus*).

- ✓ Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Des flacons contenant 10 ml d'huile essentielle de Romarin ont été achetés au niveau d'un point de vente de la société (Naturaform Institut), basée à Bouira, productrice d'huiles essentielles à partir de diverses espèces végétales.

L'HE est certifiée 100% naturelle. L'huile essentielle a été extraite de la partie aérienne par entraînement à la vapeur d'eau.

- ✓ Citronnelle (*Cymbopogon citratus*)

L'huile essentielle de Citronnelle (*C. citratus*) a été achetée au niveau de la société « Extral-Bio » de production des huiles essentielles et cosmétiques Bio, sise à Chiffa (Blida). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante (tige et feuilles), cultivée au niveau de ladite société. Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle. Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle est aussi certifiée « Biologique » car provenant d'une culture de Citronnelle où ni engrais ou pesticides chimiques n'ont été utilisés durant la phase de culture.

Durant toute la durée de notre travail, les HE ont été conservées dans des flacons, à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, afin d'éviter les phénomènes d'oxydation ou de contamination.

### II.1.2 micro-organismes

#### Souches bactériennes

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 3 souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et 3 souches isolées cliniquement à partir des prélèvements de malades ayant contracté différentes infections qui proviennent du laboratoire central unité de microbiologie (établissement public hospitalier Djilali Benkhechir d'El Biar) et de laboratoire d'hygiène de Blida. Ces bactéries sont conservées par des repiquages continus, sur des milieux adéquats. Tableau 2

**Tableau 2 :** Souches bactériennes ATCC

Nom	Origine	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+

**Tableau 3 :** Souches bactériennes isolées cliniquement

Nom	Origine	Gram
<i>Escherichia coli</i>	Coproculture	-
<i>Salmonelle arizona</i>	Patient	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Patient	-

#### Champignons

4 levures et 5 moisissures ont été utilisées lors de notre expérimentation. Elles proviennent toutes du laboratoire de Mycologie de l'IPA d'Alger. Elles ont été cultivées et entretenues par repiquage sur gélose Sabouraud au chloramphénicol à 25°C /3 et 5 jours pour les levures et les moisissures respectivement. Tableau 3

**Tableau 4** : Champignons

Nom	origine
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	Infection buccale
<i>Candida albicans</i>	Infection vaginale
<i>Candida tropicalis</i>	Infection vaginale
<i>Candida parapsilosis</i>	Infection vaginale
<i>Aspergillus niger</i>	Contamination de l'air
<i>Aspergillus flavus</i>	Contamination de l'air
<i>Peneciluium sp</i>	Contamination de l'air
<i>Alternaria</i>	Contamination de l'air
<i>Fusarium sp</i>	Contamination de l'air

### II.1.3 Milieux de culture et agents chimiques

Les milieux de culture et les agents chimiques figurent dans l'annexe 1.

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Etude de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE étudiées nous avons adopté pour la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), la méthode de micro-atmosphère et détermination de la CMI par macro-dilution en milieu gélosé.

#### II.2.1.1 Méthode de l'aromatogramme

La FDA (Food and Drug Administration) a approuvé cette méthode comme standard pour le comité national de laboratoire clinique.

Cette méthode a été utilisée par plusieurs chercheurs **Deans et al. (1987)** ; **Zaika (1988)** ; **Pattnaik et Subramanyam (1996)**; **Sivropoulou et al. (1996)** ; **Smith-Palmer et Stewart (1998)** ; **Burt et Reinders (2003)**; **Faleiro et al. (2003)** ; **Wilkinson et Cavanagh (2005)**.

Elle consiste à utiliser un disque stérile (dans notre cas nous avons utilisé un disque de 9 mm de diamètre), qui sera imbibé d'une quantité d'HE puis déposer au centre d'une boîte Pétri contenant le milieu gélosé (MH pour les bactéries et SAB pour les

champignons) préalablement ensemencé par la souche microbienne à tester. Cette technique est identique à celle de l'antibiogramme, la différence demeure dans le remplacement de l'antibiotique par l'extrait aromatique **Satrani (2007)**.

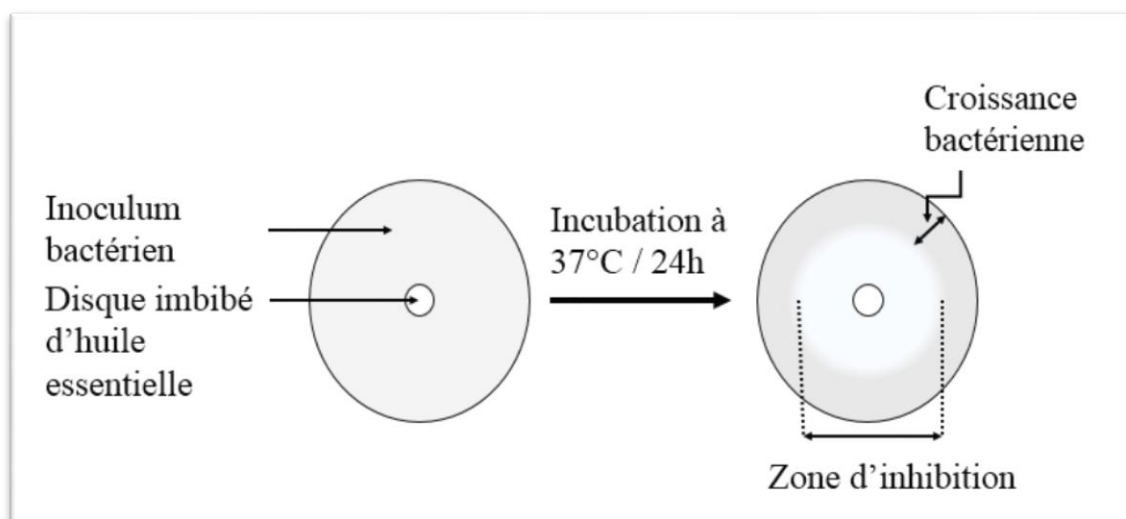
### ✚ Mode opératoire

Dans notre expérimentation nous avons testé l'activité antimicrobienne des HE en imprégnant les disques par des doses croissantes (1 goutte = 20  $\mu$ l, 2 gouttes = 40  $\mu$ l, 3 gouttes = 60  $\mu$ l) par disque, la suspension microbienne a été standardisée (0.5 McFarland pour les bactéries et 1.5 McFarland pour les champignons) et bien homogénéisée au Vortex avant ensemencement.

Les boîtes Pétri seront incubées à (37°C/24h pour les bactéries, 25°C pendant 3 à 5 jours pour les levures et moisissures respectivement).

La lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre de zone d'inhibition DZI en millimètre (mm). Plus le DZI est grand plus la souche est sensible à l'HE. Figure 6

Aussi, pour chaque souche microbienne des témoins positifs ont été réalisés avec des disques d'ATB pour les bactéries et de l'hexamidine pour les champignons, ceci afin de pouvoir comparer leurs pouvoirs antimicrobiens vis-à-vis de notre échantillon HE.



**Figure 4:** Méthode d'aromatogramme.

### II.2.1.2 Méthode de micro-atmosphère

Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composés volatiles des HE **Tyagi et Malik (2011)**.

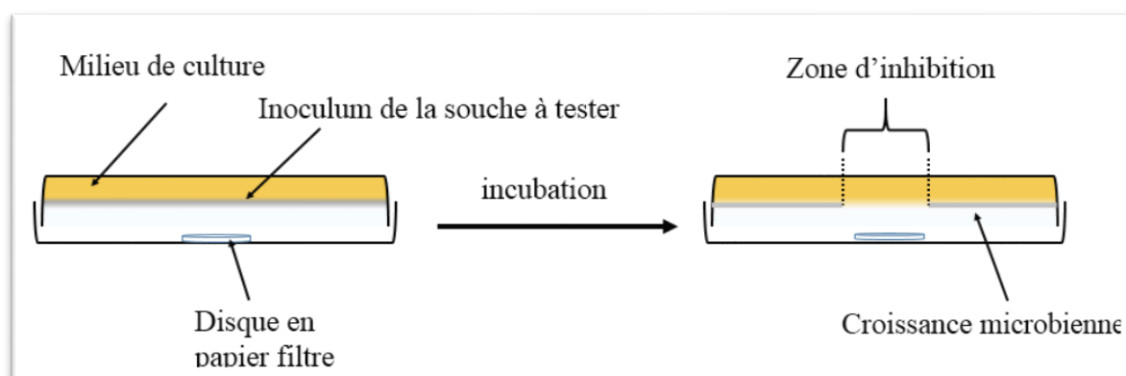


La différence entre cette méthode et la méthode d'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné, le disque sera déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri. Renversée pendant toute la durée d'incubation, celui-ci n'est pas en contact avec le milieu gélosé. Figure 7

### ✚ Mode opératoire

De la même façon que nous avons réalisé la technique de l'aromatogramme nous avons appliqué des doses croissantes au disque (1 goutte déposée sur un disque en papier filtre de 20 mm de diamètre, 2 gouttes déposées sur papier filtre de 40 mm de diamètre, 3 gouttes déposés sur papier filtre de 60 mm de diamètre), la boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise en étuve à 37°C / 24 h pour les bactéries et à 25°C / 3 à 5 jours pour les levures et moisissures respectivement.

Lecture des résultats ; l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus en moins nette à tendance circulaire.



**Figure 5** : Méthode de micro atmosphère.

### II.2.1.3 Détermination de la concentration minimal inhibitrice CMI par macro-dilution en milieu gélosé

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visuellement la croissance d'un micro-organisme après un temps d'incubation **Hammer et al. (1999)** ; **Ponce et al. (2003)** ; **Burt (2004)**.

La CMI est habituellement exprimée en mg/ml ou en %.

Elle consiste à ensemencer par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE déposée de façon homogène est stable dans le milieu de culture. Cette méthode pose un problème de diffusion et d'homogénéité des HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux, ce problème a été résolu par l'utilisation de (DMSO/tween 80) permettant de disperser l'HE dans le milieu de culture.

### Mode opératoire

Une série de dilution est préparée avec un intervalle de concentrations variant de 2% à 0.015%.

La réalisation des dilutions se fait en ajoutant 1ml d'HE à 50 ml de milieu de culture en surfusion 45°C (MH pour les bactéries et SAB pour les levures) supplémenté en DMSO 0.12% v/v.

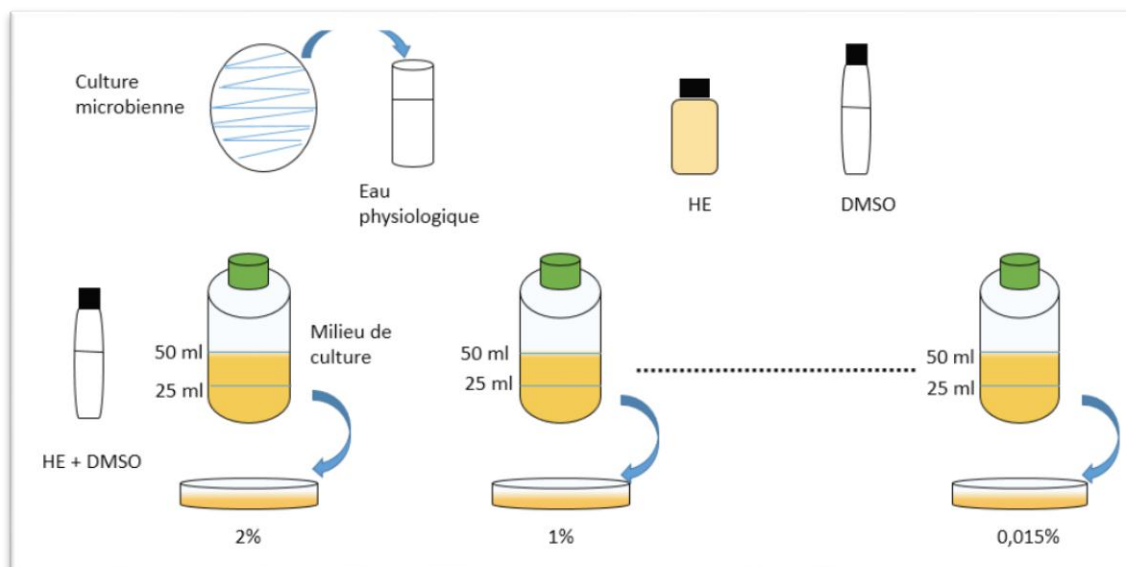
### Préparation des dilutions

- ✓ On prépare une dilution d'HE à 2% en diluant 1 ml d'HE pure dans 50 ml de milieu de culture en surfusion à 45°C, additionné de tween 80 ou DMSO dans un premier flacon.
- ✓ On réalise les dilutions de ½ au ½ en versant la moitié (25ml) de la dilution 2% dans une boîte Pétri, et on laisse solidifier.
- ✓ Sur les 25 ml restant dans le flacon on ajoute 25 ml de milieu de culture ce qui donne la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dilution 0.015%. Figure 8

Chaque boîte est ensuite divisée selon le nombre des espèces à tester.

- ✓ L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile.
- ✓ Les boîtes Pétri seront incubées à 37°C /24 h pour les bactéries et à 25°C /72h pour les levures.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant la plus faible concentration d'HE indiquant l'absence de toute croissance microbienne visible.



**Figure 6 :** Détermination de la CMI.

## II.2.2 Etude de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire

Afin d'évaluer l'activité antifongique de l'HE dans un modèle alimentaire, nous avons opté pour une boisson gazeuse sucrée et fruitée type Orangina® produite localement (unité Djuaguén, Blida). De par son pH acide et la présence de deux conservateurs alimentaires (E 202 : Sorbate de potassium et E211 : Benzoate de sodium), ces types de boissons constituent un milieu défavorable pour la croissance bactérienne. Cependant, leur qualité organoleptique peut être altérée du faite de la possibilité d'une croissance fongique, apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi une souche levuriforme (*saccharomyces cerevisiea*) pour provoquer une contamination dans cette boisson alimentaire et d'apprécier ainsi sa cinétique de croissance en présence de l'HE ou des conservateurs chimiques **Tyagi et al. (2013)**.

A ce fait, 2 types de jus Orangina ont été testés. Le contrôle positif est représenté par un lot de boissons où des conservateurs de synthèses (E202, E211) ont été additionnés. Un autre lot de boissons sans conservateurs sythétiques a été supplémenté de différentes concentrations en HE (400 µl, 200 µl, 100 µl et 50 µl). Un autre lot sans conservateurs synthétiques et qui contient les mêmes concentrations en HE a subi un traitement thermique type pasteurisation (90°C pendant 3 min) pour apprécier l'effet synergique de ce traitement avec la présence d'HE pour une meilleure efficacité antifongique dans les boissons fruitées.

## Matériel et Méthodes

Toutes ces boissons ont été contaminées préalablement par une suspension levurienne de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, des dilutions décimales ont été réalisées ( $10^{-1}$ ) dans l'eau physiologique (NaCl, 0.9%). Ces dilutions vont être analysées par la technique de filtration sur membrane pour apprécier le niveau de contamination fongique initial. Les membranes filtrantes seront déposées sur gélose Sabouraud au chloramphénicol et seront incubées à 25°C pendant 48-72h. La lecture de résultats se résume à dénombrer toute colonie levuriforme. Cette analyse correspond alors à  $J_0$ .

La même démarche opératoire sera répétée à  $J_2$ ,  $J_4$ ,  $J_6$ ,  $J_8$ .



**Figure 7** : Méthode de filtration sur membrane.

### IV. Résultats et Discussion :

#### IV. 1 Résultats et Discussion de la composition chimique de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) :

L'analyse par CG/SM de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* d'origine Algérienne a permis d'identifier 9 composés qui représentent un total de 80.36 %, les résultats sont reportés dans le tableau 4.

**Tableau 5** : Composition chimique de *Rosmarinus officinalis*.

Composés	Pourcentage %
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	44.05
<b>Camphène</b>	6.14
<b>Limonène</b>	5.48
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	3.08
<b>Camphre</b>	8.60
<b>Verbénone</b>	6.37
<b>Terpin-4-ol</b>	2.07
<b>Bornéol</b>	2.57
<b>Linalol</b>	2.00
<b>Teneur total %</b>	80.36

L'HE de *Rosmarinus officinalis* est caractérisée par la teneur élevée en  $\alpha$ -pinène (44.05%) suivit par d'autres composés avec un pourcentage varie de 2 et 8.6 %.

L'étude de **Angioni et al. (2004)** sur la composition chimique de l'HE de *Rosmarinus officinalis* obtenue par hydro distillation a été effectuée par CG/SM dont les échantillons sont collectés de différentes partie de l'Italie, leur travail montrait que le principal composé détecté était le  $\alpha$ -pinène ce qui concorde avec nos résultats.

Contrairement, d'autre publication de **Zaouali et al. (2010)**, concernant la composition chimique de deux variétés de l'HE de Romarin (*Rosmarinus officinalis* var. *typicus* et var. *trogodytorum*), de Tunisie indique que le 1,8 cinéol et le Camphre étaient les deux composés majoritaires dans l'HE de *Rosmarinus officinalis* var *typicus* et *Rosmarinus officinalis* var *trogodytorum* respectivement. Les travaux de **Ayadi et al. (2011)** sur

## Résultats et discussion

---

l'HE de *Rosmarinus officinalis* provenant de trois régions géographiques différentes de Tunisie ( Sidi Bouzide située au sud et caractérisée par un climat sec, Zaghouna située au centre nord de la Tunisie et Bizerte région montagneuse située à 500 m de la mer), extraite par hydro distillation de la partie aérienne du Romarin et analysée par CG/SM, indiquent que les trois régions sont de chemotype 1,8 cinéol.

Aussi, **Jiang et al. (2011)** rapportent que l'HE de *Rosmarinus officinalis* de la Chine est de chemotype 1,8 cinéol (26.54%).

De même, les travaux de **Miladi et al. (2013)** sur les feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* récolté pendant la période de floraison sur les montagnes du sud de la France (climat méditerranéen et région montagneuse), montrent que le 1,8 cinéol était le composé principal avec un taux de 24%, suivit par le Camphre 19.87% et le  $\alpha$ -pinène 19.49%.

Selon **Boutekedjiret et al. (1998)** l'HE du Romarin de la région de Bordj Bou Arreridj s'est révélée de chémotype 1.8 cinéol (52.4%). Egalement, l'étude de **Boutabia et al. (2016)** sur le Romarin de trois sites de la région de Hammamet (Yakous, Draa Hammam et Ammacha) est de chémotype 1,8 cinéol avec 72.91 %, 32,59 % et 32,76 %, respectivement. Selon **Daferira et al. (2003)** L'eucalyptol (31.5%) a été détecté comme le composé majoritaire dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la Grèce.

Par ailleurs, **Gachkar et al. (2007)** rapportent que l'HE de Romarin d'Italie extraite par hydro distillation est riche en Piperitone, principal constituant (23.7%) suivit par le Linalool (14.9) et le  $\alpha$ -pinène (14.9%).

Il est rapporté dans la littérature, que de nombreux facteurs tels que l'origine géographique, le matériel végétal, la saison de récolte des plantes peuvent être à l'origine des variations de la composition chimique. Des auteurs comme **El Emrani et al. (2000)** ; **Pintore et al. (2003)** ; **Ozcan et al. (2008)** ; **Porte et al. (2013)** ont détectés plusieurs chémotypes figurant dans l'HE de Romarin. Une étude comparative menée par **Farhat et al. (2017)** sur principaux constituants de l'huile essentielle de Romarin, provenant de différentes régions (Maroc, France et l'Espagne) révèle une variation des composants majoritaires, l'HE de Maroc a été typiquement riche en 1.8cinéol (43.5-57.7%), tandis que l'HE de l'Espagne et de la France possède le  $\alpha$ -pinène comme principal constituant.

## Résultats et discussion

### IV. 2 Résultats et discussion de la composition chimique de Citronnelle *Cymbopogon citratus* :

L'analyse qualitative et quantitative par CG/SM de l'essence de *Cymbopogon citratus* a permis d'identifier 14 composés qui représentent un total de 91.74%, les résultats sont rapportés dans le tableau 5.

**Tableau 6** : Composition chimique de l'essence de citronnelle (*Cymbopogon citratus*).

Composés	Concentration %
Myrcène	23.92
Limonène	0.07
$\beta$ -Ocimène	1.47
3-Carène	0.99
Citronellal	0.41
Citronellol	0.35
Linalool	6.56
Géranial	28.93
Néral	24.30
Géraniol	2.42
Eicosane	0.19
Nonadecane	0.55
Triacontane	1.33
Tétracosane	0.25

L'HE du *C.citratus* est constituée principalement de :

Géranial (28.93 %), Néral (24.3%), Myrcène (23.92%), Linalool (6.56%) et le Géraniol (2.42%). D'autres composés sont présents mais à des pourcentages inférieurs à 2%.

Pour cette plante les composés monoterpéniques constituent un taux très élevé de 87.67% dont les monoterpènes oxygénés sont la classe chimique majeure avec 62.97%.

Nos résultats concernant le profil chimique de l'essence de *C.citratus* concordent avec ceux de **Chisowa et al. (1998)** ; **Kasali et al. (2001)** ; **Sidibé et al. (2001)** ; **Cimanga**

et al. (2002) ; Lee et al. (2007) ; Tchoumboungang et al. (2009) qui montrent que la concentration de Citral varie entre 45.2 et 68.4%,

Également dans d'autre publication de Sacchetti et al. (2005) ; Santin et al. (2009) ; Bassolé et al. (2011) ; Tyagi et al. (2014) ; Akimmunmi et al. (2016) ; Coelho et al. (2016) ; Fadli et al. (2016) le taux de Citral a été très élevé entre 71.2 et 84.32%.

Il est intéressant de noter qu'il y a une différence importante liée aux facteurs environnementaux qui influencent significativement la composition chimique des huiles essentielles Faleiro et al. (2003) ; Jordán et al. (2013).

### IV.3 Activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* :

L'activité antimicrobienne de l'essence de *R.officinalis* a été évaluée sur 6 souches bactériennes, 4 levures et 5 moisissures. Le potentiel antimicrobien a été vérifié par les méthodes d'aromatogramme, de micro atmosphère et par la détermination de la CMI.

#### IV.3.1 Résultats d'aromatogramme des bactéries :

En phase liquide l'huile essentielle de *R.officinalis* présente une activité modérée, dont les DZI varient de 12 à 20 mm pour les bactéries, pour les disques imprégné de 20 µl d'HE de Romarin. En ce qui concerne la valeur de 40 µl d'HE nous avons noté des DZI de 21 à 24 mm, Pour un disque imprégné de 60 µl nous avons noté des DZI de 23 à 40 mm.

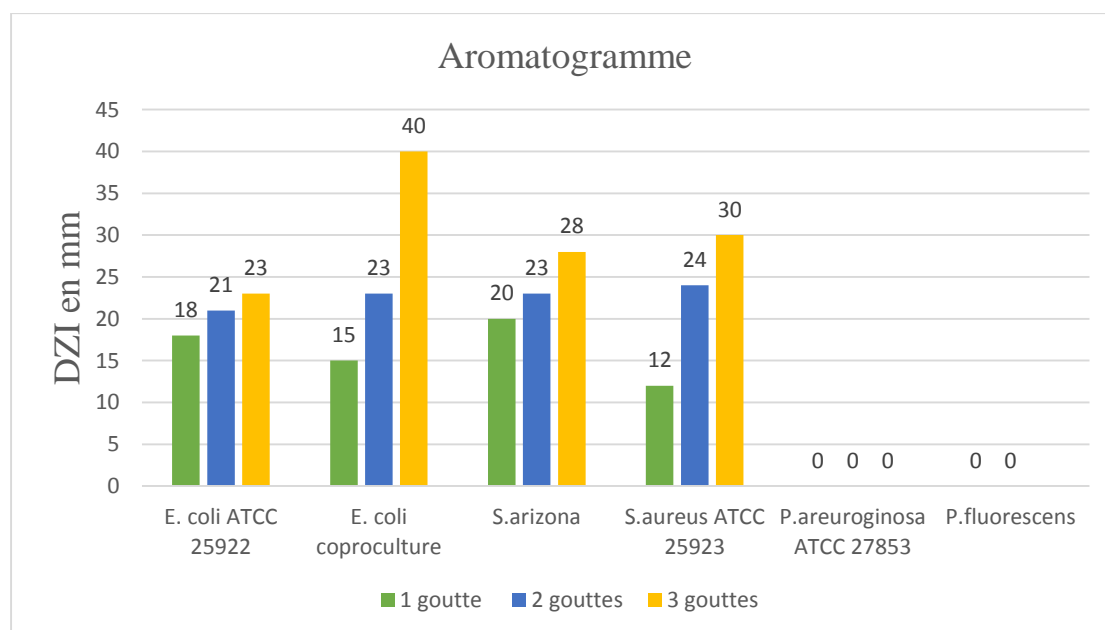


Figure 8 : DZI des bactéries en aromatogramme.



### IV.3.2 Résultats d'aromatogramme des champignons

Pour les levures l'HE de *R.officinalis* à exercer un bon effet avec des DZI allant de 0 à 21mm pour une goutte, de 21 à 35 mm pour 2 gouttes et de 43 à 90 mm pour un disque imbibé de 3 goutte. En ce qui concerne les espèces mycéliennes l'HE de *R.officinalis* a exercé une faible activité contre *A.niger* et *A.flavus* où on a noté un DZI de 17 et de 13 mm pour 3 gouttes d'HE de Romarin.

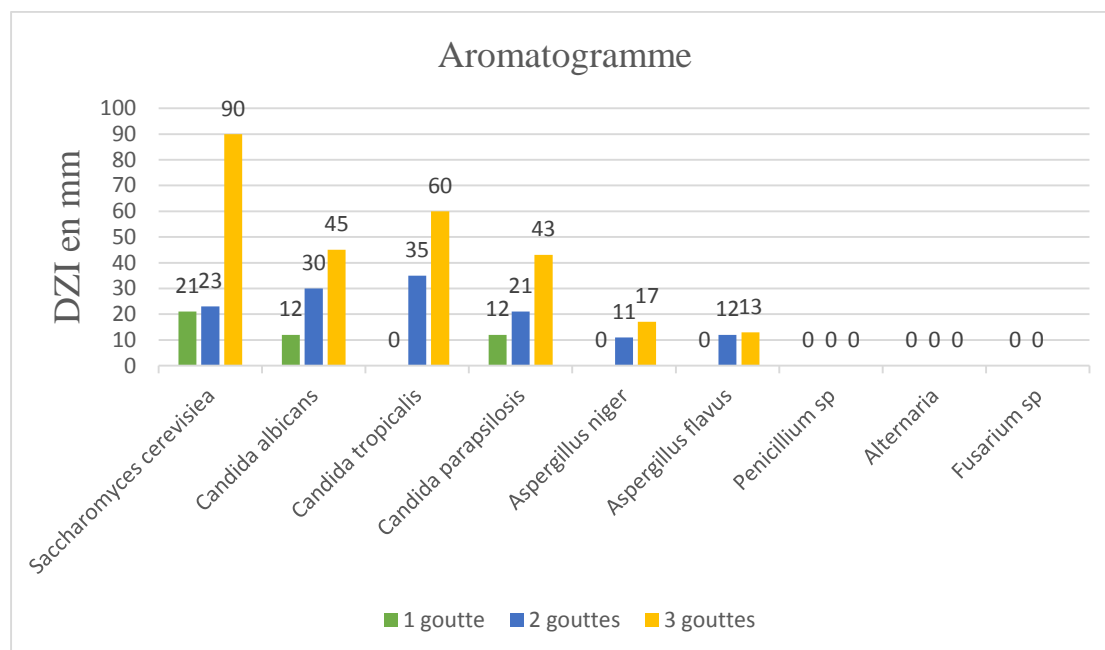


Figure 9 : DZI des champignons en aromatogramme

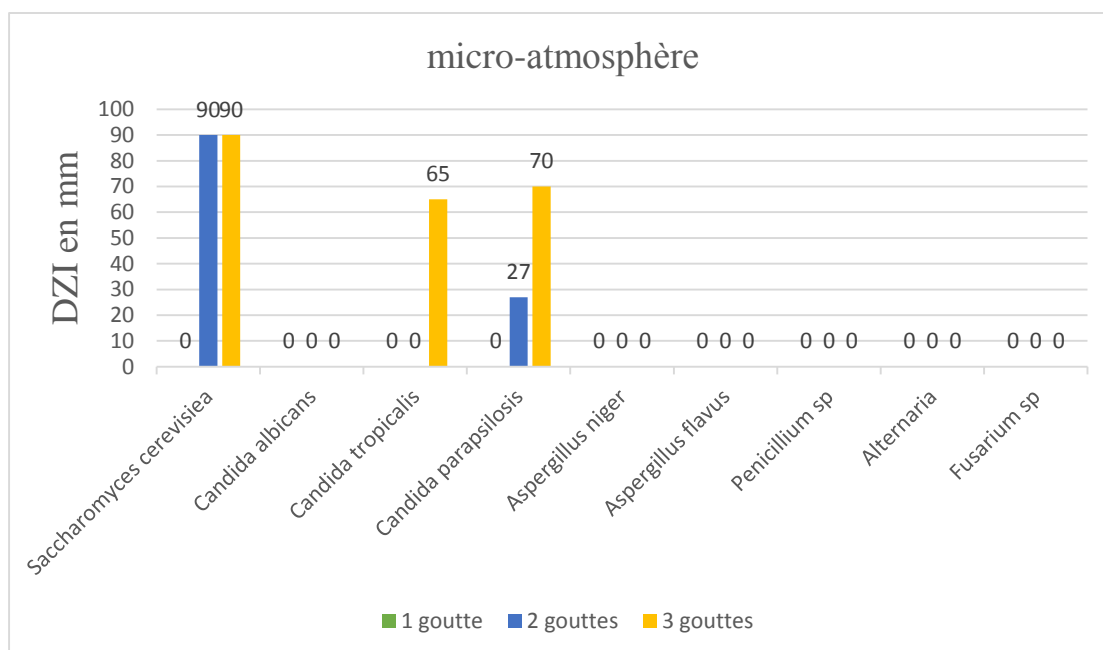
### IV.3.3 Résultats de micro-atmosphère des bactéries

La fraction volatile de l'HE de *R.officinalis* n'a montré aucun effet antibactérien pour 1,2 et 3 gouttes.

### IV.3.4 Résultats de micro-atmosphère des champignons

En phase vapeur l'HE de *R.officinalis* n'a exercé aucune activité pour les espèces mycéliennes seul, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiea* ont été sensible à cette fraction volatile avec des DZI de 65, 70 et 90 mm pour 3 gouttes respectivement.

## Résultats et discussion



**Figure 10** : DZI des champignons en micro-atmosphère.

### IV.3.5 Résultats de la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La détermination des CMI a été faite uniquement pour les germes microbien ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE. Les germes résistants n'ont pas été inclus dans notre recherche. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le tableau 7 pour les bactéries et le tableau 8 pour les levures. En revanche, les moisissures n'ont pas été étudiées car elles nécessitent une approche totalement différente du fait de leur croissance lente et de la nature de la colonie mycélienne (grand tapis fortement fixé au milieu gélosé) d'où l'impossibilité de le retirer en bonne forme.

**Tableau 7** : CMI des bactéries.

Bactéries	CMI en %
<i>E. coli</i> ATCC 25922	< 2 %
<i>E. coli</i> coproculture	< 2 %
<i>S.arizona</i>	< 2 %
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	1 %

## Résultats et discussion

**Tableau 8 :** CMI des levures.

Levures	CMI en %
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	2 %
<i>Candida albicans</i>	2 %
<i>Candida tropicalis</i>	2 %
<i>Candida parapsilosis</i>	2 %

Les résultats de ce screening antimicrobien de l'essence de *Rosmarinus officinalis* semble être similaire avec l'étude de **Farhat et al. (2017)** qui indique que l'huile essentielle de *R.officinalis* a exercé un effet important sur la croissance de *S.aureus* avec un DZI de 17 mm et une CMI de 2mg/ml.

Egalement les résultats de l'aromatogramme de l'étude de **Boutabia et al. (2016)** montre que l'HE pure de *Rosmarinus officinalis* de la région de Hammamat de Tébessa exerce une activité antibactérienne contre 2 souches de *S.aureus* ATCC 25923 et *E.coli* sensible avec des DZI de (17.1, 17.2 mm pour la région de Youkous), (18.1 16.8 mm pour la région de Draa Hammam) et (15.3, 16.2 mm pour la région d'Ammacha).

Une étude récente concernant l'activité antifongique de *Rosmarinus officinalis* de Tébessa menée par **ksouri et al. (2017)** dont les composés majoritaires sont 1.8 cinéol et  $\alpha$ -pinène (31.5-18.33%) respectivement. cette huile essentielle utilisée dans ce travail révèle une bonne activité antifongique contre plusieurs souche de candida ce qui est en concordance avec nos résultats.

Selon **Angioni et al. (2004)** l'essence de *Rosmarinus officinalis* exerce une activité moins marqué sur les espèces fongiques.

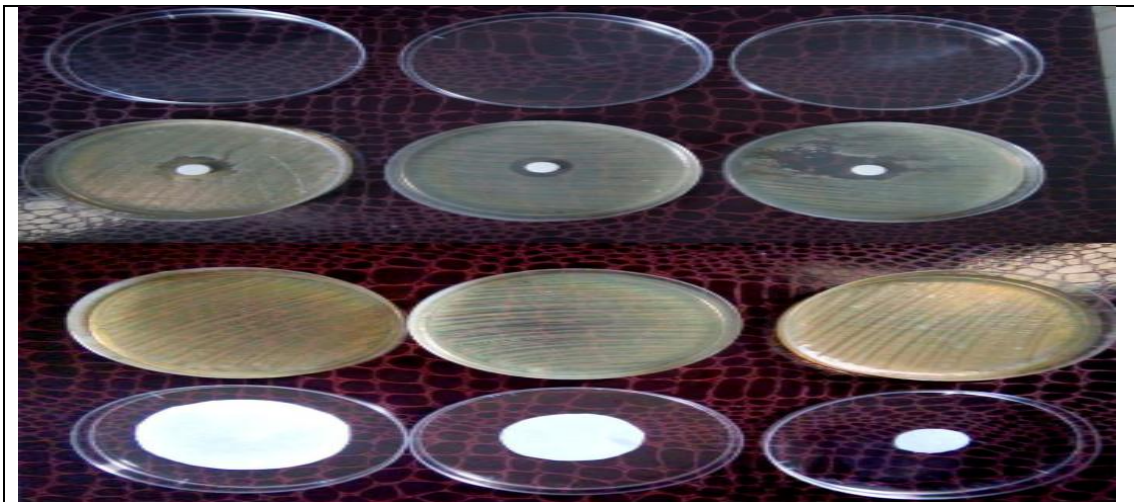
L'étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de micro-atmosphère de l'HE de Romarin menée par **Lopez et al. (2005)** a démontré que l'HE de Romarin dominée par le 1.8 cinéol exerce un effet modéré contre les espèces bactériennes testés tandis que pour *Aspergillus flavus* et *Penicillium isolandian* aucune activité n'a été enregistré.

La variation de l'activité antibactérienne de *R. officinalis* Diffèrent selon la variation quantitative des composés d'huile essentielle **Zaouali et al. (2010)**. **Gachkar et al. (2007)** ont signalé que *R.officinalis* présente une activité antimicrobienne élevée contre *E. coli*, *S. aureus* et *Listeria monocytogenes* qu'est attribuable à l'abondance de

## Résultats et discussion

Borneol, de Camphre et La Verbénone. **Celiktas et al. (2007)** indique dans son étude sur l'activité antimicrobienne de plusieurs souches bactériennes et une souche de *Candida albicans* que l'essence de *Rosmarinus officinalis* collectée de 3 régions de Turquie à 4 saisons de l'année que cette l'HE exerce des effets variables sur les micro-organismes testés cela est attribuée à la localisation et la saison de collecte.

Selon **Angioni et al. (2004)**, une faible activité sur *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* et *P.aeruginosa* ont été signalés Pour les échantillons de Romarin de l'Italie dont le  $\alpha$ -pinène, Camphène et Verbénone ont été les composés dominants.



*E.coli* ATCC 25922



*E.coli* coproculture

## Résultats et discussion



*Salmonella arizona*



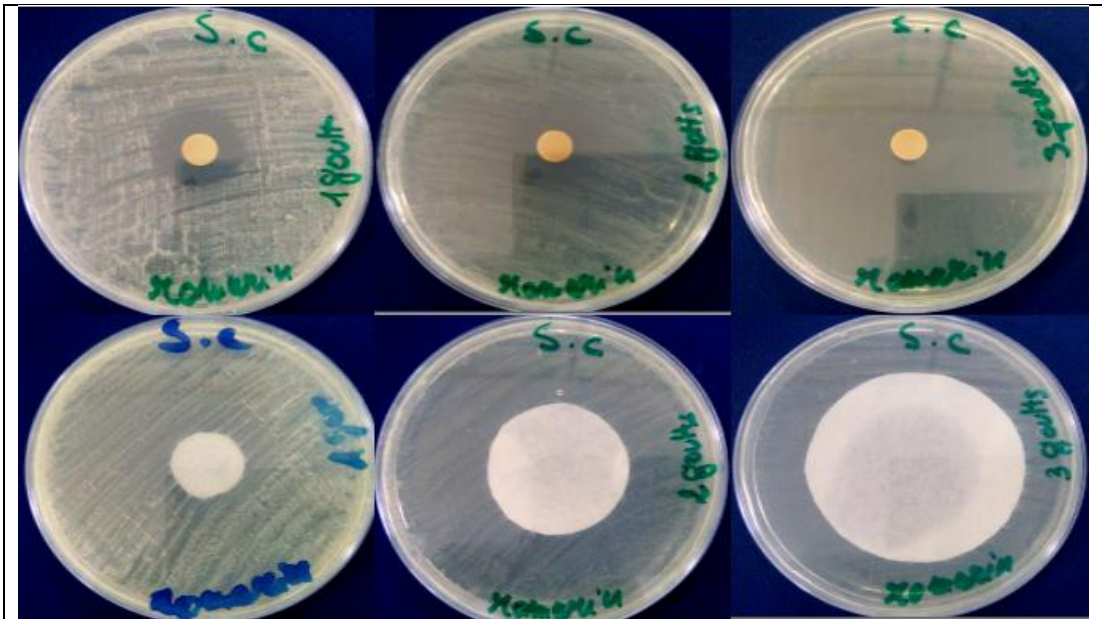
*S. aureus* ATCC 25923



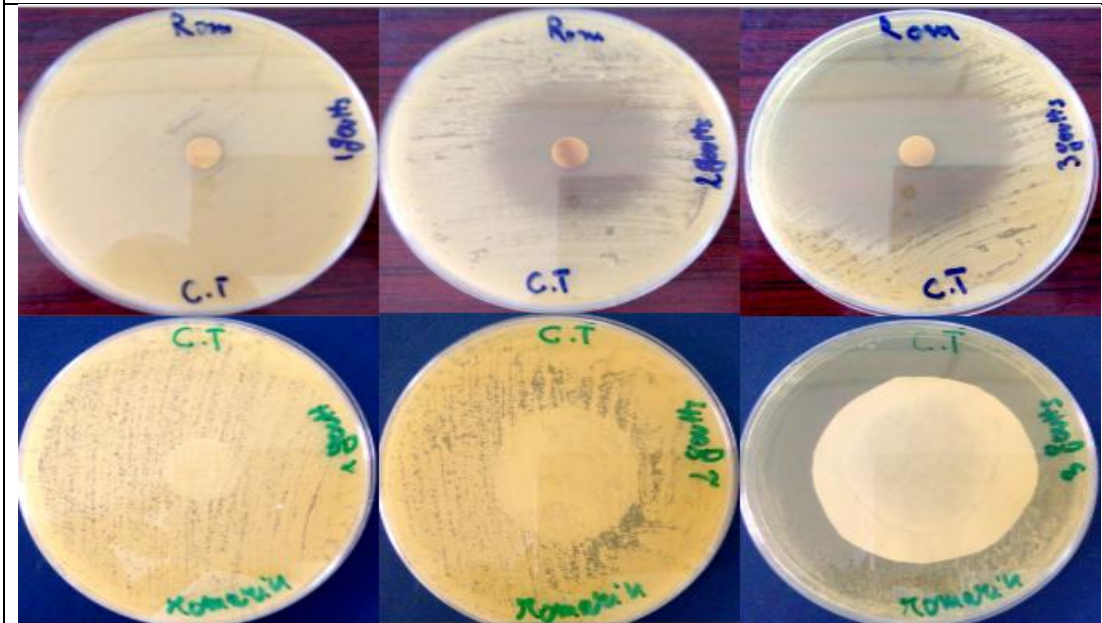
La CMI

**Figure 11** : Résultats de l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis*.

## Résultats et discussion

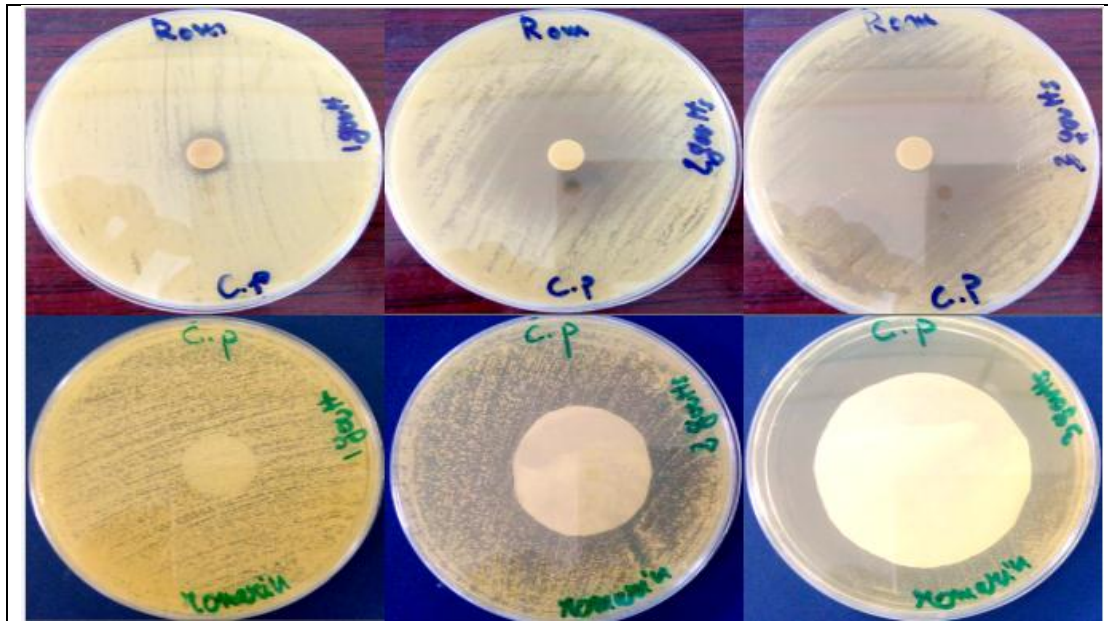


*Saccharomyces cerevisiae*

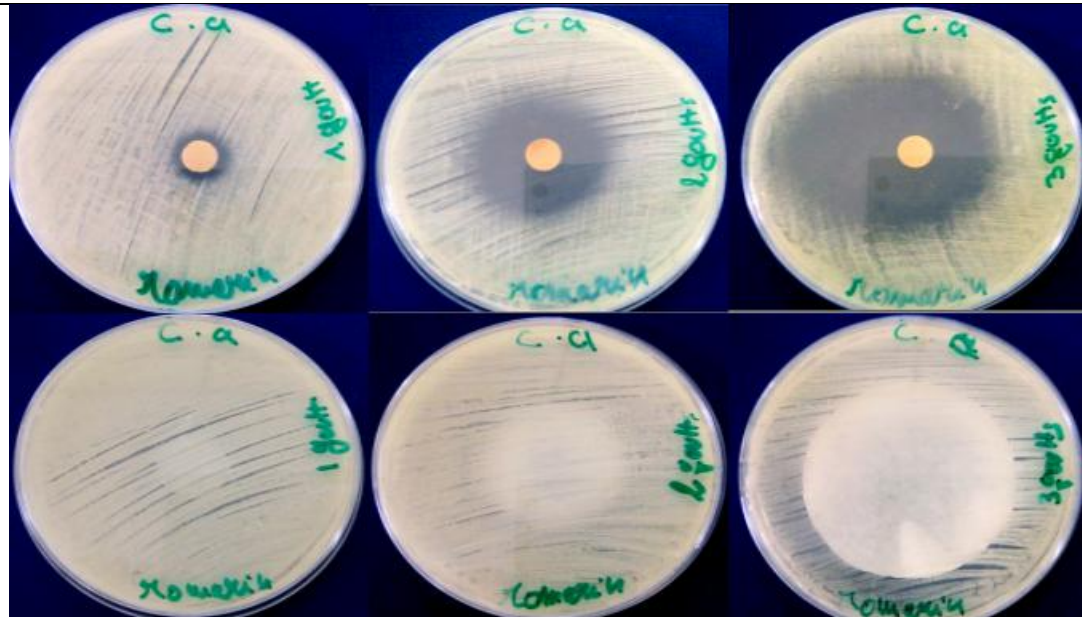


*C. tropicalis*

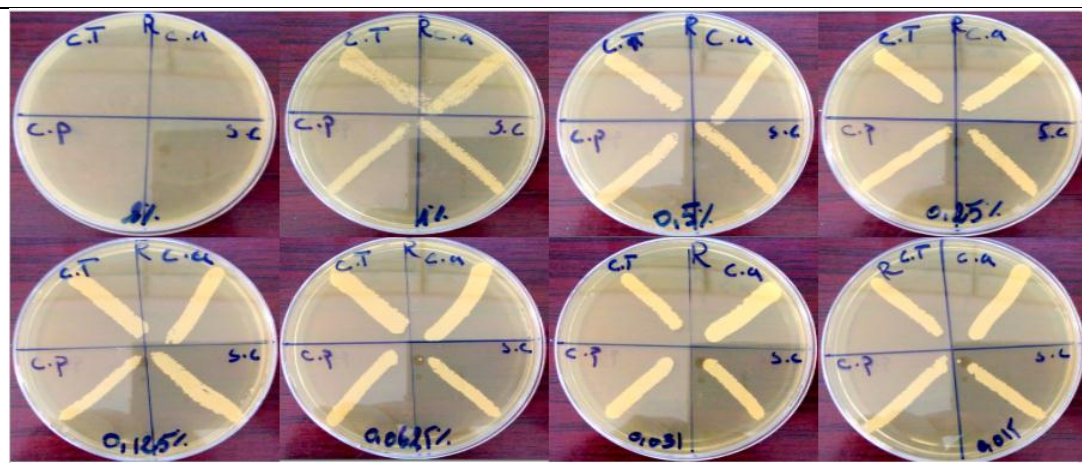
## Résultats et discussion

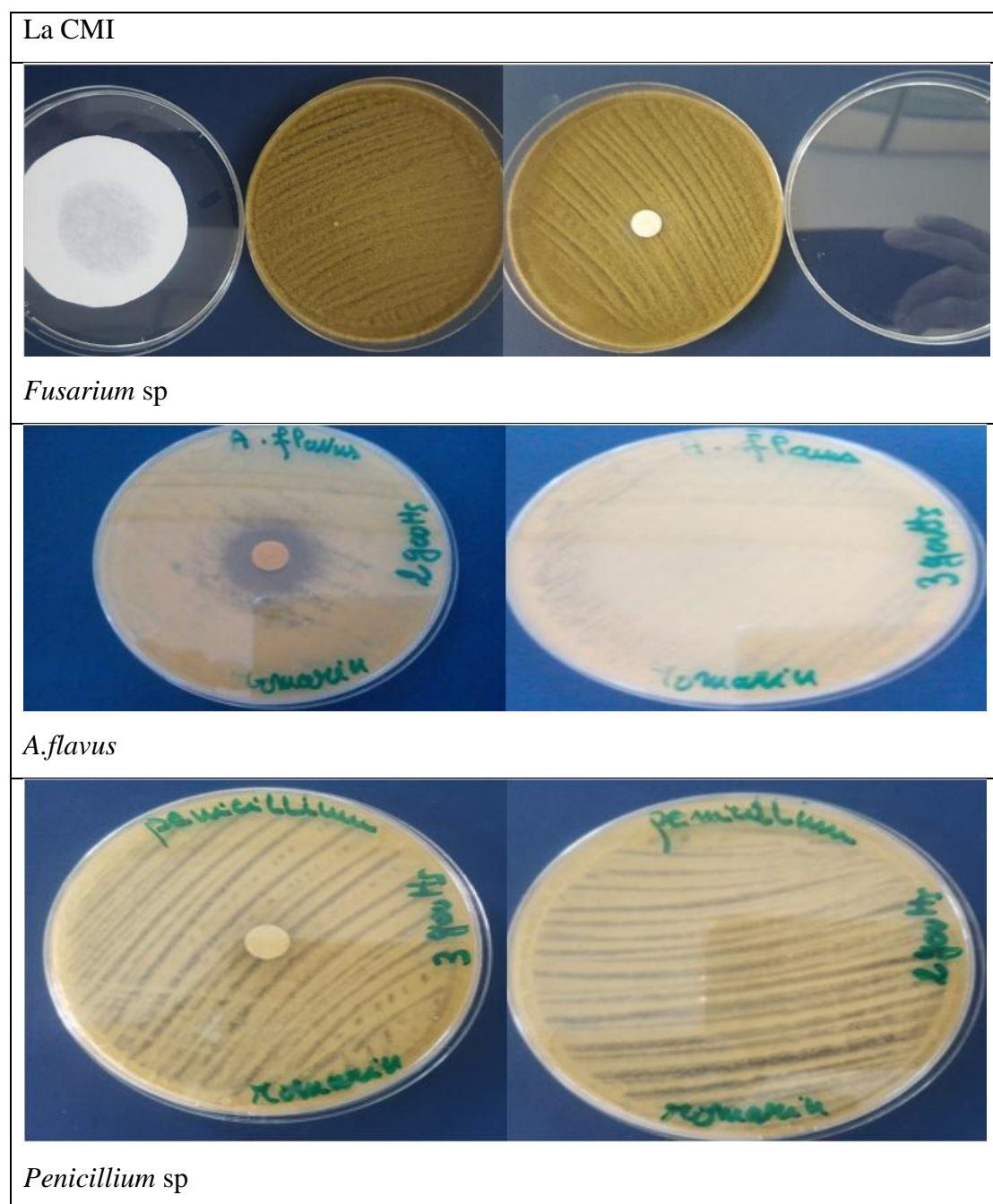


*C.parapsilosis*



*C.albicans*





**Figure 12** : Résultats de l'activité antifongique de *Rosmarinus officinalis*.

#### IV.4 Activité antimicrobienne de *C.citrus*

##### IV.4.1 Résultats d'aromatogramme des bactériennes

L'huile essentielle de *C.citrus* a un effet variable de l'activité antibactérienne contre les espèces utilisées dans cette étude. *S.aureus* ATCC 25923 a été la souche la plus sensible à l'essence de *C.citrus*, tandis que *P.aeruginosa* et *P. fluorescens* ont été les souches les plus résistantes. Pour les deux espèces d'*E.coli* (copro), *E.coli* ATCC 25922



## Résultats et discussion

---

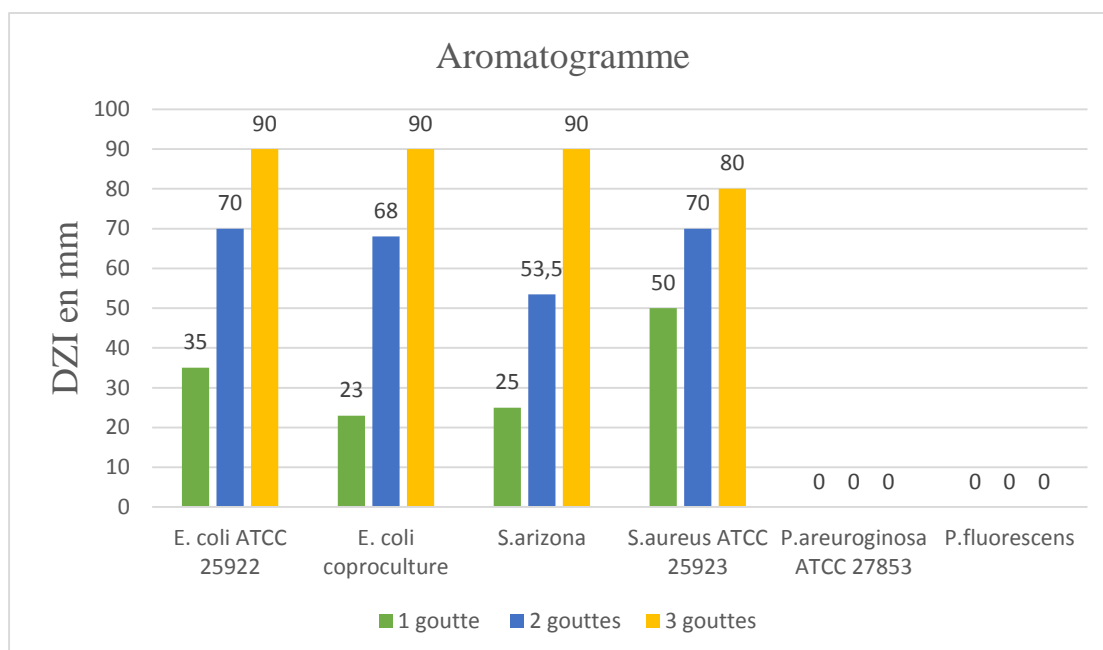
et l'espèce de *Salmonella arizona* l'huile essentielle de *C.citratu*s a exercé un effet modéré dans le cas d'une concentration de 20 µl, des DZI allant de 23 à 30 mm ont été notés.

Les résultats obtenus ont été validés par plusieurs études antérieures qui ont révélé que plusieurs souches bactériennes, à l'exemple d'*E.coli* **Ogunlana et al. (1987)**, de *S. aureus* **Syed et al. (1995)** ; **Ahn et al. (1998)** ; **El-Kamali et al. (1998)**, *Salmonella typhi* **Syed et al. (1995)** ; **Chalchat et al. (1997)** sont sensibles à la phase liquide de l'HE de Citronnelle.

En effet, la souche à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) a manifesté une sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE avec un diamètre qui varie entre 50 et 80 mm d'inhibition alors que certaines bactéries Gram- ont présenté une grande résistance, notamment les espèces de *P.aeruginosa* et *P.fluorescens*. Ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne **Cox et Markham (2000)** ; **Walsh et al. (2003)**.

De ce fait, le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K<sup>+</sup>) : ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à Gram positive (*Staphylococcus aureus*) et Gram à négative (*Escherichia coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* **Cox et al. (2000)** ; **Carson et al. (2002)**. Aussi du type de micro-organismes : en général, les bactéries Gram à négatif sont plus résistantes que les Gram à positif grâce à la structure de leur membrane externe qui est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux de Gram positive qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaires comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupements fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable **Dorman (2000)**.

**Cimanga et al. (2002)** ont confirmé que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles à l'HE de Citronnelle que les bactéries à Gram-.



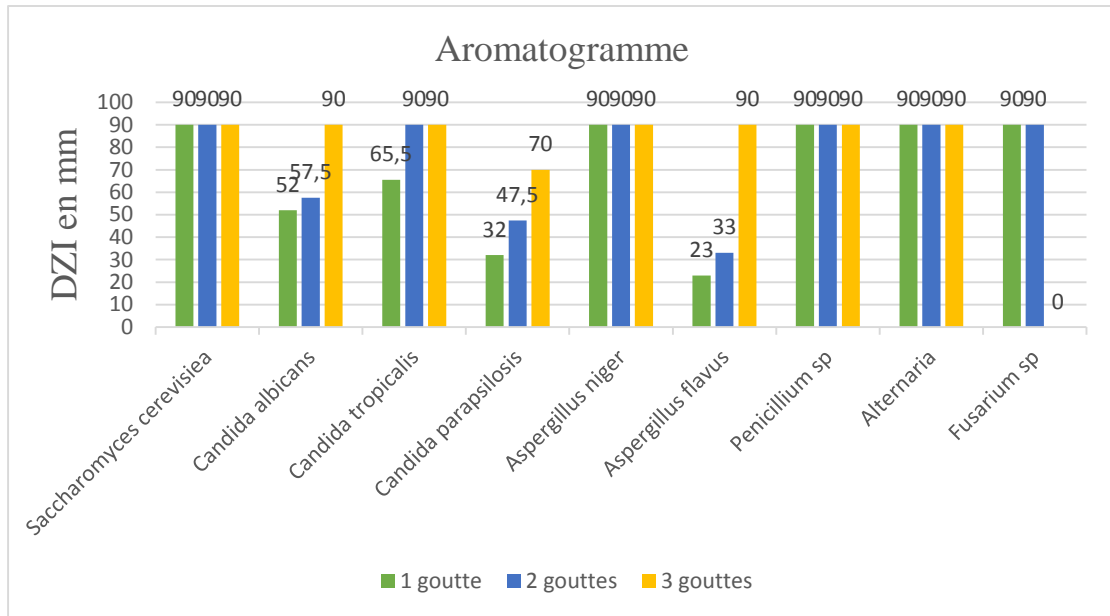
**Figure 13** : DZI des bactéries en aromatogramme

#### IV.4.2 Résultats d'aromatogramme des champignons

Pour les espèces fongiques, l'HE de Citronnelle exerce un effet puissant et on observe une inhibition totale dans le cas de *S.cerevisiea*, *A.niger*, *Penicillium* spp, *Alternaria*, et *Fusarium* spp. Pour les espèces de candida on note un DZI de 32 à 65.5 mm pour 1 goutte, 47.5 à 90 mm pour 2 gouttes, et une inhibition total pour 3 gouttes d'HE.

L'analyse du potentiel antifongique des HE sur *Candida albicans* mené par **Chalchat et al. (1997)** ; **Hammer et al. (1999)** ont confirmé que l'huile de *C.citratus* exerce une activité fongicide. De même, elle a inhibé la croissance d'*A.niger* **Joarder et Khatun (1982)** et d'*A.flavus* **Mishra et Dubey (1994)**. Ces données ont été en totale affinité avec les résultats que nous avons obtenus.

## Résultats et discussion

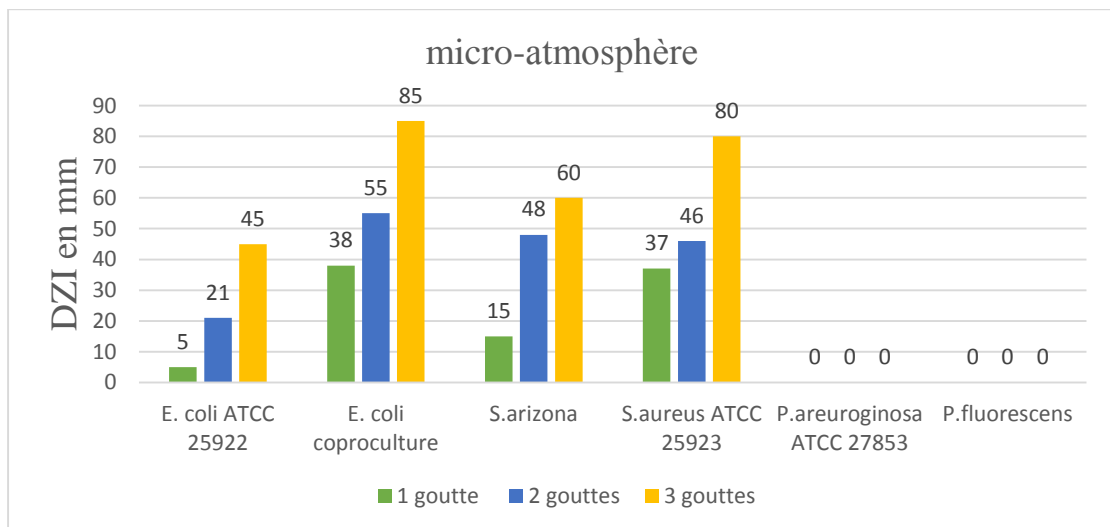


**Figure 14** : DZI des champignons en aromatogramme.

### IV.4.3 Résultats de micro-atmosphère des bactériennes

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de la phase vapeur de l'essence de *C.citratus* on a utilisé la technique de micro atmosphère avec des doses croissantes (1, 2, et 3 gouttes).

En phase vapeur l'huile essentielle de Lemongrass présente une efficacité remarquable sur les sur les bactéries Gram- et sur *staphylococcus aureus* avec des DZI allant de 5 à 38 mm, de 21 à 55 mm et de 45 à 70 pour 1, 2 et 3 gouttes respectivement. Aucune zone n'a été remarquée pour *P.aeruginosa* et *P. fluorescens*.

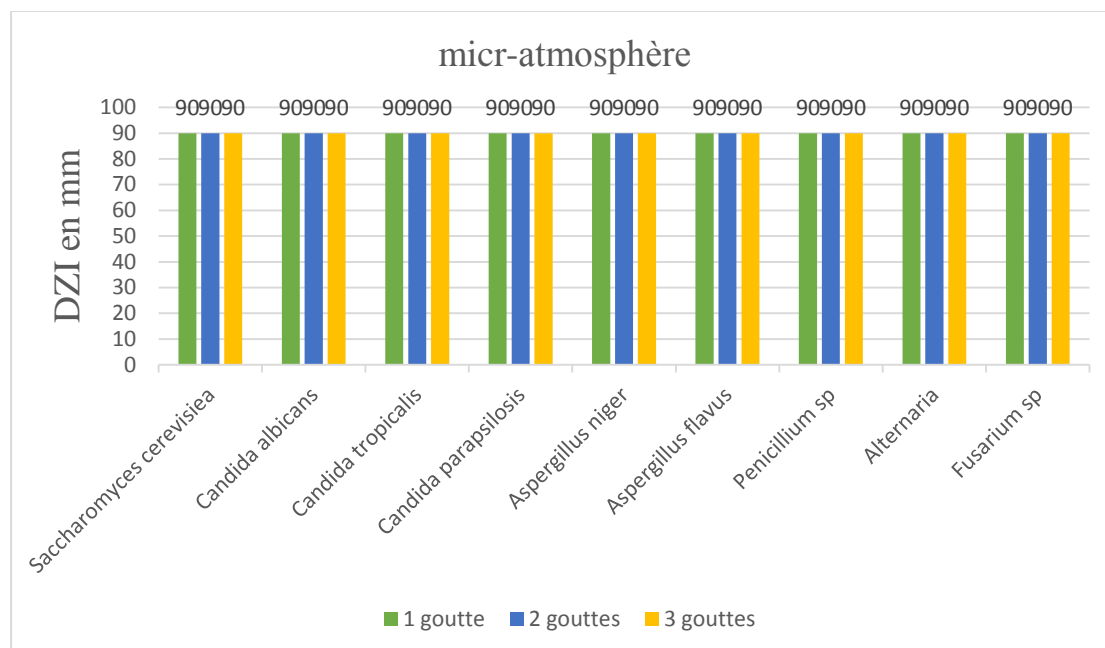


**Figure 15** : DZI des bactéries en micro-atmosphère.

## Résultats et discussion

### IV.4.4 Résultats de micro-atmosphère des champignons

Pour les espèces fongiques on a observé une inhibition totale pour les 3 doses.



**Figure 16** : DZI des champignons en micro-atmosphère

### IV.4.5 Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats de la CMI des bactéries et des levures sont rapportés dans le tableau 9 et 10 respectivement.

**Tableau 9** : CMI des bactéries.

bactéries	CMI %
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5
<i>E. coli</i> coproculture	0.5
<i>S.arizona</i>	0.06
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0.06

**Tableau 10** : CMI des levures.

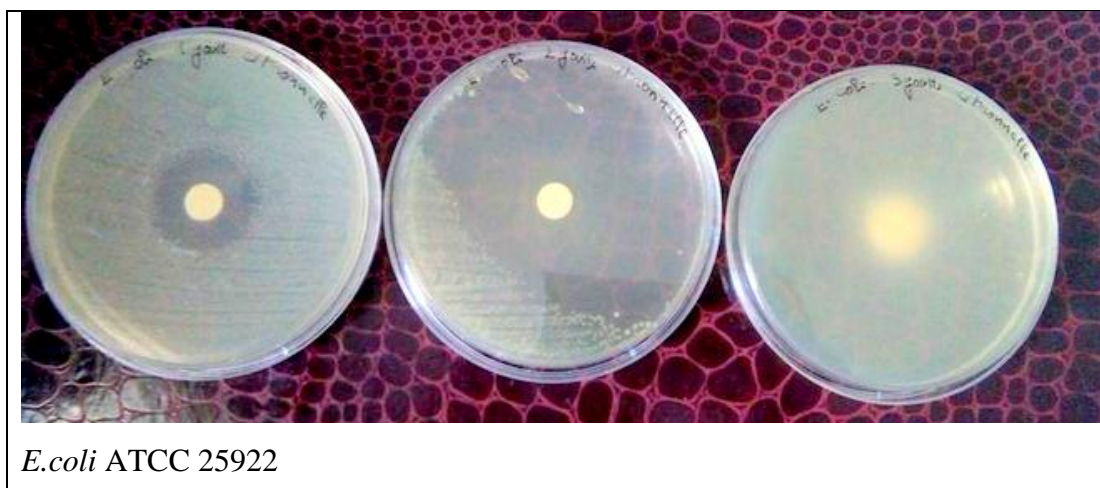
Levures	CMI %
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	0.25

## Résultats et discussion

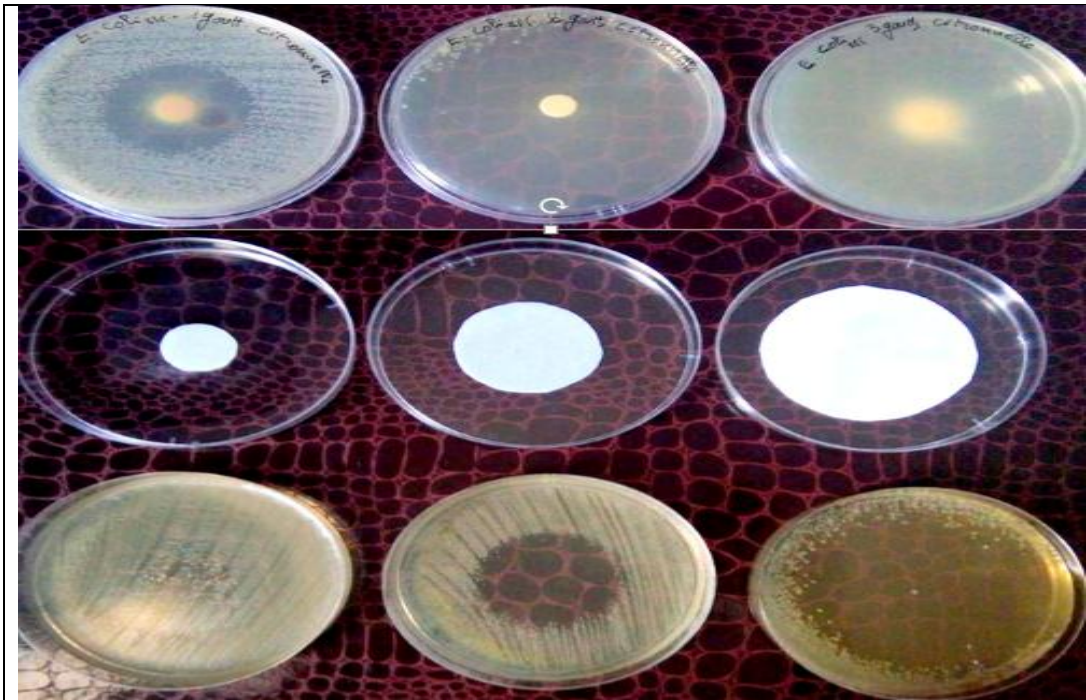
<i>Candida albicans</i>	0.125
<i>Candida tropicalis</i>	0.125
<i>Candida parapsilosis</i>	0.25

**Abe et al. (2003)**, a démontré que l'essence de Citronnelle ainsi que son composé majoritaire le citral réduit de façon significative la croissance mycélienne de *Candida albicans*. Ils ont démontré que le mode d'action de la vapeur réside dans la déformation morphologique et la rupture de la membrane cellulaire de la cellule.

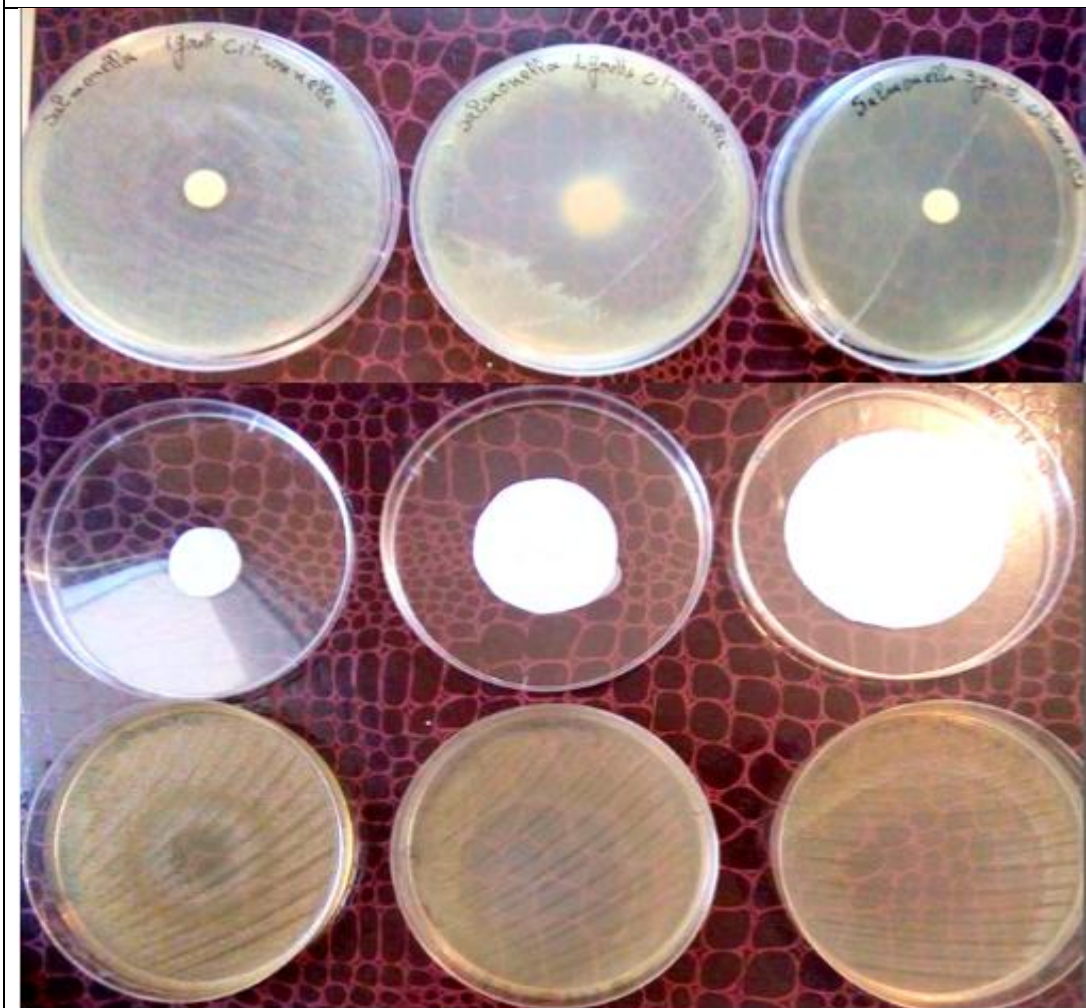
Les résultats du travail de **De Billerbeck (2000)** constituent la preuve certaine de l'action des HE de *Cymbopogon nardus* en phase gazeuse sur *A.niger*. Cette étude a révélé l'influence de l'HE et de ses composés majoritaires sur le développement et la morphologie d'*A.niger*. La croissance du mycélium est totalement inhibée par 800 mg/L d'HE en milieu gélosé. Aussi selon **tyagi et al. (2010)** l'analyse microscopique des cellules de *Candida albicans* traité à la phase vapeur de l'HE de *C.citratus* montre que cette fraction volatil a induit des dommages extensifs et finisse par la mort cellulaire.



## Résultats et discussion

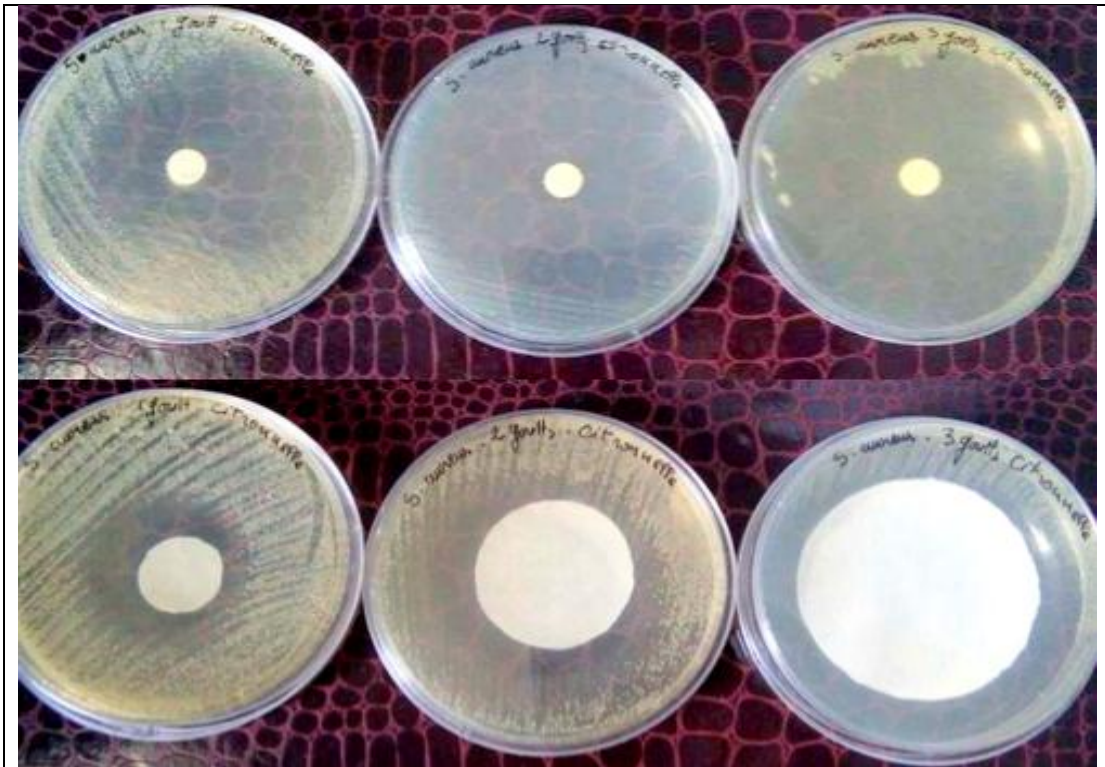


*E. coli* coproculture

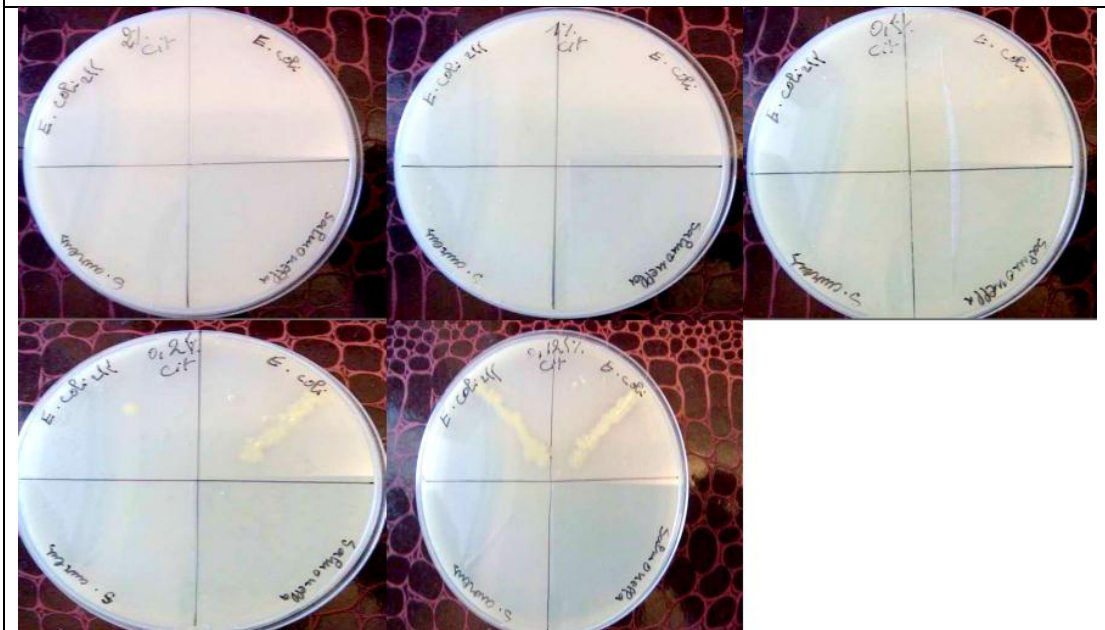


*Salmonella arizona*

## Résultats et discussion



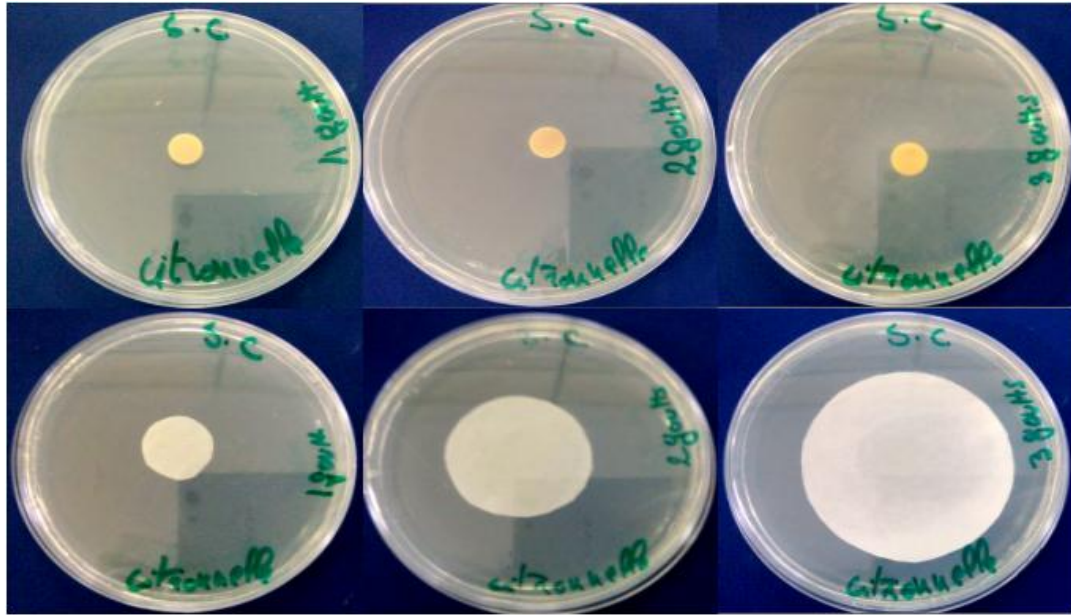
*S. aureus* ATCC25923



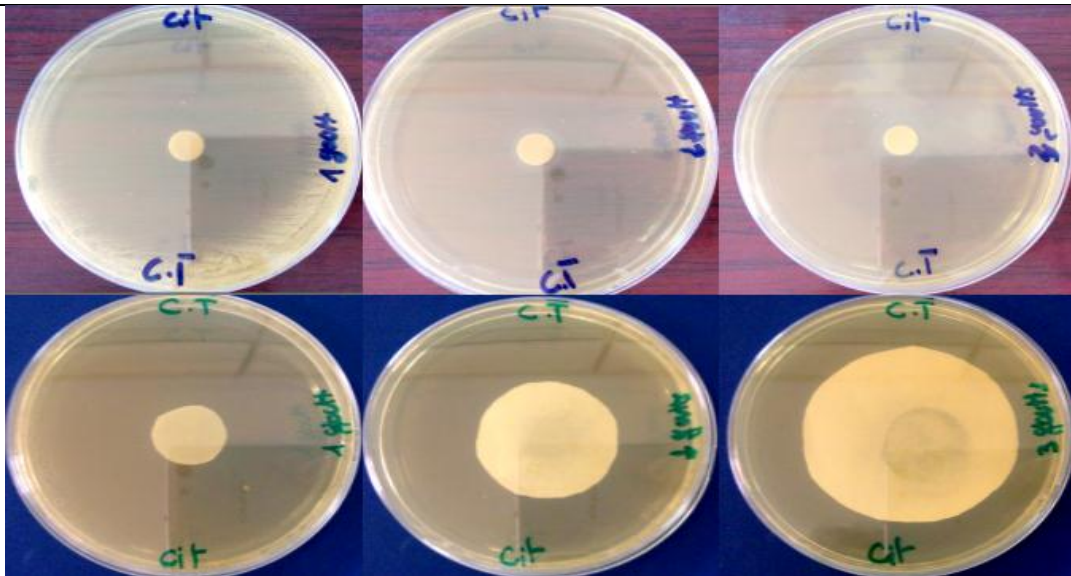
La CMI

**Figure 17** : Résultats de l'activité antibactérienne de *Cymbopogon citratus*.

## Résultats et discussion



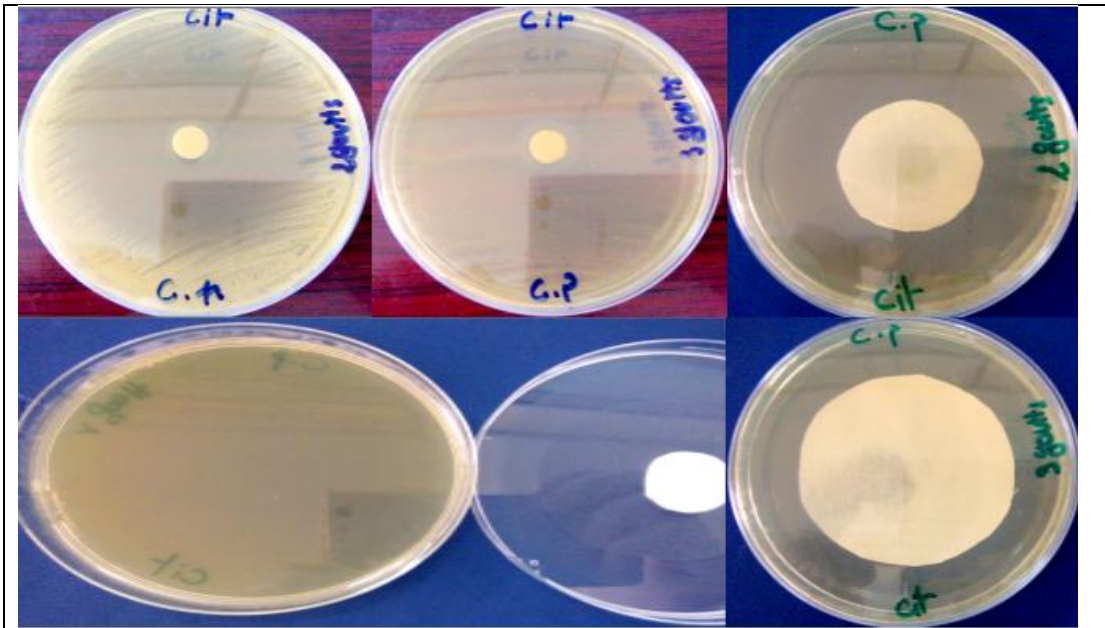
*Saccharomyces cerevisiae*



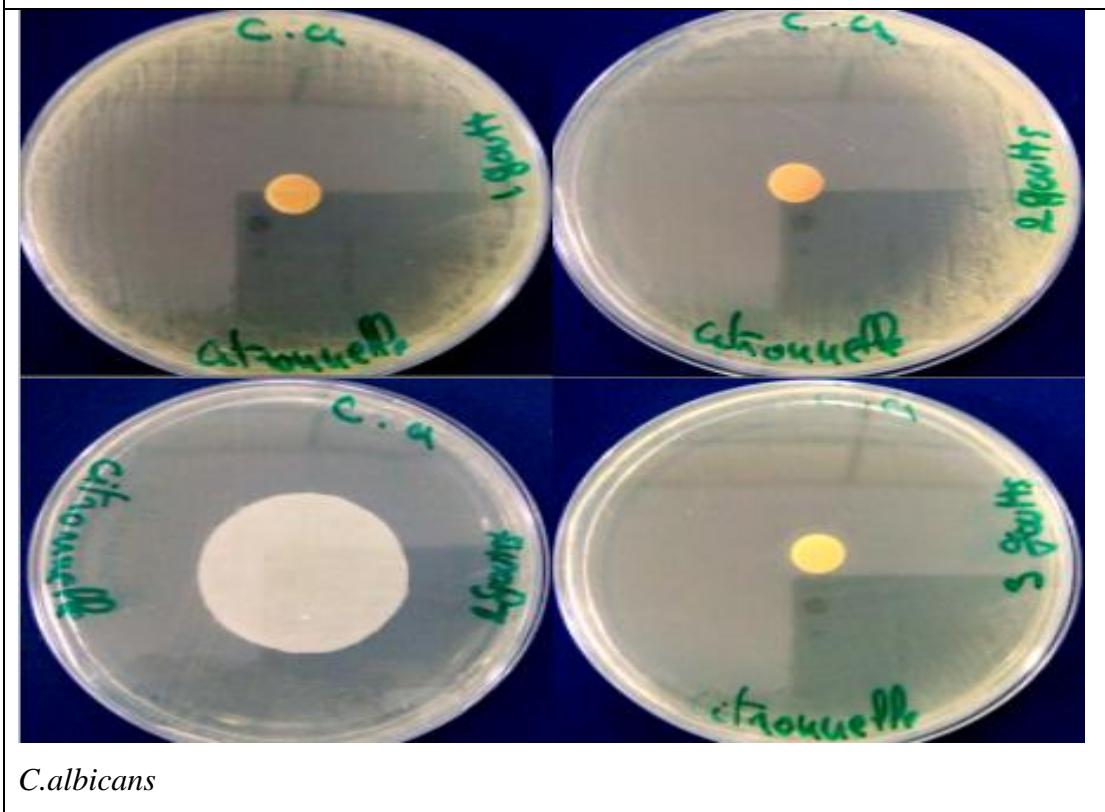
*C.tropicalis*



## Résultats et discussion

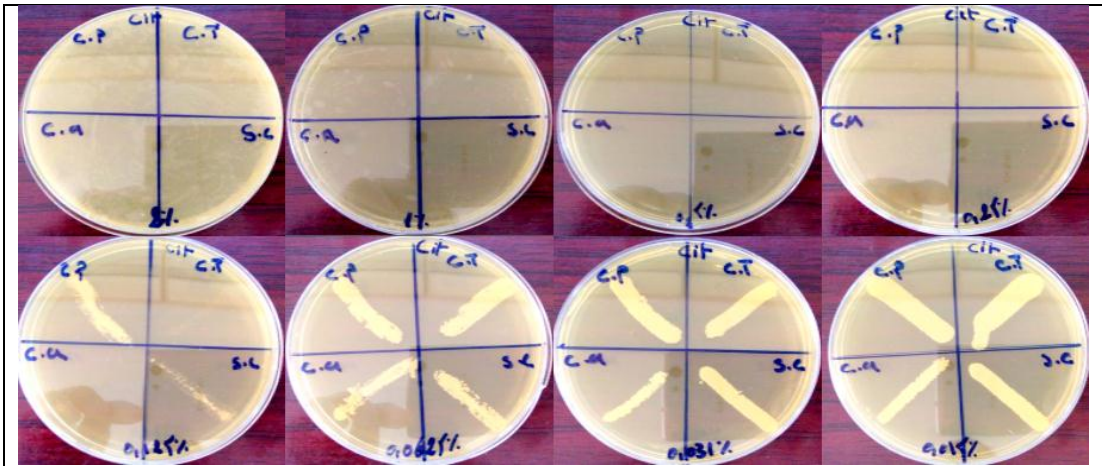


*C. parapsilosis*

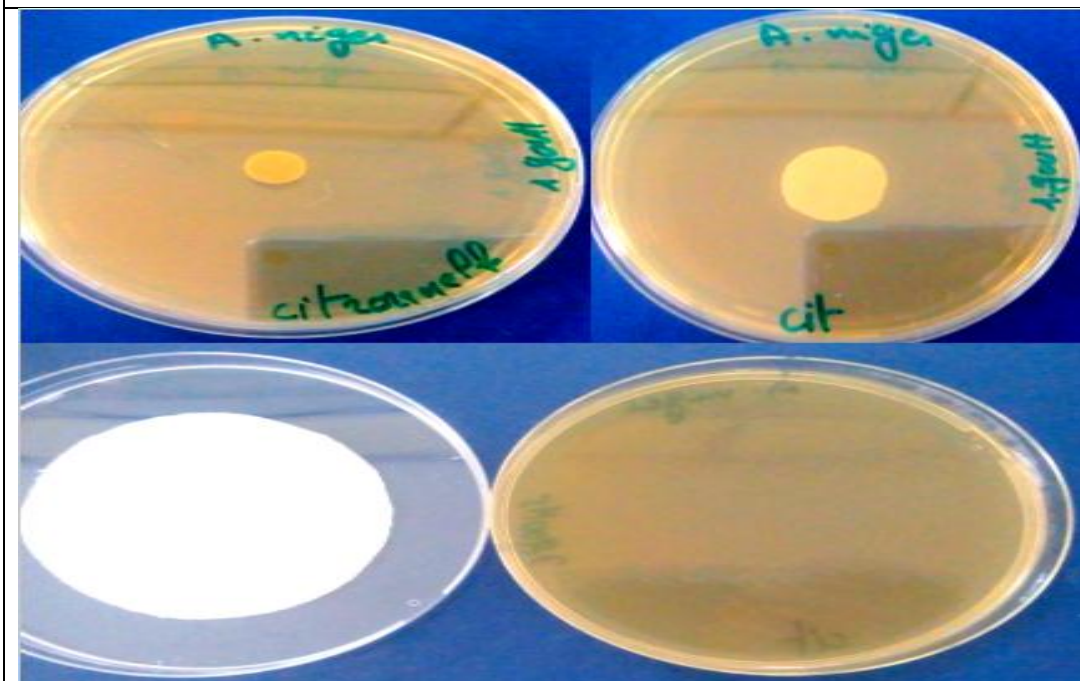


*C. albicans*

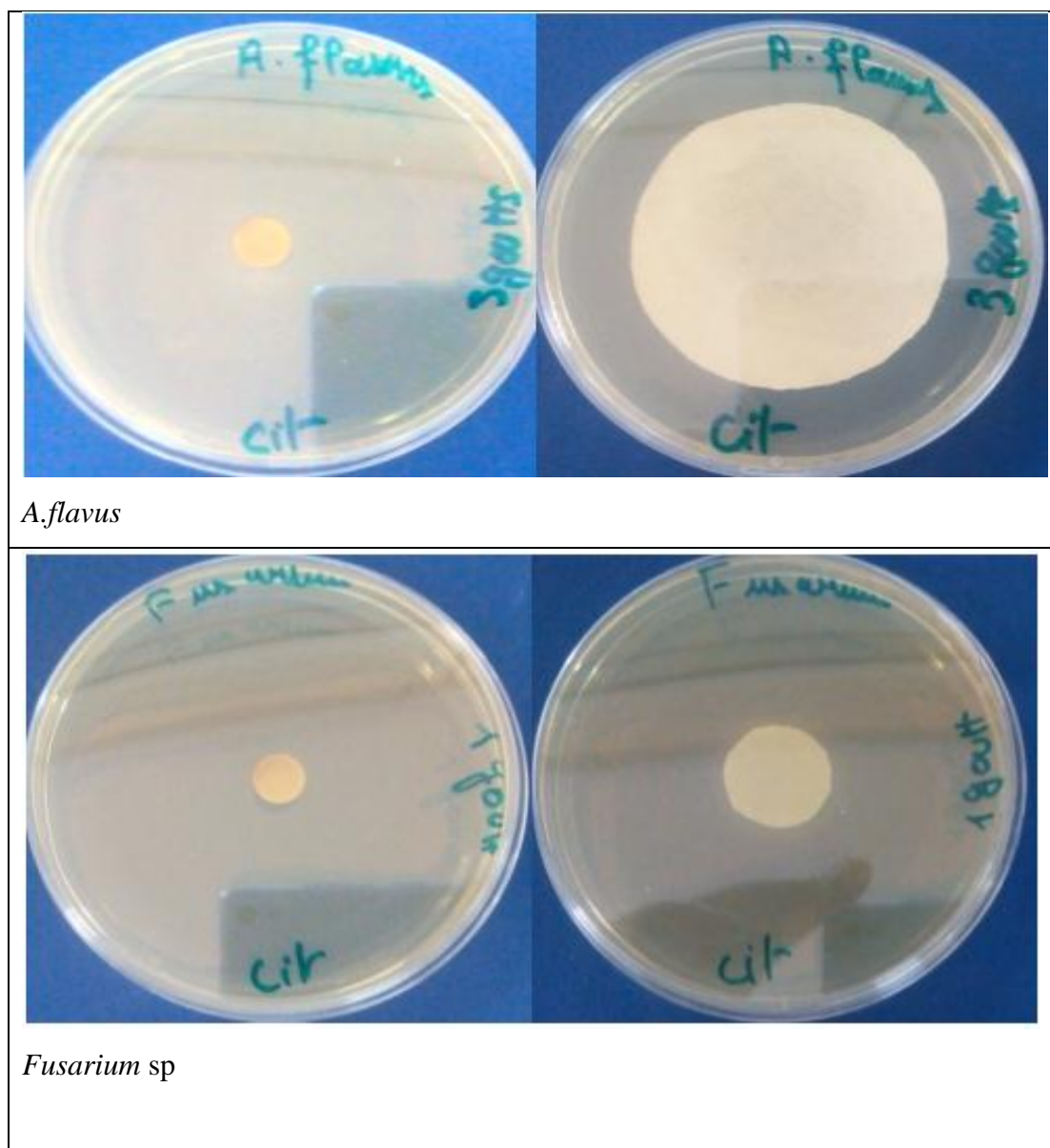
## Résultats et discussion



La CMI



*A.niger*



**Figure 18** : Résultats de l'activité antifongique de l'HE de *Cymbopogon citratus*

### IV.5 Résultats et discussion de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire :

D'après les résultats que nous avons obtenus et qui montrent que l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* a été plus efficace contre les espèces fongiques que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. À cet effet l'efficacité de Lemongrass a été vérifiée en l'incorporant dans une matrice alimentaire, jus de fruit gazeux de type Orangina®.

Pour cela, 2 types de boissons gazeuses fruitées ont été utilisés dans notre étude : un jus pasteurisé sans conservateur et un jus pasteurisé avec conservateur (E202, E211), ce choix a été fait pour apprécier l'efficacité antifongique de l'huile essentielle seule ou

## Résultats et discussion

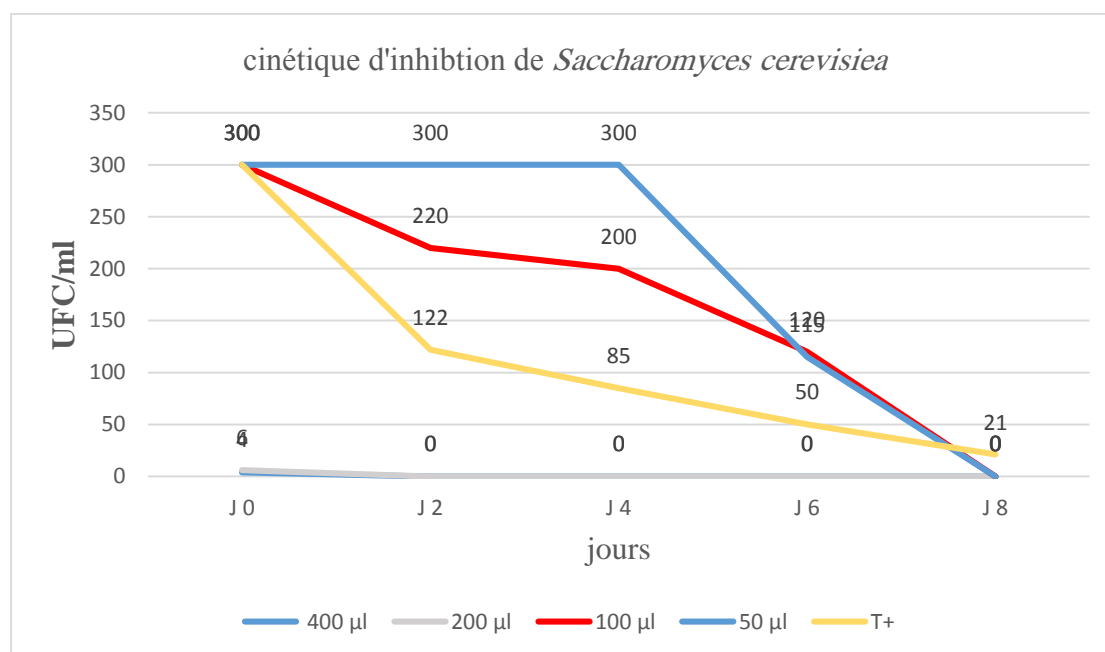
en combinaison avec un traitement thermique en comparaison avec le produit fini avec pasteurisation et les conservateurs. Tableau 8

A J 0 : les résultats révèlent une contamination fongique dans le premier type de jus Orangina® (HE seul).

A J 2 : nous avons remarqué une absence totale de colonies pour le jus contenant 400 et 200  $\mu$ l d'HE et une réduction de nombre de colonie pour la concentration 100  $\mu$ l et qui reste stable à la concentration de 50  $\mu$ l.

A J 4 : nous noté une réduction de colonies jusque 8ième jour où on n'a aucune croissance.

Pour le jus de 2ième type on observe dès J 0 une absence totale de colonies.



**Figure 19** : cinétique d'inhibition de *Saccharomyces cerevisiea*

De nos jours, rares sont les travaux qui ont été consacré à l'étude de l'efficacité antimicrobienne des HE dans une matrice alimentaire **Burt (2004) ; Tyagi et al. (2013)**. La majorité des études sont basées sur l'évaluation de cette activité in vitro.

Cette approche est intéressante d'autant plus que cette essence est classée dans la liste des produits « généralement reconnus comme sains » (Generally Recognized As Safe GRAS), et approuvés comme additifs alimentaires par la FDA (Food and Drug Administration).

## Résultats et discussion

---

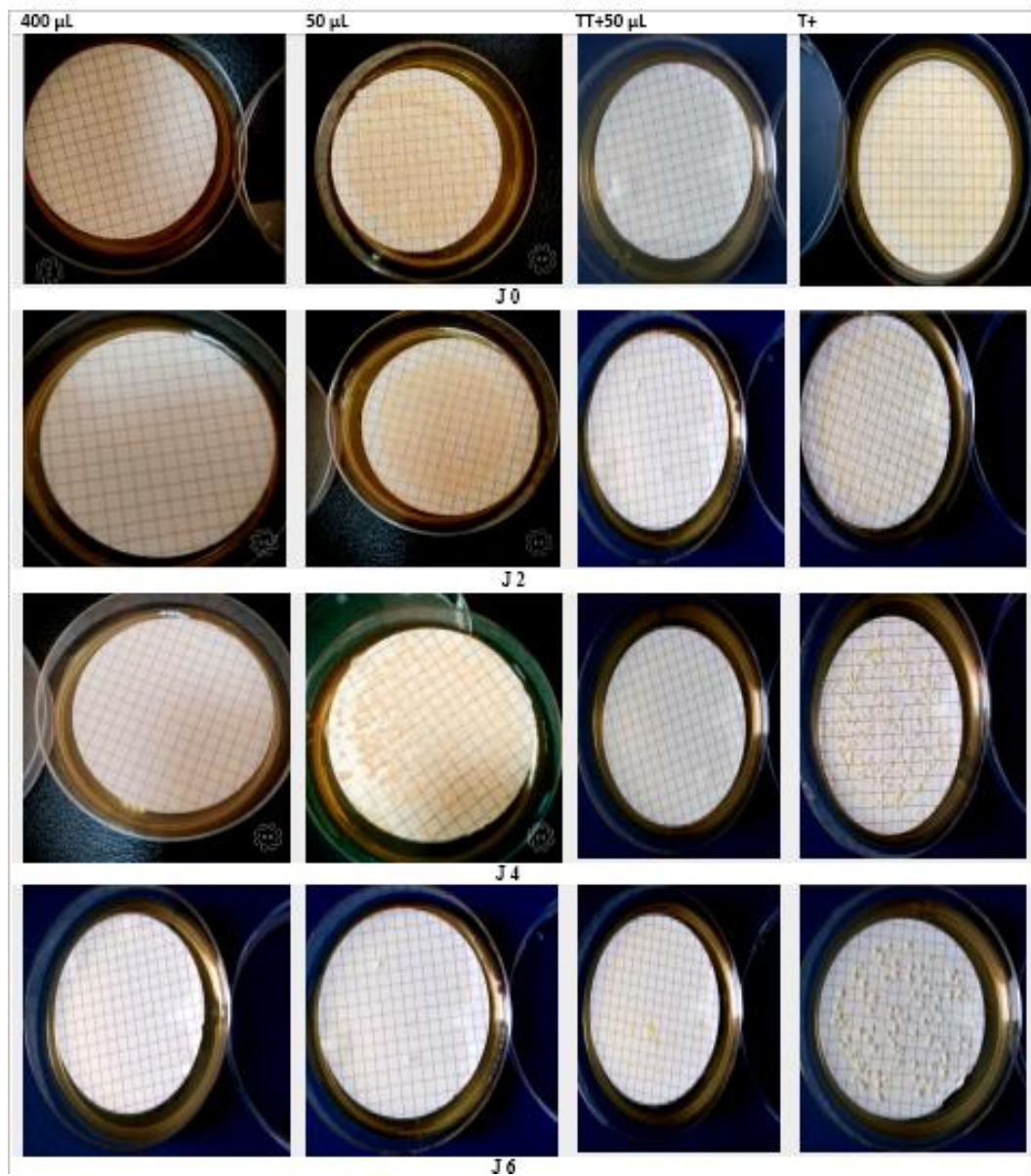
Le autre travail de **Tyagi et al. (2013)**, publié dans « Food Chemistry », a rapporté que l'incorporation de l'essence de Menthe verte, dans les jus de fruit de pomme, était capable de réduire la cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et que cette réduction serait totale en combinaison avec un traitement thermique de courte durée.

L'étude de **Friedmen et al. (2004)** sur l'activité antibactérienne de 17 HE et 9 composants cintre les micro-organismes d'altération alimentaire *E.coli* O157 :H7 et *Salmonella enterica* dans un jus de de pomme, les résultats de cette étude montre la possibilité d'utilisé les HE ou l'un de ces composés comme conservateur alimentaire durant la phase de production ou le stockage des denrées alimentaires.

Aussi selon **Guedes et al. (2014)** l'incorporation de deux huiles essentielles *Mentha arvensis* et *Mentha piperita* dans un jus de fruit a montré une réduction de nombre de bactérie.

Une étude récente menée par **Sanchez-Rubio et al. (2016)** ont montré que l'incorporation de l'huile essentielle de Cannelle en combinaison avec un traitement technologique dans un jus d'orange a induit une inactivation de croissance de *S.cerevisiae*

## Résultats et discussion



**Figure 20** : Résultats de l'activité antifongique dans une matrice alimentaire Jus Orangina® d'HE seule, en combinaison avec un traitement thermique et avec conservateur synthétique.

## Conclusion

La contamination des denrées alimentaires peut avoir un effet plus ou moins grave sur la qualité du produit et sur la santé du consommateur. Elle peut être à l'origine d'une altération du produit, lui faisant perdre ses caractéristiques organoleptiques et ou commerciales et parfois la cause d'intoxications ou toxi-infections graves.

Cependant des conservateurs chimiques synthétiques posent aussi des problèmes en termes de sécurité et de santé humaine. Pour cela les industries agroalimentaires sont orientées vers l'utilisation des extraits végétaux pour la conservation des denrées alimentaires.

A cet effet l'objectif de notre étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et de *Cymbopogon citratus* et de réaliser un test préliminaire de l'huile essentielle comme étant un conservateur alimentaire.

En phase liquide l'essence de *Rosmarinus officinalis* a exercé un effet modéré contre la croissance des espèces bactériennes et levuriennes tandis que les espèces mycéliennes ont présentées une résistance. En ce qui concerne la fraction volatile l'HE de *R.officinalis* n'a pas d'effet sur la croissance bactérienne et mycélienne.

D'autre par des meilleurs résultats ont été obtenus avec l'essence de Citronnelle en phase liquide et vapeur et elle est avérée un fongicide puissant sur les souches mycéliennes et elle est aussi bactériostatique.

D'après les résultats que nous avons obtenus on a pensé à réaliser un test préliminaire de l'essence de *C.citratus* entant que conservateur naturelle dans une boisson gazeuse Orangina®, cette incorporation nous a données des bons résultats sur l'inhibition de *Saccharomyces cerevisiea*. Dans notre travail et au vu des résultats obtenus, nous pouvons recommander cette fragrance comme antimicrobien naturel, en substitution aux additifs alimentaires chimiques, non dénués d'effet indésirables.

Comme perspective il serait intéressant de réaliser des tests de toxicité, pour pouvoir par la suite faire des tests sensoriels, il est aussi intéressant de réaliser des analyses physicochimiques de la boisson gazeuse Orangina avant et après incorporation de l'huile essentielle.

# Annexes

---

## Annexe 1 : Matériel et Méthodes

Milieux de culture : Gélose nutritive, Sabouraud au chloramphénicol, Muller-Hinton.

Agents chimiques : DMSO, Tween 80.

Appareillages : Bain mari, Etuve de 25°C et de 37°C, Autoclave vortex.



Densitomètre

Huiles essentielles :



HE de *Cymbopogon citratus*



HE de *Rosmarinus officinalis*



## Annexes

### Annexe 2 : résultats et discussion

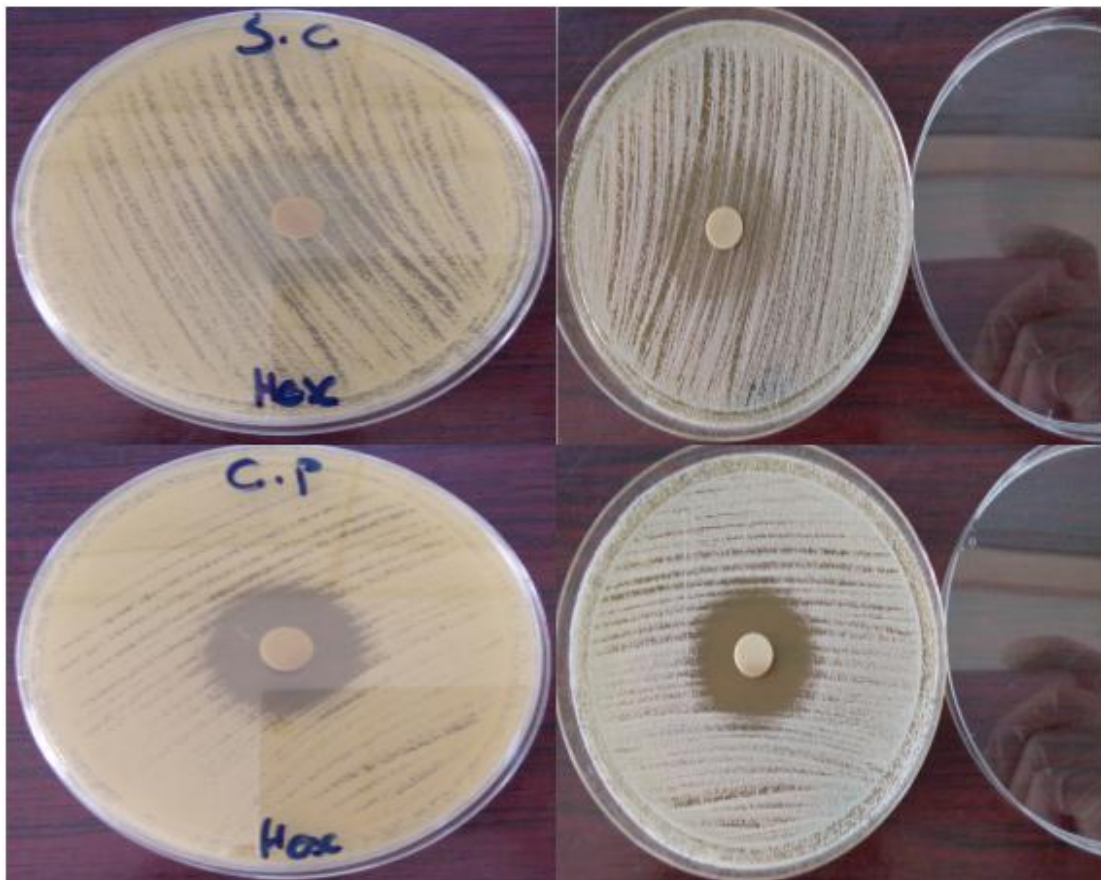
#### Résultats d'antibiogramme

	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P.fluorescens</i>
Antibiotiques	diamètre	
ticarcilline	24 S	21 S
Ticarcilline+Ac.clavulanique	25 S	24 S
piperacilline	24 S	25 S
ceftazidine	24 S	25 S
aztréonam	26 S	25 S
imipenème	34 S	34 S
amikacine	26 S	25 S
gentamicine	25 S	24 S
netilmicine	20 S	20 S
tombramycine	23 S	22 S
ciprofloxacine	34 S	30 S
levofloxacine	S	/
Fosfomycine 50	S	/
Rifampicine 30	S	/
Colistine	16 S	16 S

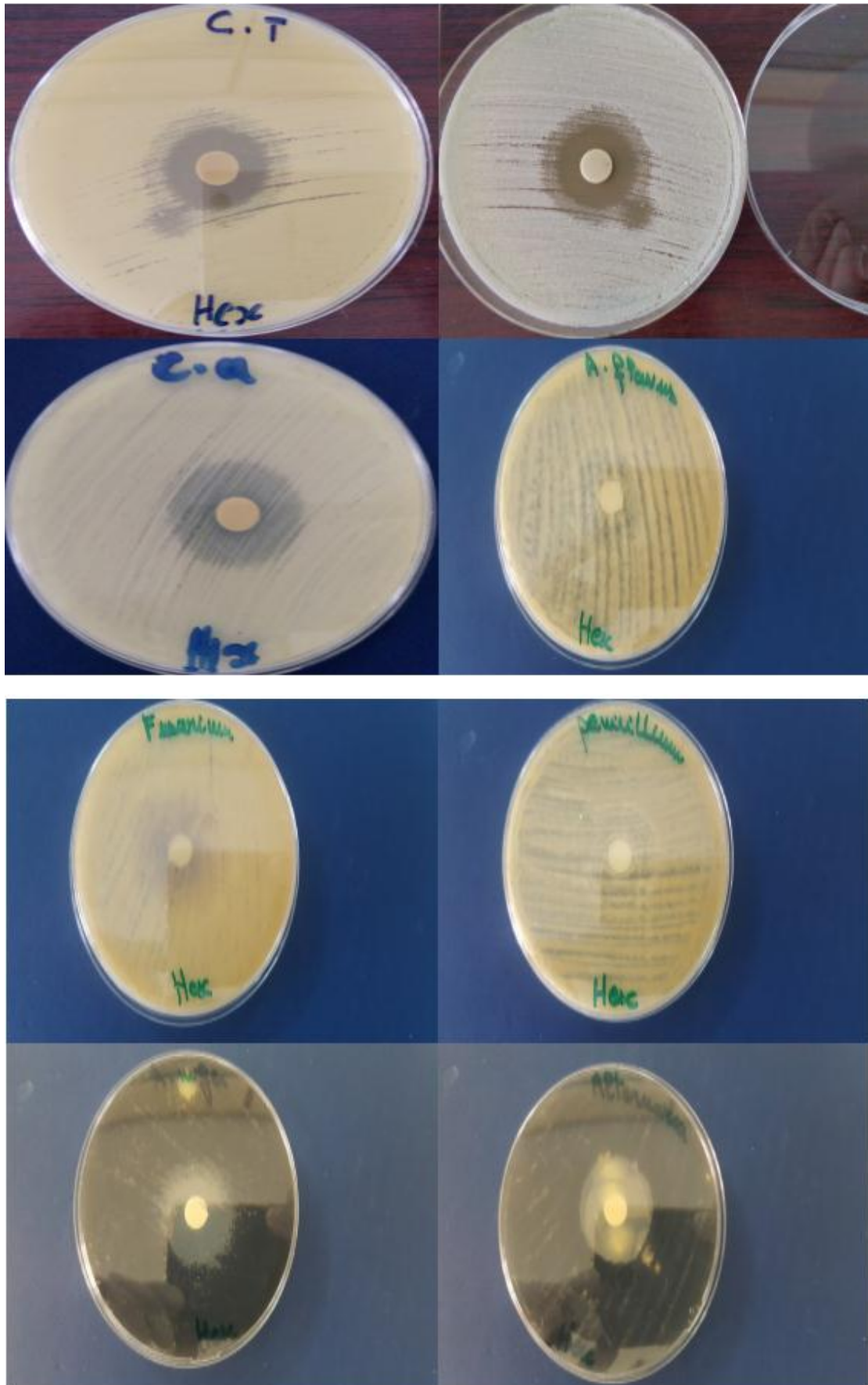
	<i>E.coli</i> ATCC : 25922	<i>Salmonella</i> <i>arizona</i>
antibiotiques	diamètre	
Ampicilline	22 S	06 R
Amoxicilline	/	/ R
Amoxicilline+ac.clavulanique	24 S	06 R
céfazoline	25 S	23 S
Céfalotine	/	/ S
Céfoxitine	26 S	/ S
Céfotaxime/Céftriaxone	34 S	31 S
Imipenem /méropenem	33 S	33 S
ertapenem	/	/ S
Amikacine	23 S	24 S
gentamicine	22 S	24 S
Acide nalidixique	28 S	06 R
ciprofloxacine	35 S	26 S
chlorapphénicol	21 S	24 S
Colistine	14 S	/ S
furrane	22 S	20 S
Fosfomycine (200)	30 S	30 S
cotrimoxazole	28 S	30 S

## Annexes

	<i>S.aureus</i> ATCC : 25923
antibiotique	diamètre
pénicilline	34 S
oxacilline	20 S
cefoxitine	30 S
gentamicine	22 S
kanamycine	21 S
Amikacine	23 S
erythromycine	26 S
Cindamycine#	24 S
Vancomycine*	/ S
teicoplanine	18 S
ofloxacine	28 S
Triméthoprine+sulfamithoxazole	28 S
Rifampicine 5	29 S
tetracycline	28 S
chloramphénicol	25 S
pristinamycine	26 S
Acide fusidique	34 S
Fosfomycine 50	S S



# Annexes



Résultats de l'hexamidine

## Annexes

### Résultats de l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis*

	Aromatogramme			Micro-atmosphère			Concentration minimale inhibitrice %
	1	2	3	1	2	3	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	18	21	23	/	/	/	<2%
<i>E. coli</i> coproculture	15	23	40	/	/	/	<2%
<i>S.arizona</i>	20	23	28	/	/	/	<2%
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12	24	30	/	/	/	1%
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/	/	/	
<i>P.fluorescens</i>	/	/	/	/	/	/	
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	21	23	T	/	T	T	2%
<i>Candida albicans</i>	12	30	45	/	/	/	2%
<i>Candida tropicalis</i>	/	35	60	/	/	65	2%
<i>Candida parapsilosis</i>	12	21	43	/	27	70	2%
<i>Aspergillus niger</i>	/	11	17	/	/	/	
<i>Aspergillus flavus</i>	/	12	13	/	/	/	
<i>Penicillium sp</i>	/	/	/	/	/	/	
<i>Alternaria</i>	/	/	/	/	/	/	
<i>Fusarium sp</i>	/	/	/	/	/	/	

### Résultats de l'activité antimicrobienne de *Cymbopogon citratus*

	aromatogramme			Micro-atmosphère			Concentration minimale inhibitrice %
	1	2	3	1	2	3	

## Annexes

<i>E. coli</i> ATCC 25922	35	70	T	5	21	45	0.5
<i>E. coli</i> (coproculture)	23	68	T	38	55	85	0.5
<i>S.arizona</i>	25	53.5	T	15	48	60	0.06
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	50	70	80	37	46	70	0.06
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	/	/	/	/	/	/	
<i>P. fluorescens</i>	/	/	/	/	/	/	
<i>Saccharomyces cerevisiea</i>	T	T	T	T	T	T	0.25%
<i>Candida albicans</i>	52	57.5	T	T	T	T	0.125%
<i>Candida tropicalis</i>	65.5	T	T	T	T	T	0.125%
<i>Candida parapsilosis</i>	32	47.5	70	T	T	T	0.25%
<i>Aspergillus niger</i>	T	T	T	T	T	T	
<i>Aspergillus flavus</i>	23	33	T	T	T	T	
<i>Penicillium sp</i>	T	T	T	T	T	T	
<i>Alternaria</i>	T	T	T	T	T	T	
<i>Fusarium sp</i>	T	T	T	T	T	T	

### Résultats de cinétique d'inhibition de *Saccharomyces cerevisiea*

	Huile essentielle seule					HE avec traitement thermique			
	400 µl	200 µl	100 µl	50 µl	T+	400 µl	200 µl	100 µl	50 µl
J 0	4	6	300	300	300	0	0	0	0
J 2	0	0	220	300	122	0	0	0	0
J 4	0	0	200	300	85	0	0	0	0
J 6	0	0	120	115	50	0	0	0	0
J 8	0	0	0	0	21	0	0	0	0

# Annexes

---

- Abe, S., Naho-Maruyama, C.A., Hayama, K., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H.** (2004). Suppression of neutrophil recruitment in mice by geranium essential oil. Taylor & Francis Ltd, Mediators of Inflammation, 13(1), 21-24.
- Abi ayad FZ. (2009).** Analyse de l'huile essentielle du thuya Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de Magister.
- Ahn, Y.J., Park, S.J., Choi, D.H., Cho, H.C., Hiremath, I.G.** (1998). growth-inhibitory responses of human intestinal bacteria to extracts from Indian and African plants Agricultural Chemistry and Biotechnology, 41, 104-109.
- Akinkunmia, E.O., Oladeleb, A., Esho, O., Odusegana, I.** (2016). Effects of storage time on the antimicrobial activities and composition of lemon grass. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3(3), 105-111.
- Alloun K.** (2013). Composition chimique et activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.) de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). Thèse de Magister
- Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P.** (2004). Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(11), 3530-3535.
- Apfelbaum M., Romon M., Dudus M.** (2004). Diététique et Nutrition. 6 édition Masson, Paris.
- Arena E et Campisi S.** (1980). Fatty acids of Italian blood orange juice. Journal of Agricultural Food Chemistry, 46(10), 4138-4143.
- Ayadi, S., Jerribi, C., Abderrabba, M.** (2011). Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie, 21(1), 25-33.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46 (2), 446-475.
- Bassanetti, I., Carcelli, M., Buschini, A., Montalbano, S., Rogolino, D.** (2017). Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. Food Control, 73, 606-612.
- Bassolé, I.H.N., Lamien-Medab, A., Bayalaa, B., Obamea, L.C., Ilboudoa, A.J., Franzb, C., Novakb, J., Nebiéc, R.C., Dickoa, M.H.** (2011). Chemical composition and

antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18 (12), 1070-1074.

**Ben Jemaa, M., Falleh, H., Neves, M.A., Isoda, H., Nakajima, M., Ksouri, R.** (2017). Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food Chemistry*, 217, 726-734.

**Bernard, T., Parinau, F., Brav, O., Delmas, M., Gaset, A.** (1988). extraction des huiles essentielles. *Chimie et technologie : information chimie*, 298, 179-184.

**Boumediene, N., Agha, O.** (2013). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'une espèce du genre *Rata* de Djebel Tessala (Algérie occidentale) et à la faisabilité d'un Plan de conservation. Thèse de magister.

**Bourrel, C., Dargent, R., Viirem G., Gaset, A.** (1995). Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogenèse hyphale. *Rivista Italiana*, 17, 31-42.

**Bourgeois C.M et leveau J.V.** (1991). Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires le contrôle microbiologique. édition TEC et DOC Lavoisier, Paris.

**Bourgeois C.M.** (1996). Microbiologie alimentaire T1 aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. TEC et DOC Lavoisier, Paris.

**Bourgeois C.M.** (2003). Les vitamines dans les industries alimentaires. Edition TEC et DOC Lavoisier, Paris.

**Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., Chefrour, A.** (2016). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie) *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85,174-189.

**Boutekdjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J. M.** (1998). The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis L.* in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 10, 680-682.

**Brisset L et Lécolier M D.** (1997). Hygiène et asepsie au cabinet dentaire. éditeur : Masson Elsevier.

**Burt, S. et Reinders, R.D.** (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 162-167.

**Burt, S.** (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.



- Carson, C. F., Cookson, B. D., Farrelly, H. D., Riley, T. V.** (1995). Brief reports Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35, 421-424.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V.**(2002). Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C.** (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100 (2), 553-559.
- Chahradhi, A.M., Ibrahim, D., Sulaiman, S.F.,** (2010). Antioxydant, antimicrobial activity and toxicity test of pileamicrophylla. *International journal of Microbiology*, article ID 826830.
- Chalchat, J.C., Garry, R.P., Benjilali, M.B., Chabart, J. L.** (1993). Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus oflicinalis* L.). The Chemical Composition of Oils of Various Origins (Morocco, Spain, France). *Journal of Essential oil Research*, 5,613-618.
- Chao, L. K., Hua, K. F., Hsu, H. Y., Cheng, S. S., Liu, J. Y., & Chang, S. T.** (2005). Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7274–7278.
- Chisowa, E.H., Hall, D.R., Farman, D.I.** (1998). Volatile Constituents of the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 29-30.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J.** (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213-220.
- Coelho, M., Rocha, C., Cunha, L.M., Cardoso, L., Alves, L., Lima, R.C., Pereira, M.J., Campos, F.M., Pintado, M.** (2016). Influence of harvesting factors on sensory attributes and phenolic and aroma compounds composition of *Cymbopogon citratus* leaves infusions. *Food Research International*, 89 (2), 1029-1037.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., and Wyllie, S.G.** (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.

<p><b>Dafereraa, D.J., Ziogasb, B.N., Polissiou, M.G.</b> (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Fusarium</i> sp. and <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>. <i>Crop Protection</i>, 22, 39-44.</p>
<p><b>Deans, S.G., Ritchie, G.</b> (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. <i>International Journal of Food Microbiology</i>, 5 (2), 165-180.</p>
<p><b>De Billerbeck, G.</b> (2000). Activité fongique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon nardus</i> sur l'<i>Aspergillus niger</i>. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Thèse de Doctorat.</p>
<p><b>De Billerbeck, V. G.</b> (2002). Essais d'utilisation d'huiles essentielles en traitement de l'air. <i>Les contaminants biologiques des biens culturels</i>, 2, 345</p>
<p><b>De Billerbeck, V. G.</b> (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. <i>Phytothérapie</i>, 5(5), 249-253.</p>
<p><b>Djenane, D., Yangüela, J., Amrouche, T., Boubrit, S., Boussad, N., &amp; Roncalés, P.</b> (2011). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of <i>Eucalyptus globulus</i>, <i>Myrtus communis</i> and <i>Satureja hortensis</i> against <i>Escherichia coli</i> O157: H7 and <i>Staphylococcus aureus</i> in minced beef. <i>Food Science and Technology International</i>, 17(6), 505-515.</p>
<p><b>Dorman, H.J.D., Deans, S.G.</b> (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. <i>Journal of Applied Microbiology</i>, 88, 308–316.</p>
<p><b>Dung, N.T., Kim, J.M., Kang, S.C.</b> (2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol of <i>Cleistocalyx operculatus</i>. <i>Merr and perry buds</i>. <i>Food and chemical toxicology</i>, 46, 3632-3639.</p>
<p><b>Eberhard, T., Robert A., Annelise, L.</b> (2005). <i>Plantes aromatique épices aromates condiments et huiles essentielles</i>. TEC et DOC. Paris</p>
<p><b>Elamrani, A., Zrha, S., Benjlali, B., Berrada, M.</b> (2000). A Study of Moroccan Rosemary Oils. <i>Journal of Essential oil research</i>, 12 (4), 487-495.</p>
<p><b>Elisabeth, V.</b> <i>aliments et boissons filières et produits</i>. (2008), Edition Doin.</p>
<p><b>El-Kamali, H. H., Ahmed, A. H., Mohammed, A. S., Yahia, A. A. M., El-Tayeb, I. H., Ali, A. A.</b> (1998). Antibacterial properties of essential oils from <i>Nigella sativa</i> seeds, <i>Cymbopogon citratus</i> leaves and <i>Pulicaria undulata</i> aerial parts. <i>Phytoterapia</i>, 69(1), 77-78.</p>

**Fadli, M., Pagès, J.M., Mezrioui, N.E., Abbad, A., Hassani, L. (2016).** *Artemisia herba-alba* Asso and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils and their capability to restore antibiotics efficacy. *Industrial Crops and Products*, 89 (30), 399–404.

**Faleiro, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venâncio, F., Tavares, R., Brito, J.C. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.

**Faleiro, M. L. (2011).** The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1143-1156.

**Farag, R.S, Daw, Z.Y, Hawedi, F.M, El-baroty, G.S.A. (1989).** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, 52 (9), 665-667.

**Farhat, A., Benmoussa, H., Bachoual, R., Nasfi, Z., Elfalleh, W., Romdhane, M., Bouajila, J. (2017).** Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 224-233.

**Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E, Mandrell, R.E. (2004).** Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6042-6048.

**Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102 898-904.

**Gassier. (2000).** biologie et nutrition alimentaire. Edition médicosociale, Masson, Paris.

**Gilles, M., Zhao, J., An, M., & Agboola, S. (2010).** Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.

**Granda, M., Sources, V., Gutierrez, C. (1986).** Etude fenologicos dans des plantes médicinales. *rev cub farm*, 20 (3), 243-251.

**Guedes, J.P.S., Medeiros J.A.C., Silva, R.S.S., Sousa J.M.B, Conceição, M.L., de-Souza E.L. (2016)** The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in

reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183-192.

**Gutiérrez, L., Batlle, R., Sánchez, C., and Nerín, C.** (2010) New Approach to Study the Mechanism of Antimicrobial Protection of an Active Packaging. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7 (9), 1063-1069.

**Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., Nielsen, J.B.** (2006). A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (5), 616-625.

**Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley T.V.** (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.

**Heinrich, M., kufer J., Leonti, M., Pardo-de-santayana.M.** (2006). Ethnobotany and athnopharmacology-interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 157-160.

**Holley, R.A., Patel, D.** (2005).Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials-Review *Food Microbiology*, 22 ( 4), 273-292.

**Inoye, S., Watanabe, M., Nishiyame, Y., Takeo, K., Akeo, M., Yamaguchi, H.** (1998). Antisporulating and respiration in inhibitory effect of essential oils on filamentous fungi. *Rev. Mycoses*. 5 (6), 403-410.

**Jeantet, R.** (2007). *Science des aliments : biochimie, microbiologie, procédés, produits.vol 2 technique des produits alimentaires*. Paris.

**Jeantet R, Brulé G, Grogennec T,** (2006) : *science des aliments ; biochimie microbiologie, procédés, production, stabilisation biologique, physico-chimique*. Edition TEC et DOC Lavoisier Paris.

**Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., Zu, Y.G., Liu, XL.** (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 3 2 (1), 63-68.

**Joarder, G. J., & Khatun, M.** (1982). Inhibitory effects of lemon grass oil on indigenous microflora. Part 1-Inhibition of *Aspergillus niger*. *Bangladesh Journal of Science and Industry Research*, 17, 219-226.

**Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A.** (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control*, 30 (2), 463-468.

**Kalemba, D., Kunicka, A.** (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.

**Kasali, A. A., Adebola, L., Oyedeji, O., Ashilokun, A.O.** (2001). Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 377-378.

**Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vigneschow, H.,** (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin, 429-445.

**Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A.A., Gouri,A., Hadeif, Y., Benakhla, A.** (2017). Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2), 245-249.

**LAIB, I.** (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Nature & Technologie*, 7,45-52.

**Lee, B.H., Annis, P.C., Tumaaliia, F., Choi, W.S.** (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40, 553-564.

**Lee, SO., Cho,i GJ., Jang, KS., Lim, HK., Cho, ky., kim, JC.** (2007). antifungal activity of five plant essential oils as fumigant agigent potharvest and soilborne plant pathologie fungi. *Journal Plant Pathology*, 23 (2), 97-102.

**Le Minor, L., Véron, M.** (1982). *Bactériologie médicale*. Flammarion médecine-sciences

**López, P., Sánchez, C., Battle, R., Nerín, C.** (2005). Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6939-6946.

**Lorient, J.** (1998). *Modification biochimique des constituants alimentaires, traité agroalimentaire*, Edition TEC et DOC Lavoisier Paris.

**Miladi, H., Ben Slama, R., Mili, D., Zouari, A., Bakhrouf, S., Ammar, E.** (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6), 729-739.

**Mishra, A. K., & Dubey, N. K.** (1994). Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1101-1105.

**Moll M., Moll N.** (1998). Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Edition Dunod, 2<sup>ème</sup> edition, Technique et Ingénierie, série Agro-alimentaire. Paris.

**Multon, J.M** 2002. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Edition TEC et DOC Lavoisier, Paris.

**Nagy, L.** 1980. Vitamine C content of citrus fruits and their productions 28 (1) 203.

**Nagy L et Shaw P.E** ,(1990) factors affecting the flavor of citrus fruit in morton I-D, macleod A-J edition food and flavors, part C the flavor of fruits.

**Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T., Trakoontivakorn G.,** 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37 (4), 249-252.

**Nikaido, H. (1996). Outer membrane. In: F. C. Neidhardt, (Ed.), Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology. Washington, 1, 29-47.**

**Ogunlana, E. O., Höglund, S., Onawunmi, G., Sköld, O.** (1987). Effects of lemongrass oil on the morphological characteristics and peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* cells. *Microbios*, 50(202), 43.

**Olmedo, R.H., Nepote, V., Grosso, N.R.** (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *Food Science and Technology*, 53(2), 409-417.

**Onawunmi, G.O., Yisak, W.A., Ogunlana, E.O.** (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of *cymbopugon citratus* (DC.) STAPF. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3), 279-286.

**Ouis, N.** (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de Coriandre de Fenouil et de Persil. Thèse de doctorat.

**Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., et Lacroix, M.** (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046-1055.

**Ozcan, M.M., Chalchat, J.C.** (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59(78), 691-698.

- Ozogul, F., Kacar, Ç., Hamed, I.** (2015). Inhibition effects of Carvacrol on biogenic amines formation by common food-borne pathogens in histidine decarboxylase broth. *Food Science and Technology*, 64 (1), 50-55.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R.** (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.
- Pibiri, M. C.** (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat.
- Pibiri, M. C., Goel, A., Vahekeni, N., & Roulet, C. A.** (2006). Indoor air purification and ventilation systems sanitation with essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 16(3), 149-153.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J.** (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 15-19.
- Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C., Roura, S.I.** (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 36, 679-684.
- Porte, A., Godoy, R.L.O., Lopes, D., Koketsu, M., Gonçalves, S.L., Torquillo, H.S.** (2000). Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Essential oil Research* 12, 577-580.
- Pousset, J.L.** (2004). Plantes médicinales d'Afrique. Comment les utiliser secum edition sud.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A.** (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 236-241.
- Rasooli I. and Owlia P.** (2005). Chemoprevention by thyme oils *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Rev. Phytochemistry*, 32 (9): 22-66.
- Reichling J, Weseler A, Landvatter U, Saller R.** (2002). Bioactive essential oils used in phytomedicine as anti-infective agents: Australian tea tree oil and manuka oil. *Pythotherapy*. 1, 26-32.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Sanches-Silva, A.** (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging Review article. *Current Opinion in Food Science*, 14, 78-84.

**Rocio-Teruel, M., Dolores-Garrido, M., Espinosa, M.C., Linares M.B.** (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*, 172 40–46.

**Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R.** (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91 (4), 621-632.

**Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R., López- Gómez, A., Marín-Iniesta, F.** (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *Food Science and Technology*, 73, 140-146.

**Santin, M.R., dos Santos, A.O., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., Ferreira, I.C.P., Nakamura, T.U.** (2009). In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*, *Parasitology Research*, 105, 1489-1496.

**Satrija, F., Nansen, P., Murtini, S., He, S.** (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 48, 161-164.

**Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., & Talbi, M.** (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 146, 85-89.

**Sidibe, L., Chalchat, J.C., Garry, R.P., Lacombe, L., Harama, M.** (2001). Aromatic Plants of Mali (IV): Chemical Composition of Essential Oils of *Cymbopogon citrafus* (DC) Stapf and *C. giganfeus* (Hochst.) Chiov. *Journal of Essential Oil Research*, 13(2), 110-112.

**Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B.**, 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269 (11), 8022-8028.

**Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S.** (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1202-1205.

**Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E.** (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.



- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L.** (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26, 118-122.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L.** (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4), 463-470.
- Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M., & Johnson, E. A.** (1998). Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28, 71-72.
- Syed, M., Khalid, M. R., & Chaudhary, F. M.** (1990). Essential oils of Gramineae family having antibacterial activity. Part 1. (*Cymbopogon citratus*, *C. martinii* and *C. jawarancusa* oils). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 33.
- Tchoumboungang, F., Dongmo, P.M.J., Sameza, M.L., Mbanjo, E.G.N., Fotso, G.B. T., Zollo, P.A., & Menut, C.** (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement*, 13(1), 77-84
- Teruel, M.R., Garrido, M.D., Espinosa, M.C., Linares, M.B.** (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*, 172, 40-46.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M.** (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3), 333–340.
- Thoroski, J., Blank, G., Biliaderis, C.** (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52 (6), 399-403.
- Tyagi, A.K., Malik, A.** (2010). Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 205-210.
- Tyagi, A.K., Malik, A.** (2012). Bactericidal action of lemon grass oil vapors and negative air ions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 13, 169-177.
- Tyagi, A.K., Gottardi, D., Malik A., Guerzoni, M.E.** (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food Chemistry*, 137(1–4)108–114.
- Tyagi, A.K., Gottardi, D., Malik, A., Guerzoni, M.E.** (2014). Chemical composition, in vitro anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (2), 731-737.

**Ultee, A.**, 2000. Bactericidal action of Carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology, 64, 373-378.

**Van damme, P.** (2001). citronnelle. *Cymbopogon citratus* spp agriculture en Afrique tropical. Mémoire de master.

**Vilela, G.R., de Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., da Silva, M.F., das G.F., Silva, S.C., Piedade, S.M.S., Domingues, M.A.C., E.M.da Gloria.** (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineol, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. Journal of Stored Products Research, 45(2),108-111.

**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 negative bacteria. Journal of Applied Microbiology, 94, 240-247.

**Wang, H.F., Yih, K.H., 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, 18(1), 24-33.

**Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H. M.** (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(1), 76-81.

**Wilkinson, J.M., Cavanagh, H.M. A.** (2005). Antibacterial Activity of Essential Oils from Australian Native Plants. Phytotherapy Research, 19, 643-646.

**Zaika, L.L.** (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety, 9(2), 97-118.

**Zahalka J.P.** (2014). Dictionnaire complet d'aromathérapie 250 huiles essentielles 32 hydrolats 34 huiles végétales. Edition Dauphin. Paris.

**Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M.** (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology, 48(11), 3144-3152.