

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université De Saad Dahleb Blida-1-**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie**

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de**  
**MASTER**

**Filière : Science de la nature et de la vie**

**Option : Microbiologie**

**Thème**

**Etude comparative du profil de résistance des**  
**bactéries pathogènes d'origine alimentaire vis-à-vis**  
**les huiles essentielles**

Réalisé par : **M<sup>lle</sup> BOUYACOUB Lina**

Soutenue le : **06 / 07 /2021**

**Devant le Jury composé de :**

<b>Mr ALLOUI A.</b>	<b>M. A. B</b>	<b>Univ. de Blida 1</b>	<b>Président</b>
<b>Mme BOKRETA S.</b>	<b>M. A. A</b>	<b>Univ. de Blida 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme BOUDJEMA N.</b>	<b>M. C. A</b>	<b>Univ. de Blida 1</b>	<b>Promotrice</b>

**Promotion : 2020 - 2021**

## *Remerciements*

*Je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme BOUDJEMA N., maître de conférence classe A et chef de département de biologie, je lui suis reconnaissante pour la confiance et le soutien qu'elle m'a témoignée ainsi que pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant ma préparation de ce mémoire, elle est une source d'énergie positive.*

*Je ne manquerai pas non plus de dire un grand merci aux membres du jury ; Mr ALLOUI A., maître assistant de classe B et Mme BOKRETA S., maître assistante de classe A, qui ont eu l'amabilité de discuter avec nous certains points clés de notre analyse, et de nous donner ses remarques pertinentes.*

*Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à Mr TEFACHI Dj., Ingénieur au niveau du laboratoire d'hygiène et de référence de la wilaya de Blida pour son aide pratique, sa sympathie, sa disponibilité, son soutien moral, son dynamisme, ses encouragements et sa rigueur scientifique.*

*Mon remerciement s'adresse vivement à Mme LATRECHÉ A. pour ces conseils et son bon exemple, ainsi qu'à tout le personnel de laboratoire.*

*Un grand merci pour Mr HAYANI A. ingénieur au niveau de la distillerie Bio-Source, ainsi que Mme Asma, Fatima et Soraya pour leurs aides et ces précieux conseils.*

*Je tiens aussi à exprimer mes sincères remerciements et mes profondes gratitude à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près pour la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*A mes très chères parents papa et mama*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier  
comme il se doit, votre bienveillance me guide et votre présence à mes  
côtés a toujours été ma source de force pour affronter les obstacles.*

*A mes précieuses sœurs*

*Amina, Ibtissem, Imen et Yasmine*

*A mes beaux frères*

*Riad et Mohamed Chérif*

*Pour leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de  
mes études.*

*A mes neveux*

*Samir, Malik, Wassim et Manil*

*Source d'espoir et de motivation*

*C'est grâce à eux que je suis arrivée.*

*A tous mes amis (es) sans exception et sur tous à Hana, Nawal,  
Lila, Rania, Sarah, Sanaa, Dounia, Abderrahim et Abdeallah.*

La présente étude comporte à évaluer le profil de résistance « *in vitro* » de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* et *Coriandrum sativum*, sur des germes pathogènes responsable d'altération alimentaire.

L'analyse bactériologique des denrées alimentaires (viande et dérivés, lait et produits laitiers, eaux, boissons de fruit et de légumes, pâtisseries et ovo-produits et autres) sur 130 échantillons, nous a amené à isoler et identifier des germes pathogènes les plus incriminées dans les altérations alimentaires, à savoir : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et *Penicillium*, avec une absence totale de *Claustridium perfringens*.

L'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne du thym et menthe poivrée a été effectuée par le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau, les rendements conquis sont de 1,3% et 1,4% respectivement.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*) et sur deux souches fongiques (*Aspergillus niger* et *Candida albicans*) selon deux méthodes complémentaires qualitative et quantitative. Les résultats d'aromatogramme ont montré que les huiles essentielles testées du thym, menthe poivrée et coriandre aient une forte activité antimicrobienne avec des zones d'inhibitions comprises entre [19-68mm], [14-70mm] et [12-67mm], [34 – 56 mm], [00à 55mm] et [00-59mm] respectivement.

L'application des huiles essentielles sur la viande hachée bovine et le fromage frais a permis de conserver ces denrées pendant une durée moyenne de sept jours sans prolifération microbienne et sans altération visible sur le fromage frais et de quatre jour sans prolifération mais avec un faible changement de caractéristiques sensorielle.

**Mots clés :** altération alimentaire, germes pathogènes, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Coriandrum sativum*, pouvoir antimicrobien, conservation.

The present study involves evaluating the "*in vitro*" resistance profile of the antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* and *Coriandrum sativum*, on pathogens responsible for food spoilage.

Bacteriological analysis of foodstuffs (meat and derivatives, milk and dairy products, water, fruit and vegetable drinks, pastries and egg products and others) on 130 samples, led us to isolate and identify the most pathogenic germs incriminated in food alterations, namely: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* and *Penicillium*, with a total absence of *Clastridium perfringens*.

The extraction of essential oils from the aerial part of thyme and peppermint was carried out by the steam entrainment process, the yields achieved are 1.3% and 1.4% respectively.

The antimicrobial activity was determined on three bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*) and on two fungal strains (*Aspergillus niger* and *Candida albicans*) according to two complementary qualitative and quantitative methods. The aromatogram results showed that the essential oils tested from thyme, peppermint and coriander had strong antimicrobial activity with zones of inhibitions between [19-68mm], [14-70mm] and [12-67mm], [34 - 56 mm], [00 to 55mm] and [00-59mm] respectively.

The application of essential oils on minced beef and fresh cheese made it possible to keep these latter for an average period of seven days without microbial proliferation and without visible deterioration on the fresh cheese and four days without proliferation but with little change of sensory characteristics.

**Key words:** food spoilage, pathogens, *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*, *Coriandrum sativum*, antimicrobial power, preservation

تتضمن الدراسة الحالية تقييم خصائص المقاومة "في المختبر" للنشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية من *Thymus vulgaris* و *Mentha piperita* و *Coriandrum sativum* ، على الجراثيم المسببة للأمراض المسؤولة عن تلف الطعام.

أدى التحليل البكتريولوجي للمواد الغذائية (اللحوم ومشتقاتها ، الحليب ومنتجات الألبان ، الماء ، مشروبات الفاكهة والخضروات ، المعجنات ومنتجات البيض وغيرها) على 130 عينة إلى عزل وتحديد أكثر الجراثيم المسببة للأمراض والمتضررة من التغيرات الغذائية ، وهي: *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* ، *Salmonella* ، *Candida albicans* ، *Aspergillus niger* و *Penicillium* ، مع غياب تام لـ *Clastridium perfringens*.

تم استخلاص الزيوت العطرية من الجزء الجوي للزعر والنعناع بواسطة عملية السحب البخار ، وبلغت الغلة 1.3% و 1.4% على التوالي.

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على ثلاث سلالات بكتيرية (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*) و على سلالتين من الفطريات (*Aspergillus niger* و *Candida albicans*) وفقاً لطريقتين تكمليتين نوعيتين وكميتين. أظهرت نتائج التصوير العطري أن الزيوت الأساسية المختبرة من الزعر والنعناع والكزبرة لها نشاط قوي مضاد للميكروبات مع مناطق مثبّطات بين [19-68 مم] ، [14-70 مم] و [12-67 مم] ، [34-56 مم] ، [00 إلى 55 مم] و [00-59 مم] على التوالي.

أتاح تطبيق الزيوت العطرية على اللحم البقري المفروم والجبن الطازج الاحتفاظ بهذه الأخيرة لمدة سبعة أيام في المتوسط دون تكاثر جرثومي ودون تلف واضح على الجبن الطازج وأربعة أيام دون تكاثر ولكن مع تغيير طفيف في الخصائص الحسية.

**الكلمات الدالة:** فساد الطعام، مسببات الأمراض، *Thymus vulgaris* ، *Mentha piperita* ، *Coriandrum sativum* ، القوة المضادة للميكروبات ، الحفظ.

# Table des matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

## Chapitre I. Synthèse Bibliographique.

### Partie I : Les Toxi-nfections alimentaires

1 Généralités..... 3

1.1 Types d'altérations alimentaires ..... 3

1.1.1 Altérations physiques ..... 3

1.1.2 Altérations chimiques..... 3

1.1.3 Altérations enzymatiques ..... 3

1.1.4 Altération microbiologique ..... 3

1.2 Facteurs favorisant les altérations alimentaires ..... 4

1.3 Maladie d'origine alimentaire ..... 5

1.3.1 Intoxication alimentaire..... 5

1.3.2	Toxi-infection alimentaire .....	5
1.4	Répartition géographique des toxi-infections alimentaire .....	6
1.4.1	Dans le monde.....	6
1.4.2	En Algérie.....	6
1.5	Germes pathogènes responsables des altérations alimentaires .....	8
2	Mode de conservation .....	12
2.1	Conservation par des techniques classiques .....	12
2.2	Conservation par les plantes médicinales et aromatiques .....	14
 <b>Partie II : Les huiles essentielles</b>		
1	Généralités.....	15
1.1	Thym ( <i>Thymus vulgaris L.</i> ) .....	15
1.1.1	Description .....	15
1.1.2	Classification .....	15
1.1.3	Propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle du Thym vulgaire.....	16
1.2	Menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	16
1.2.1	Description .....	16
1.2.2	Classification .....	17
1.2.3	Propriétés théarpeutiques de l'huile essentielle de la menthe poivrée .....	17

1.3	Coriandre ( <i>Coriandrum sativum L.</i> ) .....	18
1.3.1	Description .....	18
1.3.2	Classification .....	18
1.3.3	Propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle de la coriandre.....	19
2	Domaine d'utilisation des trois huiles essentielles.....	19
<b>Chapitre II. Matériel et Méthodes</b>		
I.	Objectifs et démarche expérimentale.....	22
II.	Lieu d'expérimentation.....	22
III.	Matériel d'expérimentation.....	22
IV.	Méthodes expérimentales .....	23
IV 1.	Isolement et identification des germes pathogènes alimentaires .....	23
IV.1.1	Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide.....	25
IV.1.2	Recherche et dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> .....	26
IV.1.3	Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
IV.1.4	Recherche de spores d'Anaérobies sulfite-réducteurs .....	29
IV.1.5	Recherche de Salmonella.....	31
IV.1.6	Recherche et dénombrement de levures et moisissures.....	32
IV 2.	Identification des germes isolés.....	33

IV.2.1 Identification des bactéries .....	34
IV.2.2. Identification des levures et moisissures.....	40
IV. 2. Extraction des huiles essentielles.....	41
IV. 3. Application des huiles essentielles sur les germes isolées.....	43
IV. 3.1 Etude de l'aromatogramme .....	45
IV. 3.2 Contact direct par dilution sur milieu solide .....	47
IV. 4. Application des huiles essentielles sur les denrées alimentaires.....	49
IV. 5. Analyses statistique .....	51

### **Chapitre III. Résultats et Discussion.**

1. Résultats .....	52
1. 1. Fréquence des échantillons analysés .....	52
1. 2. Profil bactériologique des germes isolés .....	53
1. 3. Répartition des germes isolés .....	53
1. 4. Identification des germes isolés .....	54
1. 4. 1. Identification morphologique .....	54
1. 4. 2 identifications biochimiques .....	58
1. 5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	58
1. 5. 1. Rendement des huiles essentielles .....	58

1. 5. 2. Méthode qualitative .....	59
1. 5. 3. Méthode quantitative .....	61
1. 6. Application des huiles essentielles dans des denrées alimentaires.....	62
1. 6. 1. Cas de viande hachée bovine .....	62
1. 6. 2. Cas de fromage frais .....	64
2. Discussion .....	65
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>75</b>

**Références Bibliographiques.**

**Annexes.**

## ISTES DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Facteurs intrinsèques et extrinsèques en relation avec le produit alimentaire .....	4
<b>Figure 02</b> : Partie aérienne de <i>Thymus vulgaris</i> .....	15
<b>Figure 03</b> : Partie aérienne de <i>Mentha piperita</i> .....	17
<b>Figure 04</b> : Fruit de <i>Coriandrum sativum</i> .....	18
<b>Figure 05</b> : Préparation des dilutions décimales en cas de produit liquide.....	24
<b>Figure 06</b> : Préparation des dilutions décimales en cas de produit solide .....	25
<b>Figure 07</b> : Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide .....	26
<b>Figure 08</b> : Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> au milieu Giolliti Cantonii .....	29
<b>Figure 09</b> : Recherche de spores sulfito-réducteurs et de <i>Clostridium perfringens</i> .....	31
<b>Figure 10</b> : Recherche et dénombrement des levures et moisissures.....	33
<b>Figure 11</b> : Procédé de distillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	42
<b>Figure 12</b> : Principe de la méthode d'aromatogramme .....	47
<b>Figure 13</b> : Fréquence des échantillons analysés.....	52
<b>Figure 14</b> : Observation macroscopique et microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
<b>Figure 15</b> : Observation macroscopique et microscopique de <i>Escherichia coli</i> .....	56
<b>Figure 16</b> : Observation macroscopique et microscopique de <i>Salmonella</i> .....	56
<b>Figure 17</b> : Observation macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> .....	57
<b>Figure 18</b> : Observation macroscopique et microscopique de <i>Penicillium</i> .....	57
<b>Figure 19</b> : Observation macroscopique et microscopique de <i>Candida albicans</i> .....	57

**Figure 20 :** Effet des trois huiles essentielles sur l'évolution du pH des viandes bovines hachées durant leurs conservations à 4°C pendant 7 jours .....63

**Figure 21 :** Effet des trois huiles essentielles sur l'évolution du pH de fromage frais durant leurs conservations à 4°C pendant 7 jours .....64

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Fréquence de Toxi-infection alimentaire collective dans le monde .....	6
<b>Tableau II</b> : Taux d'incidence des TIAC dans différentes Wilaya d'Algérie en 2017.....	7
<b>Tableau III</b> : Taux des TIAC dans différentes communes les plus touchées de la Wilaya de Blida en 2016.....	7
<b>Tableau IV</b> : les différents moyens classique de conservation des denrées alimentaire .....	13
<b>Tableau V</b> : Conservation des denrées alimentaires par les huiles essentielles .....	14
<b>Tableau VI</b> : Principaux domaines d'utilisation des huiles essentielles de Thym, Menthe poivrée et Coriandre .....	20
<b>Tableau VII</b> : Classement des germes selon leur DZI .....	47
<b>Tableau VIII</b> : Résultats globaux des échantillons analysés selon la qualité.....	52
<b>Tableau IX</b> : Répartition des germes isolés selon la denrée alimentaire analysée.....	53
<b>Tableau X</b> : Caractères morphologiques des germes isolés .....	54
<b>Tableau XI</b> : Résultat de la galerie biochimique classique .....	58
<b>Tableau XII</b> : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles obtenues .....	59
<b>Tableau XIII</b> : Diamètres des zones d'inhibition (DZI) des six souches étudiée vis-à-vis les trois huiles essentielles .....	60
<b>Tableau XIV</b> : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des cinq souches étudiées vis-à-vis les trois huiles essentielles.....	61
<b>Tableau XV</b> : Résultats d'analyse microbiologique des viandes hachées.....	64
<b>Tableau XV</b> : Résultats d'analyse microbiologique de fromage frais.....	65

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe I** : Doses minimum infectantes des principaux agents pathogènes de TIAC.

**Annexe II** : Bactéries incriminées dans les TIAC dans les pays du Maghreb et en France.

**Annexe III** : Bilan des toxi-infections alimentaires collectives en France en 2019.

**Annexe IV**: Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris L.*

**Annexe V**: Composition chimique de l'huile essentielle du *Mentha x piperita.*

**Annexe VI** : Effets bénéfiques des huiles essentielles de la coriandre, menthe poivrée et du Thym pour l'homme et sur le produit.

**Annexe VII** : Évolution du nombre de foyers par agent causal et personnes concernées en Belgique (2006-2019).

**Annexe VIII** : Arrêté N°179 /MS/CAB du 17 Novembre 1990.

**Annexe IX** : Matériel et Appareillage du laboratoire.

**Annexe X**: Matériel non biologique.

**Annexe XI** : Matériel biologique.

**Annexe XII** : Préparation des milieux de cultures.

**Annexe XIII** : Préparation des témoins.

**Annexe XIV** : Identification des Cocci à Gram (+).

**Annexe XV**: Table de lecture de la galerie miniaturisée.

**Annexe XVI** : Identification des bacilles à Gram (-).

**Annexe XVII** : Résultats d'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

**Annexe XVIII** : Résultats d'activité qualitative des huiles essentielles.

**Annexe XIX** : Contrôle microbiologique des denrées alimentaires après conservation.

**Annexe XX** : Résultats des tests d'application des huiles essentielles sur les denrées alimentaires.

## LISTE DES ABREVEATIONS

<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ESCOP :</b>	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
<b>MDO :</b>	Maladie à Déclaration Obligatoire
<b>JORA :</b>	Journal Officiel de la République Algérienne
<b>ASR :</b>	Spore Aérobie Sulfito-Réductrice
<b>CMI :</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMF :</b>	Concentration Minimale Fongicide
<b>HEC :</b>	Huile Essentielle de Coriandre
<b>HET :</b>	Huile Essentielle du Thym
<b>HEM :</b>	Huile Essentielle de Menthe poivrée
<b>AFNOR :</b>	Association Française de Normalisation
<b>g :</b>	Gramme
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>ml :</b>	Millilitre
<b>MH :</b>	Muller-Hinton
<b>SAB :</b>	Sabouraud
<b>DMSO :</b>	Diméthyle sulfoxyde
<b>UFC :</b>	Unité Forment de Colonie
<b>BHIB :</b>	Brain Heart Infusion Broth
<b>GN :</b>	Gélose nutritive
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection
<b>HE</b>	Huile Essentielle
<b>TIA :</b>	Toxi-infection alimentaire



**INTRODUCTION**

Les toxi-infections alimentaires collectives représentent un problème majeur de santé publique au niveau national et international. Ce sont des affections d'origine alimentaire provoquant des infections gastro-intestinales dues aux bactéries, champignons, virus et parasites présents dans les aliments (**Harbaj, 2019**).

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 600 millions de personnes, soit près de 1 sur 10 dans le monde, tombent malades chaque année après avoir consommés des aliments contaminés, que 420.000 en meurent et qu'il en résulte la perte de 33 millions d'année de vie en bonne santé. Les enfants de moins de 5ans supportent 40% de la charge de morbidité imputable aux maladies d'origine alimentaire et 125.000 en meurent chaque année (**OMS, 2018**).

En Algérie, la toxi-infection alimentaire est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire (MDO) (Arrêt ministériel du 17 novembre 1990) et fait l'objet de disposer de données sur cette maladie afin de mieux suivre son incidence et de minimiser ses dégâts (**Ziane, 2015**).

En revanche, la conservation des aliments est un combat constant contre les micro-organismes d'altération ou les pathogènes de l'homme. Depuis longtemps le coût des produits, leur qualité, mais surtout la sécurité sanitaire des aliments ont été les principaux centres d'intérêt des industriels. A l'heure actuelle, la chaîne alimentaire est devenue plus complexe, multipliant les possibilités de contamination et de développement des agents pathogènes (**Codex Alimentarius, 2003**). Cependant, les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des denrées alimentaires et limiter la prolifération microbienne (**Laghchimi et al., 2014 ; Chebaibi et al., 2016**). Ces substances naturelles hautement concentrées en principes actifs (**Lebon, 2020**) sont considérées comme alternatives importante pour résoudre le problème d'altération alimentaire (**Koné, 2018**).

Les plantes aromatiques, médicinales et les épices sont d'une grande importance depuis l'antiquité, surtout avec les vertus thérapeutiques et ces activités biologiques que présentent, et mit à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ces dernières continuent à faire l'objet de plusieurs recherches scientifiques à travers le monde.

Nous avons orienté notre travail dans ce contexte pour objectif d'évaluer « *in vitro* » l'effet bactériostatique des huiles essentielles du *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* et *Coriandrum sativum* vis-à-vis des germes d'altération alimentaire ; qui est réparti en trois principales chapitres :

Le premier chapitre est réservé à une étude bibliographique subdivisée en deux parties.

Le deuxième est relative à l'étude expérimentale et est y comporte quatre axes principales :

- Le premier axe de recherche s'est intéressé à l'isolement et l'identification des germes pathogènes d'origine alimentaire.
- Le second s'est orienté sur l'extraction des huiles essentielles par procédé d'entraînement à la vapeur.
- Le troisième axe consiste à démontrer l'activité antimicrobienne selon deux méthodes complémentaires qualitative et quantitative.
- Le quatrième axe porte sur l'application de ces huiles essentielles sur deux types de produits alimentaires tout en suivant leurs caractéristiques organoleptiques et physicochimiques ; ainsi que leurs contrôles microbiologiques afin de les conservés. Ce chapitre présentera aussi une description des méthodes d'analyses et des outils statistiques utilisés pour l'évaluation de cette étude comparative.

Le troisième chapitre consiste à une analyse des résultats obtenus et leur discussion. Enfin, ce contexte se clôtura par une conclusion et des perspectives.



# **CHAPITRE I**

## **Synthèse bibliographique**



## **PARTIE I**

### **Les intoxications alimentaires**

## 1. Généralités

Les maladies d'origine alimentaire sont parmi les plus répandues dans le monde dont certaines peuvent provoquer des troubles cliniques très graves et peuvent même entraîner la mort des patients. Ces pathologies d'origine alimentaire sont produites suite à une altération des denrées alimentaires, traduit par une modification des caractéristiques organoleptiques et de la qualité sanitaire du produit (**Dubois-Brissonnet, 2020**).

### 1.1 Types d'altérations alimentaires

La contamination des denrées alimentaires peut-être à l'origine d'une altération du produit qui due à l'action des bactéries et d'autres facteurs. Il existe en effet quatre principales altérations, en outre :

#### 1.1.1 Altérations physiques

Chocs, blessures, modification d'état, variation de la teneur en eau et changement de la couleur. Une modification de la circonstance du produit (**Benner, 2014**).

#### 1.1.2 Altérations chimiques

Elles sont provoquées suite à des réactions chimiques de dégradation. Par exemple : le brunissement non enzymatique, la dénaturation des protéines et des acides nucléiques, les modifications non enzymatiques de l'amidon responsables du rassissement et les oxydations directes par l'oxygène de l'air responsables du rancissement des produits secs à forte teneur lipidique (**Clemens, 2018**).

#### 1.1.3 Altérations enzymatiques

Elles sont provoquées par les enzymes du produit lui-même ou les enzymes exogènes introduites par les micro-organismes (hydrolases agissant sur les lipides, glucides et protéines, oxydases) (**Howell, 2016 ; Clemens, 2018**).

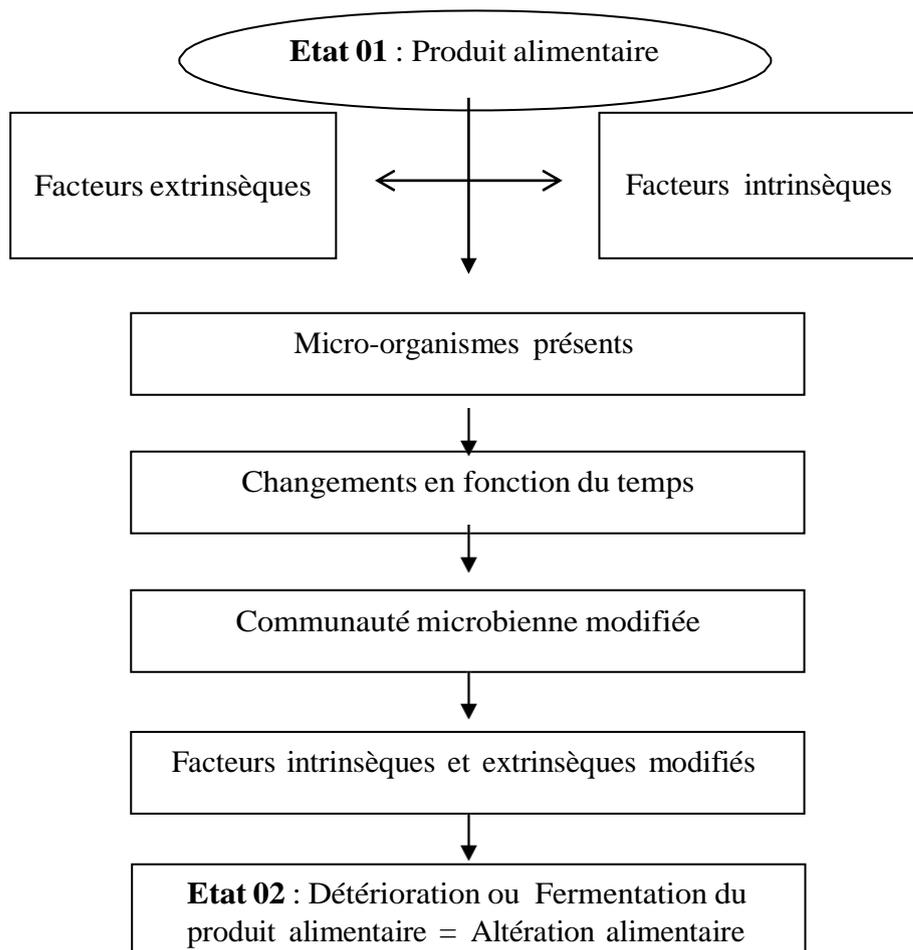
#### 1.1.4 Altération microbiologique

Les altérations microbiologiques sont dues aux activités métaboliques des micro-organismes (**Benner, 2014 ; Howell, 2016**). Par exemple, les denrées comme le fromage et la

viande forment avec les micro-organismes une structure dont les activités entraînent une fermentation, putréfaction ou susceptibles de présenter une toxicité (Clemens, 2018).

## 1.2 Facteurs favorisant les altérations alimentaires

Selon les travaux cités par Dosso *et al.* (1998) ; FAO (2007) ; Chiguer (2014) ; Borges (2014) et Tanouti (2016), les micro-organismes présents dans les aliments sont responsables d'un grand nombre de toxi-infections alimentaires. Ces incidents sont dus en général au plusieurs facteurs classés selon leurs caractéristiques intrinsèques (potentiel d'oxydoréduction, pH, activité de l'eau, structure physique d'aliment et les facteurs antimicrobiens naturels) et extrinsèques (Température et humidité, présence de Gaz et la qualité microbiologique des denrées alimentaires). Les premiers sont relatifs à l'aliment et les seconds proviennent de l'environnement. Le schéma ci-dessous les résume (Figure 01):



**Figure 01** : Facteurs intrinsèques et extrinsèques en relation avec le produit alimentaire (Prescott *et al.*, 2010 ; Boudjema, 2015).

### 1.3 Maladie d'origine alimentaire

Les maladies ou les infections d'origine alimentaire sont provoquées par l'ingestion d'un aliment contaminé par des microorganismes pathogènes vivants pendant la consommation (Ray et Bhunia, 2013 ; Ziane, 2015). Des cas peuvent se produire de manière sporadique ou, s'ils sont liés à une source commune, sous forme d'épidémies (Waltner-Toews et al., 2020).

#### 1.3.1 Intoxication alimentaire

L'intoxication alimentaire, intoxication et/ou toxinogénèse ; causée par la consommation d'aliments contenant des toxines produits par des micro-organismes pathogènes bien que non infectieux (Bourigault et Lepelletier, 2013 ; Erkmen et Bozoglu, 2016 ; Dubois-Brissonnet et Guillier, 2020). Par exemple :

- Entérotoxine staphylococcique produite par *Staphylococcus aureus*.
- Toxine botulique (Neurotoxine) produite par *Clostridium botulinum* provoquant une paralysie flasque (Rossetto, 2013).
- Céréulide (Entérotoxine émitique) produite par *Bacillus cereus* (Andersson, 2007).

#### 1.3.2 Toxi-infection alimentaire

Les toxi-infections alimentaires (TIA) découlent de la consommation d'aliments ou de produits associés contaminés par des agents pathogènes, soit des bactéries (y compris leurs toxines), des virus, des champignons ou des parasites à symptomatologie digestive (Dubois-Brissonnet et Guillier, 2020 ; Waltner-Toews et al., 2020). Parmi les bactéries incriminées en (TIA) sont :

- *Listeria monocytogenes* provoquant la listériose.
- *E. coli entérohémorragique (EHEC)* qui produit des Shiga-toxines en provoquant le syndrome hémolytique et urémique.
- La Salmonellose provoquée par *Salmonella spp.*, suite à l'exposition à de la dinde crue en octobre 2018 au Canada (Agence de la santé publique au Canada, 2020).

## 1.4 Répartition géographique

### 1.4.1 Dans le monde

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les infections gastro-intestinales dues aux bactéries, virus et parasites présents dans les aliments qui font plus de 420.0000 morts par an dans le monde (OMS, 2018) (Tableau I).

Les Toxi-infections alimentaires collectives sont très fréquentes, y compris dans les pays à haut niveau de vie économique. Cependant, les 04 bactéries les plus souvent en cause sont : *Salmonella spp. (enteritidis ou typhimurium)*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens* (Birembaux, 2017).

**Tableau I** : Fréquence de Toxi-infection alimentaire collective dans le monde

Pays	Taux	Foyers	Malades	Hospitalisation	Décès	Agent le plus incriminé	Références
	Années						
France	2017	1208	14269	448	7	<i>S. aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Salmonella</i>	(Fouillet, 2021)
	2019	1783	15641	609	12		
Belgique	2017	304	1409	16	/	<i>Salmonella</i>	(Denayer et al., 2020)
	2018	397	2216	25	/		
	2019	571	2457	28	/		
Maroc	2016	1453	/	306	5	/	(Houar, 2017)
	2017	1631	/	509	8		

### 1.4.2 En Algérie

En Algérie, durant la période (2010-2019), des fortes variations de taux de (TIAC) ont été enregistrés d'une année à une autre selon les études épidémiologiques faites, dont le taux d'incidence a nettement augmenté, passant de 14,92 à 23,03 cas pour 100.000 habitants avec un taux d'âge spécifique entre 20 et 29ans de 39,19 cas (INSP, 2017).

Selon Dekkar (2016) représentant d'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et INSP (2017), le tableau suivant représente le taux des Toxi-infections alimentaires collectives enregistré dans différentes Wilaya d'Algérie (Tableau II et III) :

**Tableau II** : Taux d'incidence des TIAC dans différentes Wilaya d'Algérie en 2017.

Wilaya	Commune touchée	Taux d'incidence (cas/100.000habitants)	Pic épidémique (cas/100.000habitants)
<b>Illizi</b>	Ain Amenas (62,3%)	128,84	80,22
<b>Béchar</b>	Béchar (41%) et Béni Abbes (59%)	73,43	43,40
<b>Mascara</b>	Mascara (77,6)	65,95	/
<b>Bouira</b>	Chorfa	122,97	110,28
<b>Bejaïa</b>	/	46,35	16,59
<b>Jijel</b>	/	74,63	62,9 (46,91%)
<b>Totale</b>	<b>6650 cas enregistrés sur le territoire national et 0 décès</b>		

**Tableau III** : Taux des TIAC dans différentes communes les plus touchées de la Wilaya de Blida en 2016 (INSP, 2017).

Commune	Aliment incriminé	Agent responsable	Malade	Hospitalisation	Sexe
Guerouaou, Benkhilil, Boufarik, Chebli, Soumaa	Petit lait (Lben)	<i>Staphylococcus aureus</i> Germes coliformes	96	05	50 Masculins 46 Féminins
Guerouaou, Benkhilil, Boufarik, Benitamou, Soumaa	Mille feuilles	<i>Salmonella enteritidis</i>	72	03	32 Masculins 40 Féminins
Meftah	Eau	Germes coliformes	50	04	24 Masculins 26 Féminins
Boufarik	Pizza à la mayonnaise	/	17	0	01 Masculin 16 Féminins
<b>Totale des cas</b>	<b>447 personnes (97,17%) soit 13 complications (2,83%) et 0% décès</b>				

### 1.5 Germes pathogènes responsables des altérations alimentaires

Selon plusieurs auteurs, il existe plusieurs micro-organismes pathogènes qui peuvent être à l'origine d'intoxications alimentaires ou de toxi-infection alimentaire collective.

Si certaines bactéries engendrent des troubles du fait des toxines qu'elles produisent, il en existe d'autres qui sont pathogènes par virulence. Parmi les premières, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli O : 157 H7*, *Clastridium perfirengens* et *C. botulinum*).

### 1.5.1 *Salmonella*

#### 1.5.1.1 Description

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* (Birembaux, 2017). Des bacilles mésophiles, à Gram négative, non sporulés, la plupart doué d'une mobilité propre grâce à des flagelles péritriches (à l'exception de *Salmonella gallinarum*). Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, réduisent les nitrates en nitrites et peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone (Toe, 2018).

#### 1.5.1.2 Mode de transmission

Les *Salmonelles* sont associées au tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud (35-43°C) ou froid. La contamination se fait principalement par voie orale suite à l'ingestion d'eaux ou d'aliments souillées ou mal cuits, mais elle est également possible par l'intermédiaire des porteurs sains (Anses, 2011 ; Toe, 2018).

#### 1.5.1.3 Pouvoir pathogène

Une des premières causes des toxi-infections alimentaire collectives (TIAC) (Birembaux, 2017). La durée d'incubation des salmonelloses est de 6 à 72 heures, qui supposent l'ingestion d'un nombre élevé de germes ( $10^5$ - $10^7$  germes/g). Cependant, une *Salmonella typhi* suffit pour provoquer une typhoïde (Prescott et al., 2003 ; Birembaux, 2017). Elle se manifeste par une fièvre, des diarrhées (diarrhées hémorragiques), des douleurs abdominales, des vomissements et un maux de tête (Birembaux, 2017).

### 1.5.2 *Escherichia coli*

#### 1.5.2.1 Description

*Escherichia coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* du genre *Escherichia*. Des courts bâtonnets à Gram négatifs, non sporulés, mobiles (Baliere, 2016 ; Birembaux, 2017). Ils sont anaérobies facultatifs. Ils sont capables de fermenter plusieurs sucres, mais leur fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique (King et al., 2016 ; Sun et al., 2021) ; également la production d'indole, la présence d'une activité  $\beta$ -glucuronidase et

la multiplication à 44°C. Dont *E. coli* O157 :H7 est la plus fréquente en produisant une exotoxine de type Shiga-like-toxine (Véro-toxine) (Baliere, 2016 ; Birembaux, 2017).

### 1.5.2.2 Mode de transmission

La principale voie de transmission est indirecte suite à l'ingestion d'eaux ou d'aliments souillés ou mal cuits, mais également une transmission directe est possible suite au contact avec des animaux infectés ou avec leurs déjections, ainsi qu'une transmission interhumaine féco-orale (Anses, 2014 ; Toe, 2018).

### 1.5.2.3 Pouvoir pathogène

Une toxi-infection alimentaire (TIA) qui se manifeste par une diarrhée banale ou colite hémorragique, crampes abdominales et diarrhée initialement aqueuse puis sanglante chez un patient généralement apyrétique ou subfébrile (Ramanathan, 2010 ; Birembaux, 2017).

Des complications qui se manifestent par un syndrome hémolytique et urémique (SHU), causant des complications neurologiques et une insuffisance rénale chronique (Birembaux, 2017 ; Toe, 2018).

## 1.5.3 *Staphylococcus aureus*

### 1.5.3.1 Description

*Staphylococcus aureus* appartenant à la famille des *Staphylococaceae* du genre *Staphylococcus*. Des cocci à Gram positif et catalase positif (Birembaux, 2017). Elles sont des aéro-anaérobies, qui métabolisent le glucose par la voie fermentaire (Mergenhagen et al., 2020)

### 1.5.3.2 Mode de transmission

Bien que *S. aureus* soit capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement en état de dormance (Pascoe et al., 2014, Mulyukin et al., 2014), la contamination par une source environnementale reste relativement rare, sauf en milieu hospitalier où elle est en prévalence (Birembaux, 2017 ; Kim et al., 2020). Néanmoins, un autre mode de transmission par des aliments ou ingrédients contaminés par des Entéro-toxines Staphylococciques (ES) (Birembaux, 2017 ; Hermana et al., 2020).

### 1.5.3.3 Pouvoir pathogène

Le spectre des infections à staphylocoques s'étend des boutons et des furoncles au syndrome de choc toxique et à l'asepsie, dont la plupart dépend de nombreux facteurs de virulence. D'autre part, certaines infections, comme l'intoxication alimentaire se présentent par des crampes abdominales, des nausées, des vomissements, parfois suivis de diarrhée (Saulat Jahan, 2012 ; Tanouti, 2016 ; Birembaux, 2017).

### 1.5.4 *Clastridium*

#### 1.5.4.1 Description

Le genre *Clastridium* appartient à la famille des Clostridiaceae. Des bactéries à Gram positif, généralement anaérobie et mobiles, ayant la capacité de sporuler (Birembaux, 2017).

#### 1.5.4.2 Mode de transmission

La bactérie est transmise à l'Homme suite à l'ingestion de plats cuisinés, notamment ceux à base de viande (Lindstroin et al., 2011). En outre, il n'y a pas de transmission directe documentée entre l'animal malade et l'Homme, ni entre Homme malade et Homme sain (Birembaux, 2017 ; Franco-Buenaventura et Garcia-Perdomo, 2020).

#### 1.5.4.3 Pouvoir pathogène

*Clastridium perfringens* et *C. botulinum* sont les plus fréquemment impliquées dans les cas d'intoxications alimentaires (Kirk et al., 2015), causant respectivement des pathologies tel que les entérites et le botulisme, suite à la libération des entérotoxines et de neurotoxine botulique (Chen et al., 2014 ; Uzal et al., 2016 ; Modugno, 2018 ; Maier et Eckmann, 2020). En revanche, *C. perfringens* peut également contaminer des plaies et être à l'origine de gangrène (Birembaux, 2017 ; Archambault et Rubin, 2020). L'intoxication grave par cette bactérie se caractérise par des manifestations paralytiques bilatérales et symétriques avec troubles sécrétoires. Diarrhée sans fièvre ni caractère hémorragique (Tanouti, 2016).

### 1.5.5 *Aspergillus niger*

#### 1.5.5.1 Description

Selon la description citée par **Gauthier (2016)**, *A. niger* est classé dans la division des Deutéromycètes, du genre *Aspergillus*. Un champignon cosmopolite et omniprésent dans l'environnement. Son appareil végétatif est formé de filaments mycéliens cloisonnés et ramifiés. Se dressent sur ces filaments végétatifs des conidiophores longs, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure ; qui se terminent par des vésicules globuleuses et entièrement fertiles. Des cellules conidiogènes sont précédées de métules formant des têtes bisériées radiées. L'ensemble phialides/métules forme le stérigmate. Le stérigmate, la vésicule et les spores constituent la « tête aspergillaire».

#### 1.5.5.2 Mode de transmission

Une contamination directe par inhalation de spores aspergillaire ou indirecte suite à l'ingestion des toxines par l'intermédiaire d'un aliment (**Ben Miri et al., 2018**).

#### 1.5.5.3 Pouvoir pathogène

Il est à l'origine d'une aspergillose, d'otites, de sinusites et d'infections cutanées. Provoquant des toxi-infections alimentaire (TIA) par l'intermédiaire de toxines (appelées mycotoxines) qu'elles produisent. C'est le cas de l'aspergille qui produit des mycotoxines appelées Malformine et Naftoquinone (**Gauthier, 2016**). Ces derniers possèdent un effet cancérigène et tératogène, provoquant des cancers hépatiques et extra-hépatiques humains (**Ben Miri et al., 2018**)

### 1.5.6 *Penicillium*

#### 1.5.6.1 Description

Le genre *Penicillium* appartenant à la division des Deutéromycètes. Les colonies présentent un aspect duveteux voire poudreux, de couleur vert de gris et, plus rarement, blanche. Morphologiquement, il se distingue par leur organisation en pinneau. Il est saprophyte et peut devenir parasite en présence d'humidité lors du stockage. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées. (**Gauthier, 2016 ; Aloui, 2018**).

### 1.5.6.2 Mode de transmission

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation de spores et se rapportent le plus souvent à voies respiratoires inférieures et supérieures (**Gauthier, 2016**).

### 1.5.6.3 Pouvoir pathogène

Le genre *Penicillium* est responsable de nombreuses dégradations. Il est très commun dans l'environnement ; on le retrouve aussi bien dans le sol et les matières organiques en décomposition que dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les arachides et les produits laitiers (**Gauthier, 2016**). Cependant, il est responsable de la production de plusieurs types de mycotoxines (**Tannous et al., 2015 ; Gautier, 2016**).

## 2 Mode de Conservation

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments, entre autre la prévention des phénomènes d'oxydation. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût et même parfois à l'apparition de substances toxiques (**Nabih et Abou-Taleb, 2007**).

D'après plusieurs auteurs, différentes stratégies ont été mises à point pour assurer la sécurité et la qualité des produits alimentaires ainsi que de prolonger leur durée de vie (**Cherrat, 2013**). En outre, les deux Tableaux (IV et V) les représentent.

### 2.1 Conservation par des techniques classiques

Selon les travaux réalisés par plusieurs auteurs dont **Blancher et al. (2002) ; Boumendjel (2005) ; Vanden Boogard et al. (2005) ; Vierling (2008) ; Emilie (2009) ; Murielle (2009) ; Sergelidis et Abraham (2009) ; Ait-Ouazzou (2012) ; Jean (2014), Métali et al. (2016) ; Abusheliabi A. et al. (2017) ; Clemens (2018) ; Bragason et al. (2020) et Baddi et al. (2021)**, il existe plusieurs méthodes de conservation classique. En effet, le **Tableau IV** les résume.

Tableau IV : les différents moyens classiques de conservation des denrées alimentaires

	Technique	Rôle	Exemple
Conservation à froid	Congélation (-18°C)	Ralentir, voire arrêter la prolifération et l'action de micro-organismes et de conserver à long terme.	<u>Conservation de viande fraîche</u> : Ralentir l'action des coliformes fécaux et les germes pathogènes responsables d'intoxication alimentaires
	Réfrigération (0-4°C)		
	Surgélation (-18°C)		
Conservation à chaud	Lyophilisation	-Congélation sous vide à l'abri de l'oxygène et l'atmosphère. - Déshydratation.	Effet inhibiteur du lait de chamelle pasteurisé contre des pathogènes d'origine alimentaire ( <i>S. aureus</i> , <i>E. coli O157:H7</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i> ).
	Séchage		
	Stérilisation	Destruction des causes d'altérations biologiques (enzymes et flore bactérienne) par effet thermique (+115 à 140°C)	
	Pasteurisation	(80 à 85°C)	
Conservation chimique	Ajout d'additif alimentaire	Préserver et/ou améliorer l'innocuité, la fraîcheur, le goût (sel/glycérol), la texture ou l'aspect de la denrée alimentaire (Effet doublement conservateur).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agents conservateurs (E200-E290) : effet bactériostatique et fongistatique sur <i>E. coli</i>, <i>Aspergillus</i>.</li> <li>- Acide sorbique (E200) : inhibe la germination de <i>C. botulinum</i> en remplaçant les nitrites.</li> <li>- Agents anti-oxygènes (E300-E321) : prévenir le rancissement des produits riches en lipides.</li> </ul>
Conservation physique	Irradiation ou ionisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Exposition directe de certains rayonnements électromagnétiques.</li> <li>- Toujours associée à la réfrigération ou la surgélation.</li> <li>- Utilisée pour traiter les épices et les herbes aromatiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assainissement efficace, en particulier vis-à-vis de parasites (<i>Trichines</i>, <i>Cysticercus de Ténias</i>, <i>Toxoplasmes</i>), de germes microbiens préoccupants en santé publique (<i>Bacillus anthracis</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Listeria</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Yersinia</i>,...).</li> </ul>

## 2.2 Conservation par les plantes médicinales et aromatiques

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

De nombreux travaux ont été réalisés sur la conservation des denrées alimentaires par les huiles essentielles, dont le tableau suivant les représente (Tableau V) :

**Tableau V** : Conservation des denrées alimentaires par les huiles essentielles

Plante	Produit alimentaire	Germe pathogène	Durée de conservation	Référence
<b>Myrte</b> ( <i>Myrtus communis</i> )	Yaourt brassé	- <i>Sterptococcus thermophilus</i> - <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	21 jours	-Luquet et Corrieu (2008) -Gürsoy et al. (2010)
<b>Cannelle de Ceylan</b> ( <i>Cinnamomum verum</i> )	Céréales (Mais, riz, lentilles, blé, arachide)	- <i>A. flavus</i> - <i>A. niger</i>	02 à 08 semaines	Edet (2004)
<b>Cannelle (2.5%)</b> ( <i>Cinnamomum cassia</i> )	Viande de bœuf hachée	- <i>Listeria monocytogenes</i>	07 jours	Khaleque et al. (2016)
<b>Clous de girofle (10%)</b> ( <i>Syzygium aromaticum</i> )			03 jours	
<b>Clous de girofle</b>	Viande	- <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>A. hydrophila</i>	07 jours	Skandamis et Nychas (2010)
<b>Oregano</b> ( <i>Origanum compactum</i> )				
<b>Thym</b> ( <i>Thymus vulgaris L.</i> )				
<b>Menthe poivrée</b> ( <i>Mentha piperita</i> )	Viande hachée	- <i>Lactobacillus plantarum</i>	07 jours	Smaoui et al. (2016)



## **PARTIE II**

### **Les huiles essentielles**

## 1. Généralités

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Bruneton, 1993 ; Bruneton, 2009 ; Bruneton, 2016**).

Les huiles essentielles (HE) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide par hydrodistillation, entraînement à la vapeur ou par pression mécanique (**Kalemba, 2003 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013**).

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines (**Caillet et Lacroix, 2006**).

### 1.1 Thym (*Thymus vulgaris* L.)

#### 1.1.1 Description

Espèce aromatique et médicinale. Un sous-arbrisseau vivace qui atteint une hauteur de jusqu'à 40 cm (Figure 02), originaire des régions méditerranéennes et orientales (**Fani et Kohanteb, 2017**) qui pousse sur les sols sec et caillouteux du Nord de l'Afrique, du Sud de l'Europe (garigues et maquis) et l'Asie où il s'adapte parfaitement à la sécheresse et la chaleur des étés (**Abdelli, 2017**). Il est aujourd'hui utilisé dans le monde entier comme herbe aromatique (**Boulade, 2018**) mais également comme plante médicinale (**Deschepper, 2017**).

#### 1.1.2 Classification

- Règne : Plantes
- Sous Règne : Plantes vasculaires
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous Classe : Dialypétales



**Figure 02** : Partie aérienne de *Thymus vulgaris*

- Ordre : Labiales
- Famille : Lamiacées
- Genre : *Thymus*
- Espèce : *Thymus vulgaris* L. (Benourad, 2015)

Nom vernaculaire : Thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, frigoule, barigoule, thym commun, thym cultivé et saatar ou zaatar (en arabe صَعْنَر ou زَعْنَر) (Teuscher et al., 2005).

### 1.1.3 Propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle du Thym vulgaire

#### a) Activités antimicrobienne

- Plus importante et puissante à large spectre (même sur des souches résistantes aux antibiotiques traditionnelles) ; due à la présence de phénols (thymols et cava-cavacols) (Annexe IV).
- Présente une activité parasitaire vermifuges ainsi qu'une action intéressante sur les Gram+ (*Staphylococcus aureus*) que sur les Gram- (Pateiro et al., 2021), Contre les dermatophytes, les moisissures alimentaires (notamment *Aspergillus*), les levures (ou elle potentialise l'effet d'Amphotericine B vis-à-vis *Candida albicans*) et certains phytopathogènes (Khalili et al., 2015).

#### b) Activité anti-inflammatoire

Une activité anti-oxydante et spasmolytique due à la présence d'Acide rosmarinique, stimulant et tonique général et immuno-modulateur (Christelle, 2019).

## 1.2 Menthe poivrée (*Mentha piperita*)

### 1.2.1 Description

Une plante sauvage, herbacée vivace, rampante, à tiges quadrangulaires, ascendantes, pouvant atteindre 1,20 m de haut, ses feuilles sont opposées, ovales, aiguës et dentées, généralement d'une belle couleur verte, souvent ridées, parfois duveteuses, glabre et fortement parfumée (Figure 03). Elle est cultivée dans une région tempérée d'Europe, d'Asie, des États-Unis, d'Inde et des pays méditerranéens (Ganesan et Laiq-Ur, 2020 ; Gadaka et al., 2021).

*Mentha piperita* L. est l'hybride stérile issu du croisement de la menthe aquatique (*Mentha aquatica* L.) et la menthe verte (*Mentha spicata* L.) (Benabdallah, 2018 ; Gadaka et al., 2021).

Nom vernaculaire : En arabe : Naanaa har ; français : Menthe anglaise ou menthe poivrée.

### 1.2.2 Classification

- Règne : Plantes
- Sous Règne : Plantes vasculaires
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous Classe : Gamopetales
- Ordre : Sympétales
- Famille : Lamiacées (Labiacées)
- Genre : *Mentha*
- Espèce : *Mentha piperita* (Kouame et al., 2016)



**Figure 03** : Partie aérienne de *Mentha piperita*

### 1.2.3 Propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle de la menthe poivrée

La saveur aromatique est à l'origine des propriétés apéritives et digestives. Son huile essentielle présente des propriétés antimicrobiennes marquées tel que :

- a. Propriétés antifongiques : Le menthol et l'huile essentielle de menthe poivrée sont fongicides contre *Candida albicans*, *Aspergillus* et les dermatophytes (Saharkhiz, 2012).
- b. Propriétés antibactériennes sur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Escherichia coli* (Boulade, 2018 ; Singh, 2015 ; Bupesh, 2007 ; Barchan et al., 2016).
- c. Autres propriétés expectorantes, cardiotoniques, stomachiques, antispasmodiques, régulatrices, protecteur hépatique, cholérétique, cholagogue, pancréato-stimulant, tonique cérébral, spasmolytique, antalgique, virucide, vermicide, sympathomimétique et favorise la respiration métabolique cellulaire (Singh Rajinder et al., 2015 ; Benabdallah, 2018).

### 1.3 Coriandre (*Coriandrum sativum* L.)

#### 1.3.1 Description

Plante annuelle herbacée dressée aromatique et glabre, qui a une longue histoire en tant qu'herbe culinaire, pouvant atteindre 30 à 90cm de haut (Figure 04). Elle est originaire du sud de l'Europe et de la région occidentale de la Méditerranée. Cette herbe est largement utilisée et cultivée dans le monde entier comme plante aromatique et médicinale (Ghedira et Goetz, 2015 ; Annou, 2018).

Nom vernaculaire : coriandre, coriandre cultivée, persil arabe, persil chinois, punaise mâle, cerfeuil chinois, (كزبرة kuzbura) (Ghedira et Goetz, 2015).

#### 1.3.2 Classification

- Règne : Plantae
- Superdivision : Embryophyta
- Division : Tracheophyta
- Subdivision : Spermatophytina
- Classe : Magnoliopsida
- Superordre : Asteranae
- Ordre : Apiales
- Famille : Apiaceae
- Genre : *Coriandrum*
- Espèce : *Coriandrum sativum* L. (Peter et al., 2006)



**Figure 04** : (A) Graines de coriandre (B) Partie aérienne de *Coriandrum sativum*

### 1.3.3 Propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle de la coriandre

#### a) Propriétés antimicrobiennes

- Responsable d'une activité synergique avec les antibiotiques (Chloramphénicol, Ciprofloxacine, Gentamicine et Tétracycline) sur *Acinetobacter baumannii* (**Durate et al., 2012**).
- Bactéricide contre *Hormis Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis* (**Silva et al., 2011**).
- Active sur *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* et le *S. aureus* résistante à la méthicilline, avec une bonne tolérance cutanée (**Casetti et al., 2012**).
- Présente un effet synergique avec l'Amphotéricine B dans les infections à *Candida albicans* et un effet additif dans l'infection à *C. tropicalis* (**Silva et al., 2014**).

#### b) Propriétés anti-oxydantes

Liée au composition chimique de l'huile qui peut être appliquée pour la conservation des lipides et réduire la peroxydation lipidique dans les systèmes biologiques (**Annou, 2018**), anticancéreuses, anti-mutagéniques très importantes (**Kačániová et al., 2020**).

## 2 Domaine d'utilisation des trois huiles essentielles

Selon la Pharmacopée européenne, l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) et les travaux faites par plusieurs auteurs, les applications des huiles essentielles du Thym, Menthe poivrée et Coriandre sont très vastes et touchent particulièrement le domaine alimentaire, pharmaceutique et la médecine traditionnelle et moderne. Le tableau VI résume les principaux domaines d'utilisation des huiles essentielles de Thym, Menthe poivrée et Coriandre.

Tableau VI : Principaux domaines d'utilisation des huiles essentielles de Thym, Menthe poivrée et Coriandre.

Huile essentielle	Domaines d'utilisations		
	Industrie agro-alimentaire	Médecine	Industrie pharmaceutique et cosmétique
<b>Thym</b> <i>(Thymus vulgaris L.)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Epice et condiments grâce à ses vertus de saveurs d'arome et de conservation (<b>José et al., 2020</b>).</li> <li>- Infusion aux tisanes.</li> <li>- Agent d'assaisonnement (<b>Nasab et al., 2012 ; Satyal et al., 2016</b>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phytothérapie traditionnelle (<b>Guesmi et al., 2020 ; Elyaagoubi et al., 2021</b>), grâce à ces propriétés antimicrobiennes, anti-oxydantes, carminative, apéritive, cholagogue et spasmolytique (<b>Robin, 2017</b>).</li> <li>- Traite l'alopecie, la plaque dentaire, les infections dermatophytes, la bronchite, la toux, les affections cutanées inflammatoires et la détresse gastro-intestinales (<b>Mewes et al., 2008 ; Hosseinzadeh et al., 2015 ; Satyal et al., 2016</b>).</li> <li>- Epigastrique bain de bouche ou de pieds.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Composant de produits de beauté et soins et détergents (<b>Tisserand, 2014</b>).</li> <li>- Fabrication des pommades antiseptiques et cicatrisantes, les émulsions, les cataplasmes, les gouttes, sirops et gélules pour le traitement des infections respiratoires.</li> </ul>
<b>Menthe poivrée</b> <i>(Mentha piperita)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agent aromatisant et conservateur.</li> <li>- Composant important dans les bonbons, chocolats et boissons (<b>selon la norme ISO NF T 75-210</b>).</li> <li>- Complément efficace pour diminuer l'appétit, diminuer les envies de faim</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Propriétés antalgique, anti-inflammatoire, anesthésiantes et antiseptique grâce à ces nombreux principes actifs (<b>Boukhobza, 2020</b>).</li> <li>- Action sécrétolytique au niveau de la sphère respiratoire (bronchique), digestive (<b>Lobstein et al., 2016</b>).</li> <li>- Décongestionnant nasal.</li> <li>- Gestion des troubles gastro-intestinaux, cutanées et les</li> </ul>	<p>Composant important de produits de soins et de beauté (<b>Lobstein et al., 2016</b>).</p>

	et consommer moins de calories ( <b>Gadaka et al., 2021</b> ).	douleurs musculaires, névralgiques et rhumatismales. - Remède des troubles biliaires, dyspepsie, flatulence, spasmes des vies biliaires et la vésicule biliaire ( <b>Gadaka et al., 2021</b> )	
<b>Coriandre</b> ( <i>Coriandrum sativum L.</i> )	- Epice, Aromatisant et Conservateur en petite quantité ( <b>Annou, 2018</b> ).	-Propriétés spasmolytique, antioxydant, carminative. Stimule le suc gastrique ( <b>Khare, 2007 ; Mohamad et al., 2011</b> ). -Neurodégénératives, Anxiolytique et antidépresseur. Activité antidiabétique ( <b>Brindis et al., 2014</b> ). -L'extrait de graine de Coriandre fait baisser la glycémie et augmente la sécrétion d'insuline ( <b>Aidi et al., 2009</b> ).	Excellent arôme naturel de savons, baumes, parfums et produits ménagers.



**CHAPITRE II**  
**Matériel et Méthodes**

## I. Objectifs et démarche expérimentale

Ce présent travail a pour objectif d'évaluer le profil de résistance des germes pathogènes d'origine alimentaire vis-à-vis de trois huiles essentielles à savoir : le thym (*Thymus vulgaris L.*), la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et la coriandre (*Coriandrum sativum*).

## II. Lieu d'expérimentation

Notre étude a été menée dans trois lieux différents, en outre :

- L'extraction des huiles essentielles du Thym et menthe poivrée a été conduite au sein de la distillerie BIO-SOURCE à la ferme pédagogique de Zéralda, Wilaya d'Alger (société nationale de développement de la filière des Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales PPAM), durant une période de 15 jours de 18 Avril au 03 mai 2021.
- L'isolement et l'identification des micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire, les expérimentations de l'activité antimicrobienne et l'épreuve de conservation ont été effectuées au niveau du laboratoire d'hygiène et de référence de la Wilaya de Blida, durant une période de travail pratique de deux mois et 20 jours ; étalée du 28 Mars au 17 Juin 2021.
- La préparation des milieux de culture ont été réalisés au laboratoire de microbiologie au sein de la station expérimentale de l'université Saad Dahleb Blida 01.

## III. Matériel d'expérimentation

### 1. Matériel biologique

- Notre échantillon est constitué de 130 produits alimentaires analysés, reçus de diverses régions de la Wilaya de Blida (dont 21 analyses de charcuterie et produits à base de viande, 18 analyses de viande et dérivés, 37 analyses de lait et produit laitiers, 39 analyses de boissons et jus de fruit et de légumes, 8 analyses de pâtisseries et ovo-produits, 2 analyses de céréales, une analyse de produits conserve et d'autres analyses de divers autres produits) , au cours de la période étalée du 28 Mars au 09 Mai 2021.

- Souche *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fournit aimablement par M<sup>r</sup> TEFFAHI Djamel, ingénieur au sein du laboratoire d'hygiène et de référence.

- **Matériel végétale**

Le matériel végétale est constitué de la partie aérienne des deux plantes Thym (*Thymus vulgaris* L.) et Menthe poivrée (*Mentha piperita*) qui ont été cueillies à la fin du mois d'Avril, de la région de Médéa et Bejaia respectivement. Ces plantes ont été séchées à l'ombre et à l'air libre pendant une période de 10 jours à fin de diminuer leurs teneuses en eau et à préserver au maximum l'intégrité des molécules volatiles.

Un volume de 10 ml d'huile essentielle de coriandre (*Coriandrum sativum*) chémotype linalol a été acheté chez AROMA-ZONE de France. Une huile essentielle complète 100% pure et naturelle, certifiée par Ecocert FR-BIO-01 distillée à partir des graines originaires de Belgique par un entraînement à la vapeur d'eau. Elle a été conservée teintée à l'abri de la lumière et de l'air à fin d'éviter tout un phénomène d'oxydation et de contamination durant toute la période de notre travail pratique (**Annexe XI**).

## 2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté par les instruments, les appareillages, les réactifs chimiques, les milieux de cultures, les disques témoins d'antibiotiques et les disques vierges stériles de 6mm et 9mm utilisés (**Annexe IX et Annexe X**).

## IV. Méthodes expérimentales

### IV. 1. Isolement Et identification des germes pathogènes alimentaires

- **Analyse bactériologique des denrées alimentaires**

Nous avons fait la recherche des bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Claustidium perfirengens* et *Salmonella*), des levures et moisissures (*Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Penicillium*) sur la base des exigences recommandés par le Journal officiel de la république algérienne d'année 2017 (**JORA, 2017**).

Selon le JORA, pour chaque denrée alimentaire, une liste de microorganismes est établie par un taux de présence acceptables. Les échantillons sont effectués dans des conditions aseptiques et transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C.

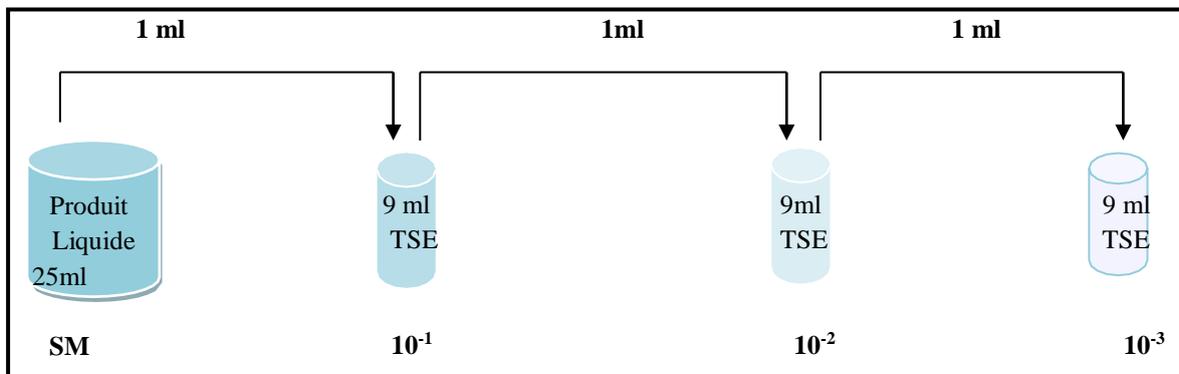
### a) Préparation de la solution mère (ISO 6888, 2004)

Un volume de 25 grammes (cas de produit solide) ou de 25ml (cas de produit liquide) à analyser est prélevé. Puis l'introduire aseptiquement dans un bocal stérile préalablement taré contenant au préalable 225 ml de diluant soit le TSE (Tryptone Sel Eau) et bien homogénéiser. Le mélange est incubé à 37°C dans l'étuve pendant 15 à 30min.

### b) Préparation des dilutions décimales (ISO 6887-6, 2013)

#### ❖ Cas de produit liquide

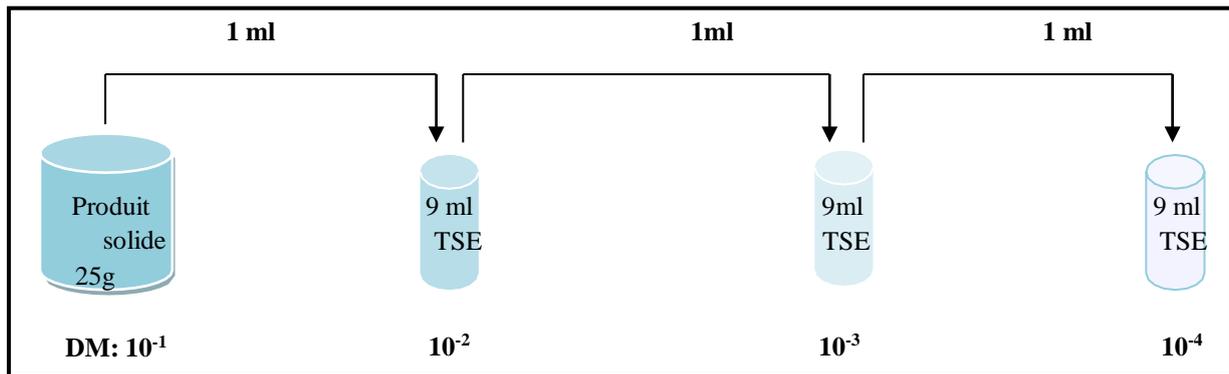
- Après préparation de la suspension mère (SM), introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile, 1 ml de la (SM), dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant : cette dilution est alors au  $1/10^{\text{ème}}$  ou  $10^{-1}$ .
- La suite des dilutions sont préparées successivement jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  (**Figure 05**).



**Figure 05** : Préparation des dilutions décimales en cas de produit liquide

#### ❖ Cas de produit solide

- La suspension mère constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution  $1/10$  ou  $10^{-1}$ .
- Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile 1ml de la (DM), dans un tube à vis stérile contenant au préalable 9 ml du même diluant (TSE) : cette dilution sera alors au  $1/100$  ou  $10^{-2}$ .
- La suite des dilutions est préparées successivement jusqu'à la dilution  $10^{-4}$  (**Figure 06**).



**Figure 06** : Préparation des dilutions décimales en cas de produit solide

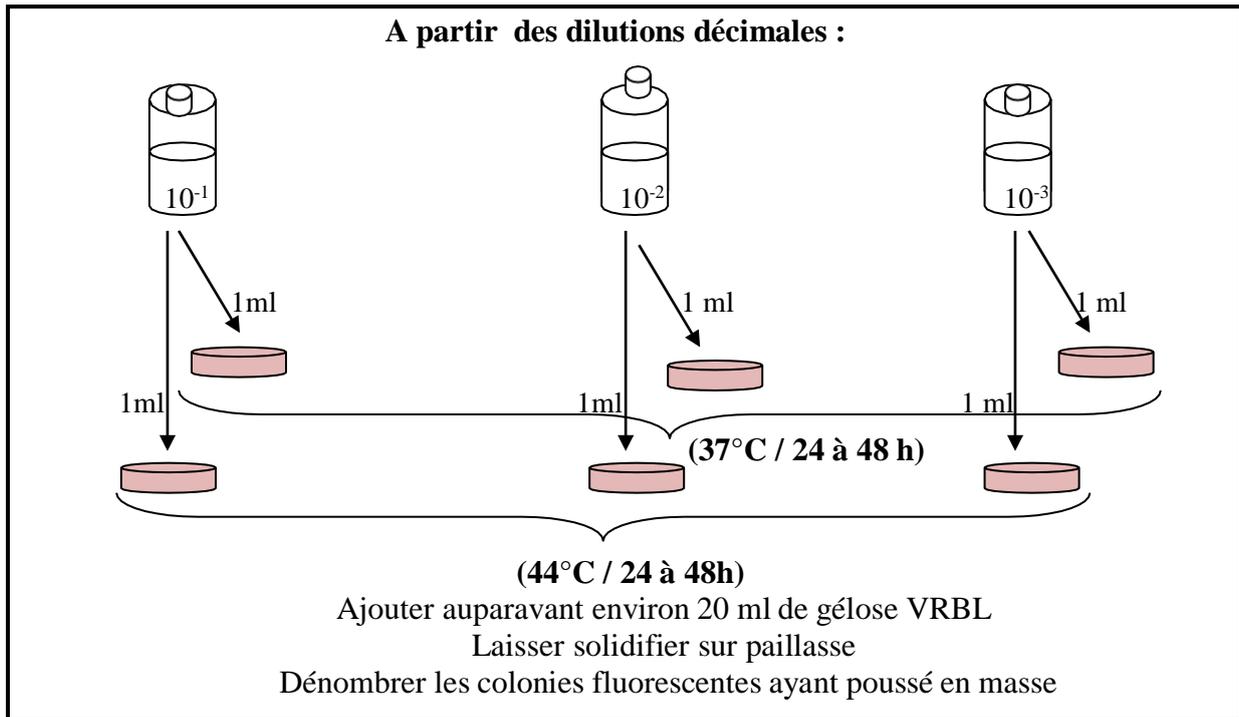
#### IV.1.1 Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide

##### a. Technique

- A partir des dilutions décimales allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$ , porter aseptiquement 2 fois 1 ml dans deux boîtes de Pétri vides.
- Compléter ensuite chaque boîte avec environ 20 ml de la gélose VRBL fondue puis refroidie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Faire ensuite des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de « 8 » pour permettre à l'inoculum de bien se mélanger à la gélose.

##### b. Incubation

Une série de boîtes sera incubée à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes totaux, tandis que l'autre série sera incubée à  $44^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 h et servira à la recherche de Coliformes fécaux (**Figure 07**).



**Figure 07 :** Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide

### c. Dénombrement

- Il s'agit de compter toutes les colonies ayant poussé sur les boîtes en tenant compte des facteurs de dilutions, de plus :
- Ne dénombrer que les boîtes contenant entre 15 et 200 colonies.
- Multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution.
- Faire ensuite la moyenne arithmétique des colonies entre les différentes dilutions.
- Il est impossible de trouver plus de Coliformes fécaux que de Coliformes totaux.

### d. Lecture

Sont considérées comme caractéristiques, les colonies rouges de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm sur gélose VRBL, après 24 heures d'incubation.

#### IV.1.2 Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* (ISO4832/NF V08-060, 2009)

*Escherichia coli* appartient au groupe des Coliformes thermo-tolérants, pour cela la recherche et le dénombrement de ce microorganisme se fait à partir des boîtes de 44°C.

**a. Technique de recherche**

Identifier au moins 3 colonies caractéristiques des Coliformes thermo-tolérants sur chaque boîte retenue, puis aspirer la colonie à l'aide d'une pipette pasteur munie d'une poire et repiquer séparément chaque colonie et l'ensemencer dans le milieu urée indole. Incuber ce milieu 18-24h à 37°C.

**b. Principe de la réaction de l'urée**

Cette réaction permet la mise en évidence simultanée de :

- La production d'indole par l'hydrolyse du tryptophane par la tryptophanase. L'indole produit est mis en évidence par le réactif de Kovacs (le diméthylamino-4-benzaldéhyde) qui réagit avec l'indole avec formation d'un composé rouge.
- L'hydrolyse de l'urée par une uréase. Il y a production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Ce dernier alcalinise le milieu. Cette alcalinisation du milieu est mise en évidence par le virage du rouge de phénol au rose (réaction positive).

**c. Lecture**

- Lecture de l'urée : le milieu est considéré négatif s'il garde sa couleur initiale après 24h d'incubation.
- Lecture de l'indole : rajouter 1 à 2 gouttes de milieu Kovaks et voir l'apparition d'un anneau rouge.

**IV.1.3 Recherche de *Staphylococcus aureus* (ISO 6888, 2004)**

La méthode utilisée est l'enrichissement au milieu Giolliti Cantonii (GC)

**a. Préparation du milieu d'enrichissement**

Au moment de l'emploi, ouvrir aseptiquement le flacon contenant le milieu de Giolliti Cantonii pour y ajouter 15 ml d'une solution de Tétrurite de Potassium, puis mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi.

**b. Ensemencement**

A partir des dilutions décimales retenues, porter aseptiquement 1 ml par dilution dans un tube à vis stérile, puis ajouter par la suite environ 15 ml du milieu d'enrichissement comme

l'indique. Bien mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

### c. Lecture

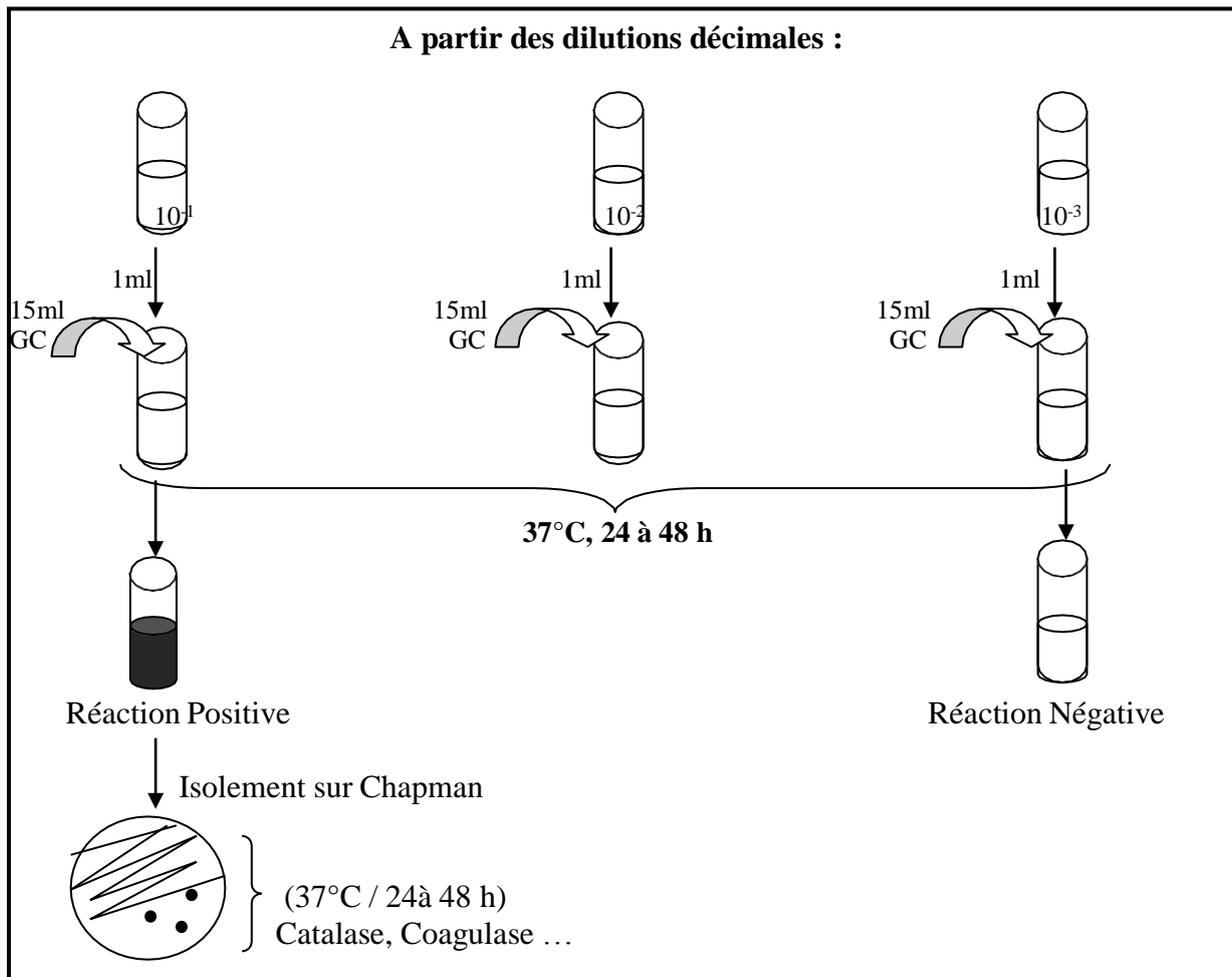
Seront présumés positifs, les tubes ayant virés au noir (**Figure 08**).

Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de *Staphylococcus aureus*, ces tubes feront l'objet d'une confirmation par isolement sur gélose Chapman préalablement fondue, coulée en boîtes de pétri et bien séchées.

Les boîtes de Chapman ainsiensemencées seront incubées à leur tour à 37°C pendant 24 à 48 heures. Après ce délai, repérer les colonies suspectes à savoir les colonies de taille moyenne, lisses, dorées, brillantes, pigmentées en jaune, entourées d'une zone transparente et pourvues d'une catalase et d'une coagulase.

### d. Expression des résultats

- Si à la dilution  $10^{-3}$ , le tube a noirci au bout de 24 heures d'incubation, mais à l'isolement sur Chapman, il n'y a pas de colonies caractéristiques ; ce tube est considéré comme négatif.
- Si par contre à la dilution  $10^{-1}$ , le tube a noirci au bout de 24 heures d'incubation, et à l'isolement, il y a des colonies caractéristiques, il faut tenir compte de la dilution en question, car le nombre réel de *Staphylococcus aureus* correspond à l'inverse de la dilution.



**Figure 08 :** Recherche de *Staphylococcus aureus* au milieu Giolliti Cantonii

#### IV.1.4 Recherche de spores d'Anaérobies Sulfite-réducteurs et de *Clostridium perfringens*

La méthode utilisée pour la recherche de *Clostridium perfringens* : méthode générale sur gélose Viande-Foie à 37°C (ISO 7937, 2004).

##### a. Préparation du milieu

Au moment de l'emploi faire fondre un flacon de gélose Viande foie, le refroidir dans un bain d'eau à 45°C puis ajouter une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de sulfite de sodium. Mélanger soigneusement et aseptiquement. Le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir dans une étuve à 45°C jusqu'au moment de l'utilisation.

**b. Ensemencement**

Les tubes contenant les dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  seront soumis :

- D'abord à un chauffage à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 8 à 10 minutes, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet, dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées.
- A partir de ces dilutions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis stériles de 16 mm de diamètre, puis ajouter environ 15 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, dans chaque tube. Laisser solidifier sur paillasse pendant 30 minutes.
- Ces tubes seront ainsi incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 16, 24 ou au plus tard 48 heures.

**c. Lecture**

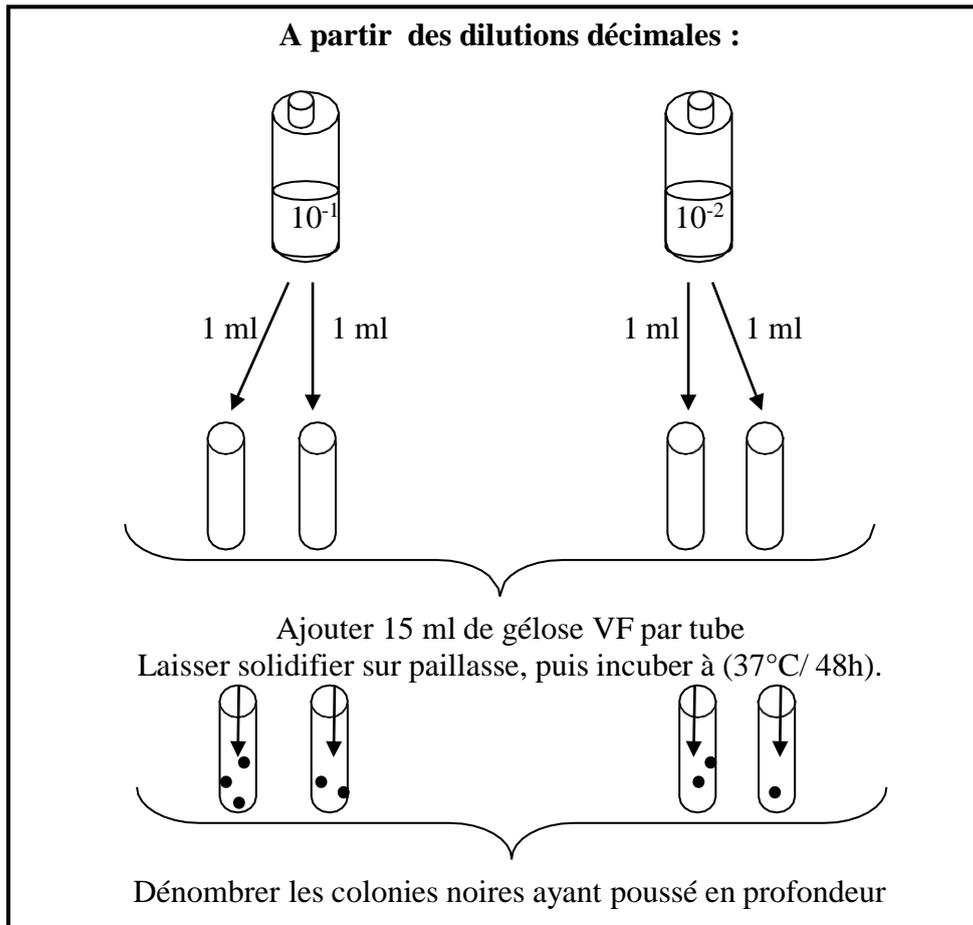
La première lecture doit se faire impérativement à 16 heures, car :

- D'une part les colonies de *Clostridium Sulfito-réducteurs* sont envahissantes auquel cas on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant alors l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse est à refaire.
- D'autre part, il faut absolument repérer toute colonie noire ayant poussé en masse et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm.

Dans le cas où il n'y a pas de colonie caractéristique ré-incuber les tubes et effectuer une deuxième lecture au bout de 24 heures voire 48 heures.

**d. Interprétation des résultats**

Il est donc impératif de repérer toute colonie noire, puis procéder à son identification biochimique (**Figure 09**).



**Figure 09** : Recherche de spores sulfito-réducteurs et de *Clostridium perfringens*

#### IV.1.5 Recherche de *Salmonella* (ISO 6579, 2002)

La recherche des *Salmonella* nécessite une prise d'essai à part (une solution mère à part) selon **la norme NF V 08-052 Mai 1997**.

➤ Jour 1 : Pré-enrichissement

Prélever 25ml ou 25g de produit à analyser dans un bocal stérile contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée, puis incuber à 37°C pendant 18 heures.

➤ Jour 2 : Enrichissement

L'enrichissement doit s'effectuer sur deux milieux sélectifs différents à savoir :

Le milieu de Rappaport Vassiliadis réparti à raison de 10 ml par tube.

Le milieu de Sélénite - Cystéine réparti à raison de 100 ml par flacon.

L'enrichissement proprement dit, se fait donc à partir du milieu de pré-enrichissement de la façon suivante :

- 0,1 ml en double pour les tubes de Rappaport Vassiliadis.
- 10 ml en double pour les flacons de Sélénite Cystéine.

Incubation : Le premier tube de Rappaport et de flacon de Sélénite seront incubés à 37°C, 24 h. tandis que, le deuxième tube de Rappaport et de flacon de Sélénite seront incubés à 44°C, 24 h.

➤ Jour 3 : Isolement

Chaque tube et chaque flacon fera l'objet d'un isolement sur le milieu gélosé Hektoen. Toutes les boîtes ainsiensemencées seront incubées à 37°C pendant 24 h.

➤ Jour 4 : Lecture des boîtes et Identification

Les Salmonella se présentent de la façon suivante : colonies le plus souvent gris bleu à centre noir sur gélose Hektoen. En revanche, Cinq colonies caractéristiques et distinctes feront l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

#### IV.1.6 Recherche et dénombrement de levures et moisissures

##### a. Technique (ISO 21527-2, 2008)

- A partir des dilutions décimales,  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$ , porter aseptiquement 4 gouttes dans une boîte de pétri contenant de la gélose OGA ou Sabouraud au Chloramphénicol.
- Étaler les gouttes à l'aide d'un râteau stérile, puis incuber à 25°C pendant 5 jours.
- Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies soit par les Levures soit par les Moisissures, on doit effectuer des lectures et des dénombrements tous les jours, Levures à part et les Moisissures à part.

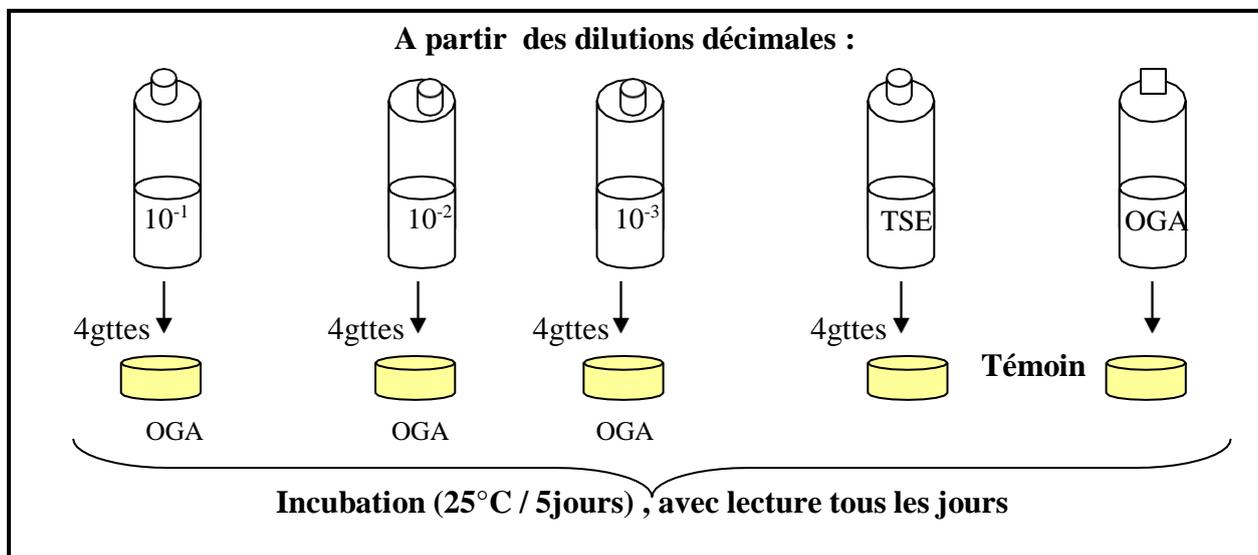
##### b. Remarques importantes

- Opérer de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le diluant (TSE), c'est-à-dire qu'il faut prendre quatre gouttes du diluant, les étaler avec un râteau à part et les incuber dans le même endroit que les boîtes tests, cette boîte constitue le témoin diluant.

- Incuber telle quelle, une boîte du milieu utilisé à savoir OGA ou Sabouraud, cette dernière sera incubée également telle quelle dans le même endroit et dans les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu.
- Au moment de la lecture, commencé obligatoirement par les deux boîtes témoin (du milieu et du diluant), si l'une d'entre elles est contaminée, l'analyse est ininterprétable donc à refaire (**Figure 10**).

### c. Interprétation des résultats

- Aspect macroscopique des colonies
- Retenir les boîtes qui contiennent moins de 150 colonies. Noter les dilutions correspondantes. On effectue des lectures après 72h, 84h et 96h d'incubation.
- Dénombrer les colonies de levures et les thalles de moisissures qui poussent en profondeur, où les colonies de levures sont des cellules ovoïdes ou rondes et les moisissures présentent des filaments mycéliens.



**Figure 10** : Recherche et dénombrement des levures et moisissures

## IV. 2. Identification des germes isolés

Pour l'identification des germes pathogènes alimentaires isolés, nous avons réalisé un ensemble de tests d'orientations (examen macroscopique et microscopique) pour une identification morphologique ; ainsi qu'une galerie classique (une gamme de tests biochimiques) qui révèle des voies métaboliques précises à chaque espèce.

Une préparation d'une suspension bactérienne ou fongique a été effectuée a fin de réaliser l'identification, où se met en jeu le transfert en condition aseptique, de quelques colonies (spores) bien isolées vers un tube de 05 à 10ml d'eau physiologique stérile.

La suspension bactérienne sert à ensemercer différents milieux de culture en tube ; permettant ainsi de mettre en évidence les différents caractères biochimiques des bactéries étudiées.

## IV. 2.1 Identification des bactéries

### IV. 2. 1. 1. Test d'orientation

- **Examen microscopique**

- a. **Etat frais (Denis et *al.*, 2016 ; Gestin et *al.*, 2021)**

Ce test permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique à grossissement x40.

- b. **Coloration de Gram (Joffin et *al.*, 2006 ; Denis et *al.*, 2016 ; Procop et *al.*, 2019)**

- Fixer le frottis à la flamme d'un bec bunsen.
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laissé agir une minute (violet de gentiane).
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau.
- Recouvrir la préparation de Lugol, laisser agir une minute.
- Rejeter le Lugol puis laver à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 95°.
- Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laissé agir quelques secondes.
- Rejeter la fuchsine, lavée abondamment, égoutté, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.
- L'observation se fait au microscope optique à grossissement x100 avec l'addition de l'huile à immersion.

## IV 2. 1. 2 Test d'identification biochimique

Afin d'orienter vers la famille de la bactérie, le microbiologiste se base sur l'aspect macroscopique des colonies (taille, pigment, contour, consistance et relief des colonies) et celui microscopique des bactéries après coloration de Gram (cf : 4.2.2.1 Examen microscopique, Coloration de Gram). Pour compléter sa présomption du genre bactérien, il utilise les tests d'orientation.

### IV 2. 1. 2. 1. Identification des bacilles à Gram négatif

Après confirmation à la coloration de Gram qu'il s'agit d'un bacille à Gram négatif (*E. coli* et *Salmonella*), le test d'oxydase est ensuite utilisé afin de différencier entre les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires.

#### a. Test d'oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Le test d'oxydase est le plus souvent utilisé dans le but de distinguer entre les bacilles à Gram négatifs non oxydatifs à oxydase négative (*Enterobacteriaceae*) et les bacilles à Gram négatifs oxydatifs à oxydase positive (*Pseudomonadaceae*) (Delarras, 2014 ; Willey et al., 2021).

Technique : ce test est réalisé à l'aide des disques vierges sur lequel on dépose une goutte du réactif N-diméthylparaphénylène diamine, sur lequel on dépose une colonie par une pipette pasteur stérile.

Lecture : se fait immédiatement et sans incubation.

- Présence d'une coloration bleu-volet : Oxydase (+).
- Absence d'une coloration : Oxydase (-).

#### b. Identification biochimique par galerie classique

Une fois orienté vers la famille et le genre de la bactérie isolée, la galerie d'identification biochimique à utiliser. L'identification a été faite par une galerie classique pour les genres *Escherichia* et *Salmonella* (Cowan et Marjorie, 2017).

- Test Urée-Indole : Technique (ISO4832/NF V08-060, 2009), (cf : recherche et dénombrement d'*Escherichia coli*).
- Test TSI (Gélose Glucose-Lactose-Saccharose-H<sub>2</sub>S)

Milieu solide, incliné, renfermant un indicateur de pH coloré, le rouge de phénol, il contient trois sucres (glucose avec une forte concentration au culot- saccharose et lactose au niveau de la pente), des peptones, des thiosulfates et du fer. Ce test nous renseigne sur trois caractéristiques (Ryan *et al.*, 2018):

- La production ou pas de gaz pendant la consommation du glucose se manifeste par un décollement de la gélose au fond du tube.
  - L'utilisation ou non du lactose qui se manifeste par un jaunissement de la pente sinon, la pente reste légèrement rose.
  - La production ou non d'H<sub>2</sub>S qui se traduit par un noircissement. Un ensemencement a été effectué par stries puis piqûre centrale sur la pente puis incubation à 37°C pendant 24heures.
- Test du citrate de Simmons

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

Incuber à 37°C pendant 48 heures ou plus. L'utilisation de citrate se traduit par le virage de l'indicateur de pH au bleu (Delarras, 2007 ; Lanotte et Mereghetti, 2007 ; Riedel *et al.*, 2019).

- Test Mannitol Mobilité

Ce test est utilisé pour les bactéries fermentatives. Il permet de mettre en évidence deux caractères : l'utilisation du mannitol et la mobilité. Sur le milieu de mannitol, un ensemencement a été effectué par piqûre centrale et incubation à 37°C pendant 24 heures. Si le milieu devient jaune : la bactérie est Mannitol +, s'il reste rouge elle est Mannitol -. Pour La mobilité, elle se traduit par l'envahissement de la gélose molle (Marchal *et al.*, 1982 ; Cappuccino et Welsh, 2020).

- Test ONPG

Ce test permet de rechercher la présence d'une enzyme intracellulaire  $\beta$ -galactosidase (ONPG hydrolase) qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose (**Delarras, 2014 ; Mahan et Lahman, 2019**).

- Technique : dans une suspension bactérienne dense en eau physiologique stérile, déposer un disque d'ONPG puis le mettre au bain-marie ou à l'étuve 37°C et lire le résultat après 15min et avant 24h.
- Lecture : ONPG (+) : virage de couleur de suspension incolore au jaune.

- Test sur milieu Moeller

Ce test permet de rechercher 3 enzymes LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase) et ADH (arginine dihydrolase) ; dont notre identification seulement 2 enzymes ont été disponible à la recherche (**Lanotte et Mereghetti, 2007**).

Technique : un ensemencement à été effectué avec 2 gouttes de suspension bactérienne dense, agitation. Si le tube n'est pas plein, le recouvrir par de la vaseline stérile afin de placer le milieu en anaérobiose.

Incubation à 37°C pendant 24h, le bouchon vissé complètement.

Lecture : -Virage acide (jaune) : résultat négatif lié à l'utilisation du glucose mais il n'y a pas eu une réalcalinisation et donc pas dégradation de substrat.

-Virage alcalin (violet) : résultat positif.

- Test sur Bouillon nitraté

Ce test permet la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate.

Technique : un ensemencement à été effectué avec quelques gouttes de suspension bactérienne dense, agitation et incubation à 37°C pendant 24h.

Lecture : - Virage du milieu au rouge : résultat positif et donc présence du nitrite.

- Pas de virage du milieu : ajouter du zinc (réducteur de nitrate) et attendre quelques minutes, si virage du milieu au rouge, la bactérie est donc nitrate réductase positif ; si absence du virage (résultat négatif).

- Test sur milieu Kligler-Hajna

Une colonie caractéristique du milieu d'isolation est prélevée, puis repiquée sur gélose Kligler-Hajna. L'ensemencement de la pente se fait par une strie et le culot par une pique profonde à l'aide d'une anse stérile. Incubation à 37°C pendant 24h.

Lecture : - Pente rouge : lactose négatif.

-Culot jaune : glucose positif.

- Formation des bulles d'air : gaz positif.

- Apparition de coloration noire du culot : H<sub>2</sub>S positif.

Les colonies caractéristiques sont repiquées plusieurs fois, en stries sur milieu PCA puis incubées à 37°C pendant 24h, le repiquage se poursuit jusqu'à purification.

#### IV 2. 1. 2. 2. Identification des Cocci à Gram positive

##### a. Test catalase

La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif (Garnier et Denis, 2007 ; Reiner, 2010 ; Delarras, 2014 ; Zhang et al., 2020). La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante :



Technique : Sur une lame sèche et propre, nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée. A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, nous avons rajouté une colonie bactérienne puis l'observation se fait dans l'immédiat.

Lecture : La présence de l'enzyme se traduit par le dégagement de bulles gazeuses.

**b. Test coagulase**

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

La recherche de la Staphylocoagulase est le test essentiel qui permet de distinguer les souches potentiellement pathogènes, car la Staphylocoagulase joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des Staphylocoques, en leur permettant de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose (**Le loir et Gautier, 2010 ; Denis et al., 2016**).

Technique

- L'activité coagulase libre doit être mesurée à partir d'une culture sur milieu non inhibiteur.
- À l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et ensemencée dans un tube de bouillon cœur-cerveau (BHIB), puis incubé à 37°C durant 18 à 24h.
- Le substrat de cette enzyme est le plasma du lapin, à défaut nous avons eu recours à l'utilisation du plasma humain.
- On prélève ensuite 0,5 ml de chaque culture ajoutées à 0.5 ml du plasma humain dans des tubes stériles, puis l'incubation est faite à 37°C. La coagulation est examinée après 4 à 6h. Un témoin négatif est préparé en mélangeant le bouillon nutritif, non ensemencé, au plasma humain. Le témoin positif est réalisé, en utilisant la souche de référence ATCC 6538.

Lecture : Observation d'une prise en masse totale du plasma ou un caillot moins compact.

**c. Identification biochimique par galerie miniaturisée**

La galerie API (Analytical profil index), consiste en un système d'identification standardisé pour les différentes familles de bactérie. Elle est formée de 20 micro-tubes contenant le substrat du test biochimique déshydraté, inoculés par la suspension bactérienne préparée dans un milieu d'API-Staph (**Biomérieux, 2010**) (**Annexe XIV**). En outre, on avait choisi la galerie API-Staph pour l'identification de *Staphylococcus*.

## IV. 2. 2 Identification des levures et moisissures

### a. Examen macroscopique

Isolement sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol, incubation à 25°C pendant 24 à 48h.

Lecture : - Levure : colonies blanches crémeuses et lisses.

- Champignons : aspect macroscopique en recto et verso.

### b. Examen microscopique

Consiste en l'observation d'une goutte de suspension fongique, préparée avec 5ml de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique à grossissement x100.

- Levure : par test de Chlamydosporulation

Ce test consiste à ensemercer les levures sur milieux pauvres : PCB (Pomme de terre Carotte Bile) et Rice cream puis incubation à 25 à 28°C pendant 24 à 48h.

S'il y a des levures + pseudomycélium : genre *Candida*

S'il y a formation de mycélium ou pseudomycélium + chlamydozoïdes (spores terminales ou latérales, rondes ou ovales, d'une paroi épaisse à double contour) : *Candida albicans*.

- Champignons : Identification de la tête aspergillaire, conidies, conidiophore et la vésicule (pour le genre *Aspergillus*) ; de l'organisation des pinceaux et nombre de ramifications entre les spores et le conidiophore (pour le genre *Penicillium*).

Technique de scotch :

- Faire couper un morceau de scotch et l'appliquer sur la culture (croissance) fongique puis par la suite sur une lame.
- Pour une bonne observation microscopique ajouter une goutte de Bleu de Méthylène avant l'application de scotch sur la lame.

#### IV. 2 Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles du Coriandre, Thym et Menthe poivrée a été effectuée par le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau (**Pharmacopée européenne, 2007 ; Richter *et al.*, 2007 ; Kaloustain *et al.*, 2012 ; Bencheikh, 2017 ; Gavahian *et al.*, 2018 et Boukhatem *et al.*, 2019**). C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydro-distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

Pour obtenir une huile essentielle de qualité, l'artisan-distillateur respecte un cahier de charge rigoureux et utilise tout son savoir-faire pour recueillir la quintessence de la plante sans l'altérer.

L'installation semi-pilote d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau utilisée est une installation classique (**Figure 11**), comportant :

- Une chaudière, génératrice de vapeur d'eau.
- Un alambic en cuivre, comprenant une cucurbite et un col de cygne.
- Un condenseur tubulaire en cuivre, réfrigéré à l'eau et relié au col de cygne
- Un receveur (l'essencier) de distillat, placé dans un bain thermostat.

#### Protocole expérimentale

- Un poids de 20kg, 79kg et 175kg de la matière végétale (la partie aérienne de chaque plante ; Coriandre, Thym et Menthe poivrée respectivement), préalablement pesée, est répartie uniformément à l'intérieur d'un alambic de 2000L (en acier inoxydable), supportée par une grille perforée. L'eau est doucement chauffée pendant 30min et la vapeur d'eau venant de la chaudière, est introduite dans l'alambic à travers une conduite placée au-dessous de la grille.
- Le flux ascendant de vapeur traverse le lit de matière végétale et se charge des principes actifs et donc entraîne avec lui l'huile essentielle.
- Le mélange des vapeurs d'eau et d'huile arrive dans le condenseur où il est refroidi et condensé.
- Le distillat est recueilli dans le receveur (l'essencier) et sa température est maintenue à une valeur fixe à l'aide du bain thermostaté. L'huile essentielle est séparée de l'eau de ce distillat (hydrolat) par décantation. Les eaux de condensation accumulées au fond de

l'alambic sont périodiquement évacuées, afin d'éviter tout contact avec la matière végétale.

- La distillation doit s'effectuer à basse pression, entre 0,05 et 0,10 bars ; des suroxydations se produisant sous haute pression.
- La durée de distillation est entre 2h30min à 3h.
- Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses d'huile essentielle et de matière végétale séchée et exprimé en pourcent (%).

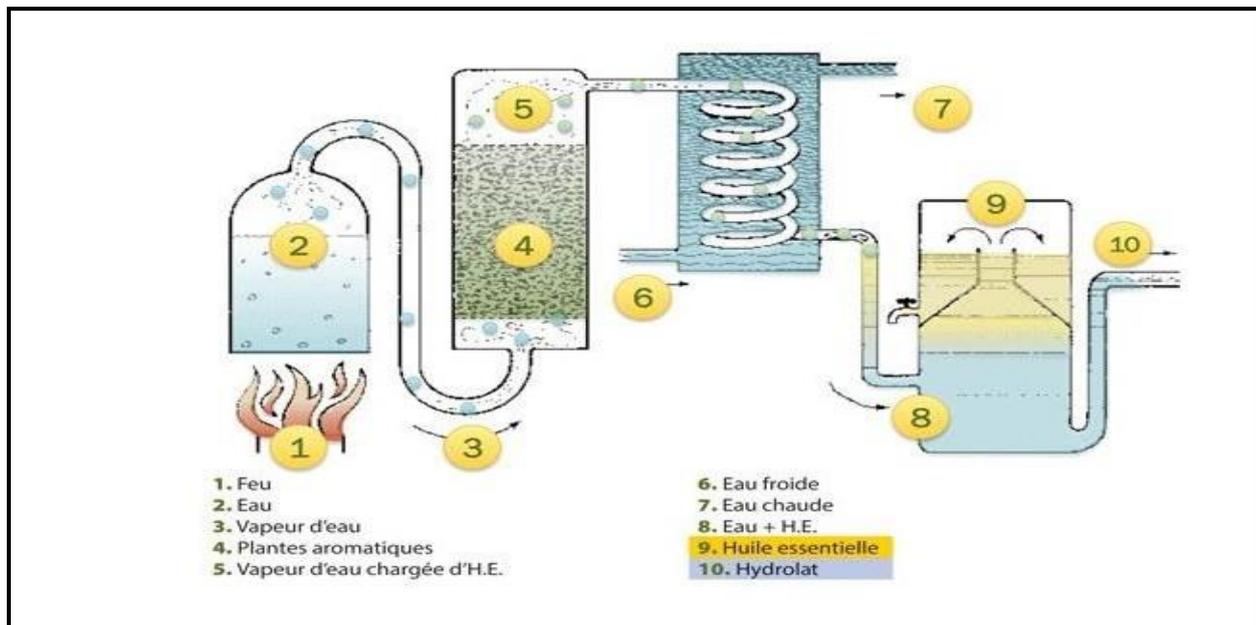
Selon la norme **AFNOR(1986)** et **Bouguerra (2012)**, le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pourcent(%).

$$\text{RHE} = \text{MHE} / \text{Mm}_{\text{vs}} \times 100$$

Avec : **RHE**: Rendement en huile essentielle (%).

**MHE**: Masse de l'huile essentielle (g).

**Mm<sub>vs</sub>**: Masse de la matière végétale sèche (g).



**Figure 11** : Procédé de distillation par entraînement à la vapeur d'eau (**Gavahian et al., 2018**).

### IV. 3. Application des huiles essentielles sur les germes isolés

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Thym, Coriandre et la Menthe poivrée *in vitro*, nous avons fait appel à deux méthodes complémentaires, en outre :

- Méthode 01 qualitative : Aromatogramme (diffusion sur disque).
- Méthode 02 quantitative : Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) (Contact direct par dilution en milieu solide).

#### a. Milieu de culture

- Ce sont des supports de culture dont la composition est minutieusement déterminée et contrôlée et dont l'intervenir avec les antibiotiques et/ou les huiles essentielles est reconnue en particulier en matière de diffusion, ceci permet d'éliminer toute interférence risquant de donner de faux résultats.
- Le milieu le plus utilisé est le milieu Muller-Hinton sous forme solide (gélifié) pour les souches bactériennes et le milieu (Sabouraud+Chloramphénicol) pour les souches fongiques (Gachkar *et al.*, 2008 ; Mayachiew et Devahastin, 2008 ; Hussain *et al.*, 2010).
- La gélose a été préparée à partir d'une base déshydratée selon les recommandations du fabricant (Annexe XII).
- Faire couler le milieu dans des boîtes de pétri. Laisser refroidir sur une surface plate, à une profondeur d'environ 4mm ; dont une boîte nécessite environ 25ml du milieu.
- Une fois la gélose solidifiée, sécher les boîtes pour une utilisation immédiate pendant 10 à 30min à 35°C en les plaçant en position verticale dans l'incubateur avec les couvercles inclinés (Vandepitte *et al.*, 1991).

#### b. Souches microbiennes testées

Les germes pathogènes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Thym, Coriandre et Menthe poivrée sont les suivantes :

- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*.
- *Escherichia coli*
- *Aspergillus niger*

➤ *Salmonella spp.*

➤ *Penicillium spp.*

### c. Ré-isolément des souches microbiennes

Afin d'obtenir des souches microbiennes pures et jeunes, des enrichissement réguliers ont été effectués par ensemencement des souches dans un milieu liquide (BHIB) et/ou Bouillon nutritive (BN) à 37°C pendant 18 à 24h, puis selon la méthode de stries avec une pipette pasteur sur un milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*, le milieu hektoen pour *Escherichia coli* et *Salmonella* et le milieu Sabouraud et/ou OGA pour *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Penicillium* à 37°C pendant 24h pour les souches bactériennes et à 25°C pendant 48h pour les souches fongiques.

### d. Préparation de la suspension microbienne

Selon les recommandations internationales, tout les aromatoigramme doivent être préparés à partir d'une culture pure et fraîche. La suspension bactérienne (inoculum) doit contenir un nombre bien déterminée de bactéries. Le nombre le plus retrouvé est de 0.5 Mc FARLAND ( $10^8$  UFC/ml). La préparation de la suspension se fait par :

- Prélever quelques colonies bactériennes (ou spores) à partir d'une culture jeune.
- L'introduire dans des tubes à essais contenant 5 ml d'eau physiologique stérile à (0.9% NaCl) et l'incuber pendant 2 à 3 heures à 37°C (**Mohammedi, 2006 ; Haddouchi et al., 2016**).
- Mesurer la turbidité de la suspension visuellement (Gamme étalon de turbidité) (**Annexe XIII**).

### e. Technique d'ensemencement

**Objectif d'ensemencement** : obtenir une concentration fixe et homogène de cellules bactériennes en contact avec les huiles essentielles permettant ainsi de tester son effets a différentes doses sur une même quantité de souche microbienne.

#### Technique de Kirby-Bauer (CLSI)

- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne ou fongique en le pressant fermement contre la paroi interne de tube, a fin de décharger au maximum.
- L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas, en stries

serrés afin de faire un étalement totale sur la gélose.

- L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, en faisant pivoter l'écouvillon sur lui-même, et en le passant sur la périphérie de la gélose pour finir l'ensemencement.
- Laisser sécher l'inoculum pendant quelques minutes à température ambiante avec le couvercle fermé (**Bauer et al., 1966**).

#### IV. 3.1 Etude de l'aromatogramme

##### a. Principe

La recherche de l'activité antimicrobienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des souches bactériennes isolées des produits alimentaires, soumises aux huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita* et *Coriandrum sativum*.

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

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces microbiennes, et d'avoir été largement évalué par 50 ans d'utilisation mondiale (**Beloud, 2003 ; Kheyar et al., 2014 ; Amara et al., 2017**). Il s'agit de mettre un disque de 6mm de diamètre imbibé d'huile essentielle au contact d'une gélose pré-ensemencée par la souche à tester (Figure 12).

##### b. Protocole expérimental

Dès le moment où le disque touche la gélose, la charge en molécule volatile (huile essentielle) qu'il contient diffuse de manière radiale.

Les disques doivent être imprégnés pendant 5min à des concentrations différentes dans des boîtes de pétri bien fermées.

Déposer les disques à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen sur la surface de la gélose Muller-Hinton préalablement ensemencées avec un espace d'au moins 20 mm centre à centre.

Des dilutions à des concentrations croissantes ce font pour chaque huile essentielle à raison de 180µl d'huile essentielle diluée avec de DMSO (v/v).

Pour chaque boîte de pétri, on dépose un seul disque au milieu de la boîte imbibé par différentes concentrations (**Haddouchi et al., 2016 ; Nadia Tadjeddine et al., 2020**):

- Le premier imprégné par l'huile essentielle pure 100%.
- Le deuxième par  $\frac{1}{2}$ , et donc dilution 50%.
- Le troisième par le  $\frac{1}{4}$ , et donc 25%.
- Le quatrième par le  $\frac{1}{8}$ , et donc 12,5%.
- Le cinquième par  $\frac{1}{16}$ , et donc 6.25%.

Disque imbibé par le DMSO pour confirmer la non activité sur les germes (Témoin négatif).

Disques d'antibiotiques (Ciprofloxacine et Gentamicine) comme témoin positif pour les souches bactériennes et Flucazole pour les souches fongiques.

La lecture ce faite pour chaque huile essentielle par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération microbienne à l'aide d'un pied à coulisse (**Baser et Buchabauer, 2010**).

### c. Interprétation

Plus l'huile essentielle est active sur la souche testée (souche sensible) plus le DZI est grand. L'inverse est vrai (souche résistante).

D'après **Ponce et al., (2003) ; Djabou et al., (2013)**, la sensibilité à l'huile essentielle sera classée par le diamètre des halos d'inhibitions (DZI) translucide (**Tableau VII**) :

**Tableau VII** : Classement des germes selon leur DZI (**Ponce et al., 2003 ; Djabou et al., 2013**)

DZI	Classement des germes
$D \leq 8\text{mm}$	Résistante (-)
$9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$	Sensible (+)
$15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$	Très sensible (++)
$D \geq 20\text{mm}$	Extrêmement sensible (+++)

Chaque point du diamètre d'inhibition correspond à une concentration en huile essentielle. Donc il existe une corrélation inverse entre le DZI et la concentration d'huile essentielle. Plus le DZI est élevé, plus la concentration active d'huile essentielle sur la souche testée est faible. L'inverse est vrai.

Et donc il s'agit d'une détermination indirecte de la concentration inhibitrice (CMI)

(Derwich *et al*, 2010).

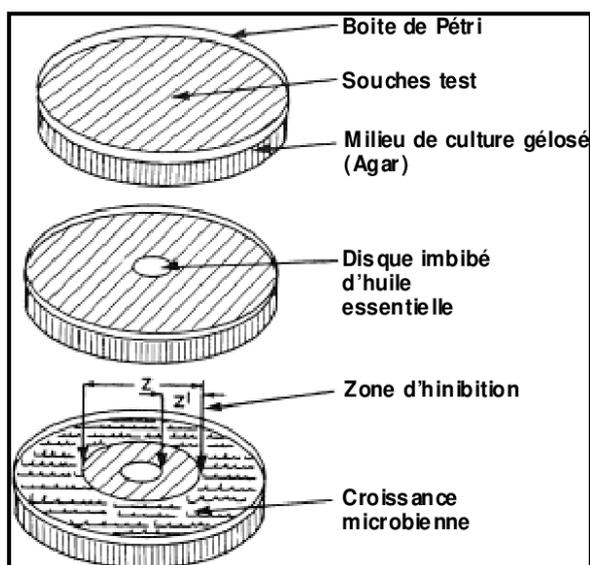


Figure 12 : Principe de la méthode d'aromatogramme (Boukhatem *et al.*, 2014)

#### IV. 3.2 Contact direct par dilution sur milieu gélosé solide

##### a. Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de la substance antimicrobienne inhibant toute la croissance bactérienne ou fongique visible après une incubation de 24h à 37°C et de 48h à 25°C respectivement (Martini et Eloff, 1998 ; Hamouda et Doumandji, 2017 ; Mahfouf *et al.*, 2017). En d'autres termes, c'est la concentration minimale d'huile essentielle qui produit une réduction

de plus de 90% de la croissance des colonies microbiennes, donc ne laisse survivre que 10% de la population (**Bouguerra, 2012**).

### **b. Protocole expérimental**

#### ➤ **Préparation de l'inoculum microbien**

A partir de culture jeune activée préalablement sur milieu spécifique, est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile, chacune sera ensuiteensemencée dans un tube contenant 10ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures. A partir de la dernière solution qui constitue l'inoculum de l'espèce microbien donné, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique sont effectuées ; allant à  $10^{-4}$  (**Menaceur, 2015**).

#### ➤ **Préparation des dilutions d'huiles essentielles de 2% à 0.03%**

Selon le protocole cité par **Menaceur (2015)** et quelques modifications ; on prépare une dilution d'huile essentielle à 2%, en diluant 0.9 ml d'huile essentielle pure (100%) dans 45 ml de milieu Muller-Hinton (MH) (pour les bactéries) ou Sabouraud (SAB) (pour les levures et moisissures) liquide additionné de 0.9 ml de Tween 80° stérile dans le premier flacon de 180 ml. On réalise par la suite des dilutions de  $\frac{1}{2}$  au  $\frac{1}{2}$  en versant la moitié de la dilution 2% (23 ml) de milieu ce qui donne la dilution 1%. On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%. Faire couler chaque dilution dans les boîtes de pétri, laisser solidifier. Déposer un spot à la surface de la gélose au moyen d'une micropipette chaque suspension microbienne à raison de 5µl.

- Témoin positif : contenant que le milieu (MH ou SAB) additionné de Tween 80° avec 5µl d'inoculum (doit être prévu pour chaque série de dilution d'Huile essentielle).
- Témoin négatif : contenant que le milieu (MH ou SAB) additionné de Tween 80° est également prévu.

### **c. Incubation**

Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons et levure.

#### d. Lecture et interprétation

La lecture des résultats se fait à l'œil nue, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice des huiles essentielles, se traduisant par l'absence de toute croissance microbienne visible.

### IV. 4. Application des huiles essentielles sur des denrées alimentaires

Le but de cette manipulation est d'étudier la possibilité d'utilisation des huiles essentielles extraites des plantes de *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* et *Coriandrum sativum* dans la conservation d'un produit alimentaire animal ; en l'occurrence la viande hachée de bœuf, ainsi qu'un produit laitier dont le fromage frais, afin de limiter sa durée d'altération. Elle a été réalisée selon la méthode décrite par **Bouzidi, (2016)**.

Selon les travaux faites par **Fernandez et al. (2012)** et **Vouillomoz et al. (2020)** et d'autres auteurs, nous avons choisi la viande grâce à l'utilisation des huiles essentielles du Thym et de Coriandre comme des agents de saveur, d'arôme et de conservation. Tandis que le produit laitiers par rapport à l'efficacité d'huile essentielle de menthe poivrée dans leur contrôle microbiologique.

#### 1. Protocole expérimentale

On peut résumer ce test dans les étapes suivantes :

- Préparation des échantillons.
- Contrôle des caractéristiques sensorielles et physico-chimique (pH).
- Contrôle microbiologique.

##### a. Préparation des échantillons

Une quantité de 300g de chaque denrée (viande hachée achetée chez un bouché local de la ville de « 13mai » et le fromage frais de chez un fromager de « Hammam malouan » de la Wilaya de Blida) préparés avec et sans inoculation des bactéries pathogènes.

##### ❖ Préparation sans inoculation bactérienne

- Diviser l'échantillon en trois parties de 100 g et les placer dans des récipients stériles.
- Chaque partie est mélangée avec un volume approprié de l'une des trois huiles

essentielles (10 à 30  $\mu$ l) par un homogénéisateur du type « Stomacher » pour bien répartir la distribution de l'huile à travers le produit.

- Laisser une partie sans aucun traitement (témoin).
- Les échantillons seront ensuite placés dans des boîtes de conserve stériles de 9 cm de diamètre et conservés à une T° de réfrigération (4°C).
- Pour déterminer l'efficacité conservatrice des huiles essentielles (H.E.) sur les denrées, des analyses microbiologiques sont effectuées en présence et en absence des huiles au 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pendant une durée globale de conservation de sept (07) jours a été mesurée.

#### ❖ Préparation avec inoculation bactérienne

- Après division des échantillons, le produit alimentaire contenant de l'huile essentielle a été inoculé par la bactérie pathogène correspondante (0.8 ml). L'ensemble sera homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur « Stomacher ».
- Les échantillons témoins (contrôles) ont été traités avec de l'eau distillée stérile en présence de la souche pathogène et conservés dans les mêmes conditions précédentes.
- Pour déterminer l'efficacité inhibitrice des H.E. sur les bactéries pathogènes présentes dans la viande, des analyses microbiologiques sont effectuées pour suivre la cinétique microbienne de chaque espèce en présence et en absence d'H.E.
- Mesurer la cinétique microbienne de chaque espèce au 1<sup>er</sup>, 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pendant une durée globale de conservation de sept (07) jours a été mesurée.

### **b. Contrôle des caractéristiques sensorielles et du pH**

#### **b. 1. Appréciation organoleptiques**

Les principaux éléments utilisés dans cette évaluation sont : La couleur, l'odeur anormale et l'aspect.

#### **b. 2. Mesure du pH**

Une quantité de 10g de chaque denrée alimentaire est mélangée avec 90ml d'eau distillée, puis homogénéisé. Le pH de l'échantillon est déterminé après une heure en utilisant

un pH-mètre numérique où son électrode a été insérée directement dans l'échantillon. La valeur est lue directement sur l'écran de l'appareil (Owusu-Kwarteng et al., 2012).

### c. Contrôle microbiologique

Le but de cette manipulation est d'évaluer l'effet de l'huile essentielle sur la conservation de la viande hachée et du fromage frais. Cette évaluation repose sur le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile qui se trouve dans de la viande hachée pendant la période d'incubation, la flore de contamination (coliformes totaux et fécaux, *Staphylococcus aureus*, Salmonella, spores aérobies sulfite-réducteurs « ASR » et levure et moisissures) selon les recommandations du JORA (Annexe XIX).

## IV. 5. Analyse statistique

Nous avons réalisé des tests paramétriques basés sur l'analyse de variance (ANOVA). En tenant compte des faibles effets et des variances de conditions d'exposition d'une manipulation à une autre, l'intervalle de confiance pour une différence de moyenne est fixé à 95% pour toutes les comparaisons à l'aide du logiciel STATISTICA au seuil de ( $P < 0,05$ ) par un test de Student.



**CHAPITRE III**  
**Résultats et discussion**

## 1 Résultats

Au cours de cette présente étude, un nombre de 130 échantillons sont reçus de diverses régions de la Wilaya de Blida pour lesquels une intoxication est suspectée. Dont 94 échantillons se sont révélés négatifs, soit 72,30% de bonne qualité et de 36 échantillons se sont montrés positifs, soit 27,69% de mauvaise qualité (**Tableau VIII**).

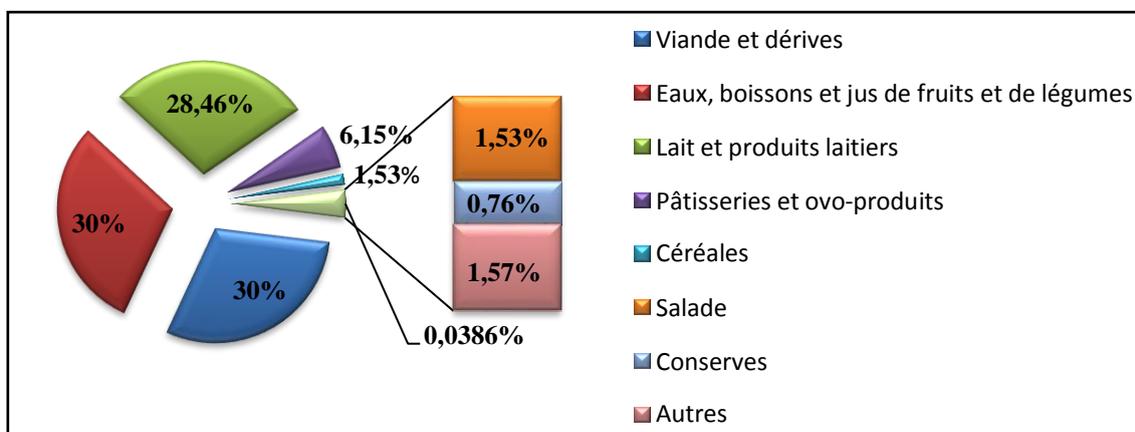
En Juin 2021, deux cas d'intoxication alimentaires ont été révélées, dont une le jour d'examen finale de cinquième par un plat cuisiné contaminé (riz et poulet), et l'autre une intoxication familiale suite à la consommation d'un pain brioché à la crème.

**Tableau VIII:** Résultats globaux des échantillons analysés selon la qualité.

Echantillons \ Qualité	BONNE	MAUVAISE	TOTALE
Nombre (Echantillons)	94	36	130
Pourcentage (%)	72.30	27.69	100

### 1.1 Fréquence des échantillons analysés

La denrée alimentaire analysée est majoritairement de la catégorie de viande et dérivés parallèlement avec la catégorie d'eaux, boissons et jus de fruits et de légumes (30%), par la suite le lait et produits laitiers (28,46%) et la catégorie des pâtisseries et ovo-produits (6,15%). Le reste des échantillons été de divers autres catégories et y n'ont montré que de faible fréquence (**Figure 13**).



**Figure 13 :** Fréquence des échantillons analysés

## 1.2 Profil bactériologique des germes isolés

Le contrôle microbiologique des denrées alimentaires a permis d'isoler 48 souches microbiennes à signification contaminants, dont 15 souches fongiques réparties entre des levures et moisissures soit 31,25%, 33 souches bactériennes soit 68,75% dont les *Entérobactéries* sont les plus incriminés à 54,16% (25 souches de *Escherichia coli* et une de *Salmonella*), suivie de *Staphylococcus aureus* à 14,58% (07 souches) et aucune présence de *Claustidium perfirengens*.

## 1.3 Répartition des germes isolés selon la denrée alimentaire analysée

D'après les résultats de la fréquence des échantillons analysés et la répartition globale des germes isolés, nous avons observé qu'*Escherichia coli* est l'espèce la plus isolée représentant 52,08% des isolats de viandes, charcuterie et de produits dérivés à une fréquence de 30% (Tableau IX).

**Tableau IX :** Répartition des germes isolés selon la denrée alimentaire analysée

Denrée Alimentaire analysé	Germes recherchés	Espèces (Germes retrouvés)	Nombre	Pourcentage (%)
Viande	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> </ul>	<i>E. coli</i>	25	52.08
Produits de Charcuterie à base de viande	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Claustidium perfirengens</i></li> </ul>			
Lait et produits laitiers	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• Coliformes totaux</li> <li>• Germes aérobies à 30°C</li> </ul>			
Boissons	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levure et moisissures</li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> </ul>			
Pâtisseries et ovoproduits (Mille-feuilles)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Claustidium perfirengens</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• Germe aérobie à 30°C</li> </ul>	<i>S. aureus</i>	07	14.58
Charcuterie (Saucisse)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Claustidium perfirengens</i></li> </ul>			

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> </ul>			
Viandes rouges et dérivés (Viandes séparées mécaniquement)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• Germes aérobie à 30°C</li> </ul>	<i>Salmonella</i>	01	02.08
Eaux, boissons et jus de fruits et de légumes (Charbat)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levure et moisissures</li> <li>• <i>Staphylocoque à coagulase+</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• Germe aérobie à 30°C</li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> </ul>	Levure et Moisissures	15	31.25
Intoxication par le plat cuisiné	/	<i>E. coli</i> et Entérobactéries	/	/
Intoxication par le pain brioché	/	<i>S. aureus</i>	/	/
<b>Totale</b>			<b>48</b>	<b>100</b>

## 1.4 Identification des germes isolés

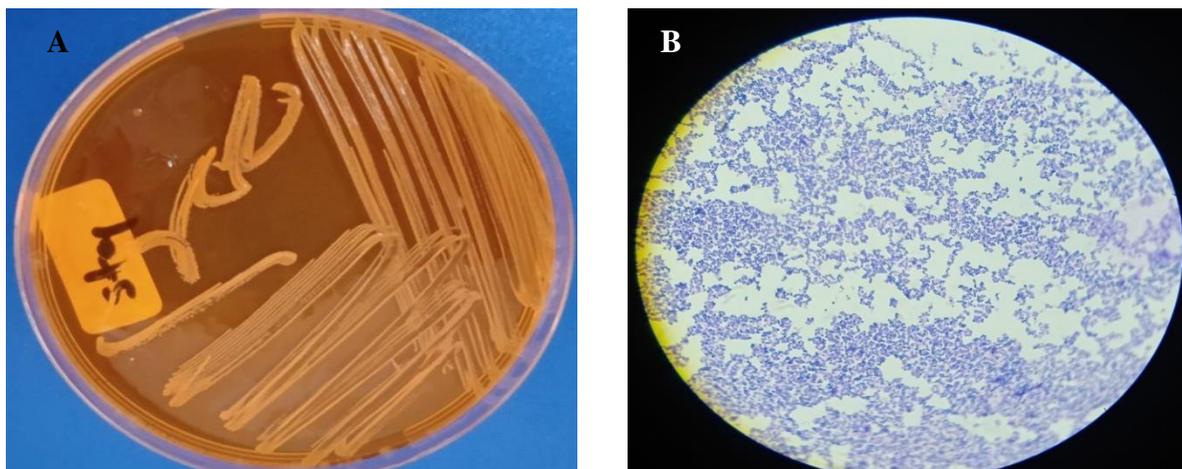
### 1.4.1 Identification morphologiques

Le **Tableau X** et les figures (14, 15, 16, 17, 18, 19) montrent les caractères morphologiques des souches isolées à partir des échantillons analysés.

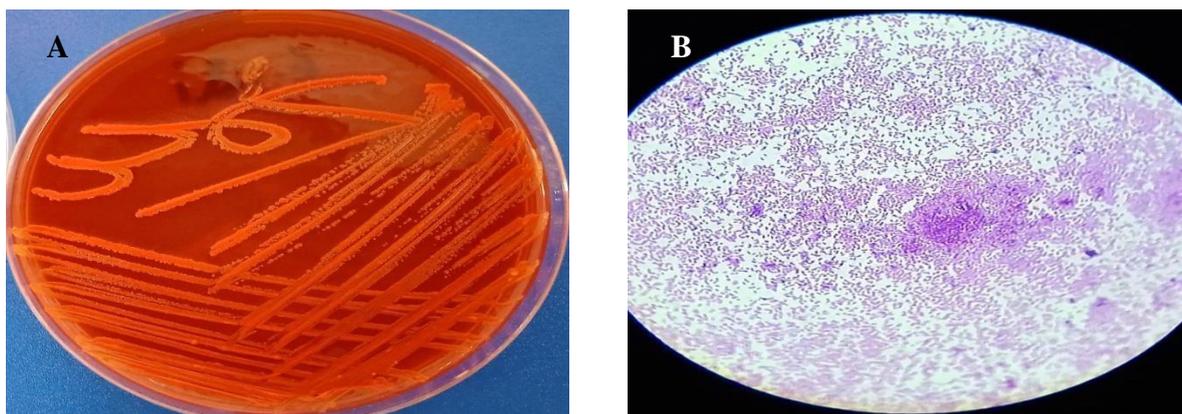
**Tableau X** : Caractères morphologiques des germes isolés

Espèce	Caractères morphologiques	
	Microscopique	Macroscopique
<b>Souches bactériennes</b>		
<i>E. coli</i>	Gram (-) Bacille Mobile	-Colonies arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre. -Sur milieu Hektoen (colonies saumon) et sur gélose nutritive (colonies blanches)
<i>S. aureus</i>	Gram (+), Immobile Coques arrondis en amas réguliers (grappes de raisin)	Colonies petites, arrondies, lisses, dorées, brillantes, pigmentées en jaune, opaques, entourées d'une zone transparente
<i>Salmonella</i>	Bacille, Gram (-) Immobile	Sur milieu Hektoen : Colonies arrondies verte (couleur du milieu) avec ou sans centre noir.
<b>Souches fongiques</b>		

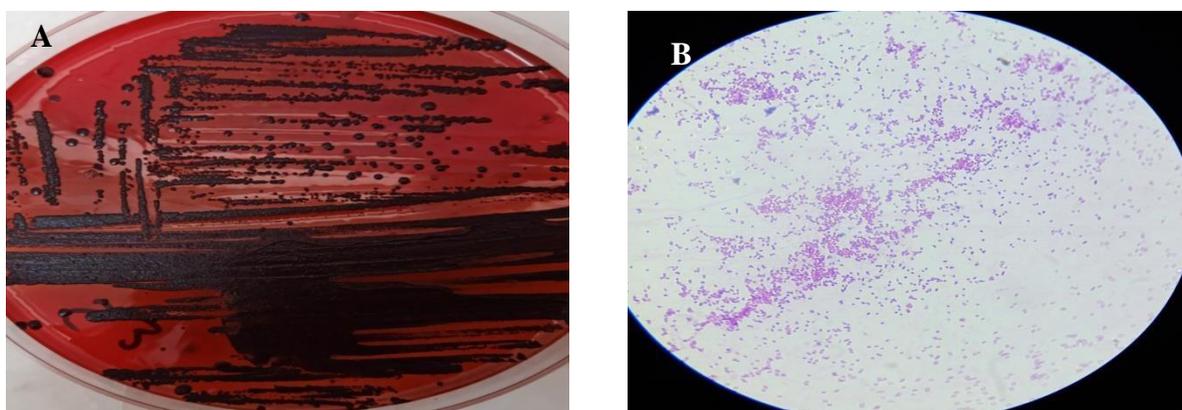
<i>Aspergillus niger</i>	Tête aspergillaire, radié bisériée	Recto : aspect granuleux blanc puis jaune puis noirâtre
	Conidiophore : long, large, lisse, incolore à jaune brun	Verso : incolore à jaune pale
	Vésicule : sphérique de petite taille Conidies : grosses, globuleuses, brunes, échenillées	
<i>Candida albicans</i>	Petites cellules rondes ou ovalaires, bourgeonnantes accompagnées de filaments mycéliens	Petites colonies blanches, crémeuses, brillantes
<i>Penicillium</i>	Aspect de pinceau verticillé, long conidiophores suivie de métule, portant des phialides qui libèrent des conidies (conidiospores)	Recto : colonies de couleur gris bleu à gris vert duveteuses et poudreuse
		Verso : jaune pale



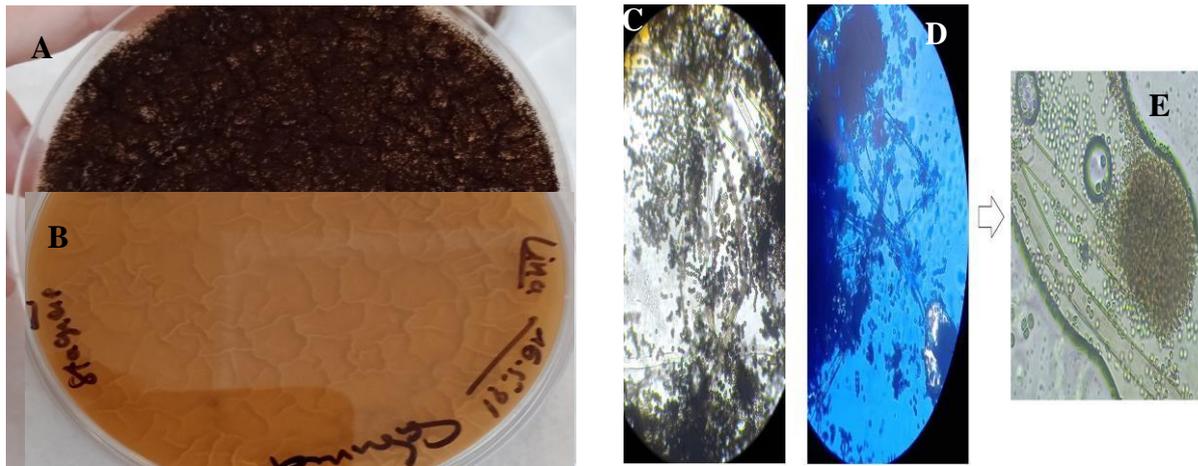
**Figure 14 :** (A) Observation macroscopique des colonies de *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman après 24h d'incubation à 37°C. (B) Observation microscopique de cocci Gram positif en amas à partir de culture solide de *Staphylococcus aureus* par microscope optique, grossissement x40



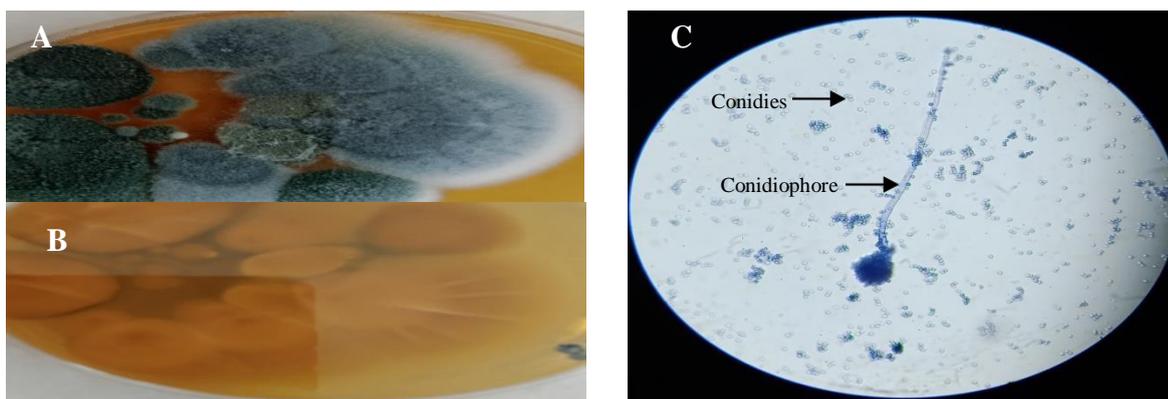
**Figure 15:** (A) Observation macroscopique des colonies de *Escherichia coli* sur milieu Hektoen après 24h d'incubation à 37°C. (B) Observation microscopique de bacille Gram négatif à partir de culture solide de *E. coli* par microscope optique, grossissement X40.



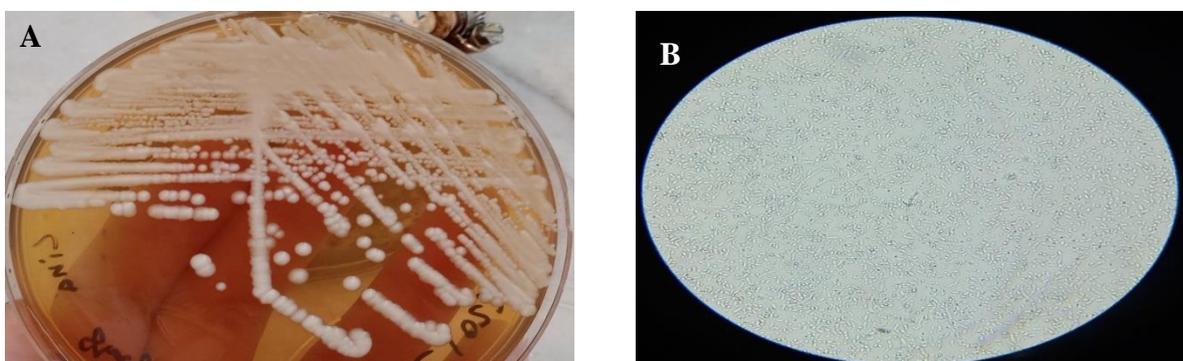
**Figure 16:** (A) Observation macroscopique des colonies de *Salmonella* sur gélose XLD après 24h d'incubation à 37°C. (B) Observation microscopique de bacille Gram négatif à partir de culture solide de *Salmonella* par microscope optique, grossissement X40.



**Figure 17 :** (A) Observation macroscopique du Recto d'*Aspergillus niger* sur milieu Sabouraud + chloramphénicol après 72h d'incubation à 25°C. (B) verso d'*A. niger*. (C) Observation microscopique d'état frais de spores d'*A. niger*. (D) d'état frais coloration avec bleu de méthylène. (E) la tête aspergillaire par microscope optique, grossissement X40 X100 respectivement.



**Figure 18:** (A) Observation macroscopique du Recto de *Penicillium*. (B) Verso sur milieu Sabouraud+Chloramphénicol après 72h d'incubation à 25°C. (C) Observation microscopique d'état frais avec coloration au bleu méthylène de *Penicillium* par microscope optique, grossissement X100.



**Figure 19:** (A) Observation macroscopique des colonies de *Candida albicans* sur milieu Sabouraud+Chloramphénicol après 48h d'incubation à 25°C. (B) Observation microscopique d'état frais de *C. albicans* par microscope optique, grossissement X100.

### 1.4.2 Identification biochimique

Le Tableau XI représente les résultats de galerie classiques des souches bactériennes isolées à partir des échantillons d'origine alimentaire altérée (**Annexes XIV, XV et XVI**).

**Tableau XI** : Résultat de la galerie biochimique classique

Espèce	Gram	Galerie biochimique classique							
		ONPG	Urée indole	Citrate de Simmons	Mannitol Mobilité	TSI	LDC	ADH	Bouillon nitraté
<i>Escherichia coli</i>	-								
		+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coagulase			Catalase		Mannitol		
		+			+		+		
<i>Salmonella</i>	-	ONPG	Urée Indole	Citrate de Simmons	Mannitol Mobilité		TSI		
		-	-	-	+		+		

(-) : négatif / (+) : positif

## 1.5 Activité antimicrobienne

### 1.5.1 Rendement

L'huile essentielle a été extraite à partir des deux plantes séchées du thym et menthe poivrée à l'air libre et à l'abri de la lumière, et ceci par entraînement à la vapeur d'eau. Nous avons obtenue une huile essentielle de couleur jaune brun d'une odeur forte épicée pour le *Thymus vulgaris* alors que l'huile essentielle de *Mentha piperita* a donné une huile incolore d'une odeur forte mentholé. Néanmoins l'extraction à partir de *Coriandrum sativum* n'a donné aucun résultat en deux fois d'essais.

Le rendement en huile essentielle le plus important a été enregistré pour la menthe poivrée avec une quantité de 1,4%, suivi du thym avec un rendement de 1,3% (**Tableau IV**). Les rendements en huiles essentielles varient selon l'espèce, la provenance et le stade de développement de la plante (**Benabdallah, 2017**).

**Tableau XII** : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles obtenues

Caractéristiques Organoleptiques + Rendement	Espèce		Référence Norme (AFNOR, 2000)	
	Menthe Poivrée ( <i>Mentha piperita</i> )	Thym ( <i>Thymus vulgaris. L</i> )	Menthe Poivrée (+LOBSTEIN et al., 2016)	Thym
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile et limpide	Liquide	Liquide mobile et limpide
Odeur	Forte Mentholée Caractéristique Herbacée	Forte Epicée Pénétrante	Forte Mentholée Caractéristique	Epicée rappelant celle du thymol
Couleur	Incolore	Jaune brun	Incolore à Jaune pâle ou Jaune vert pâle	Jaune à Brun rouge
Saveur	Rafrâchissante	aromatique	Rafrâchissante	aromatique
Rendement (%)	1,4	1,3	/	/

### 1.5.2 Méthode qualitative, Aromatogramme (diffusion sur disque)

La technique de diffusion sur disque a été utilisée pour l'ensemble des 06 souches microbiennes, ce test préliminaire nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien des trois huiles essentielles.

Les résultats résumés dans le **Tableau XIII**, révèlent une importante activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris L.* sur la plupart des souches testées. Les diamètres de la zone d'inhibition les plus élevés ont été remarqués sur *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger* avec des valeurs de 68mm et 54mm respectivement (**Annexe XVII et Annexe XVIII**). Une action microbienne modérée a été observée sur le reste des souches, à l'exception de *Penicillium sp.* qui a montré une activité non déterminée et une certaine résistance.

Les deux autres huiles essentielles de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et de la coriandre (*Coriandrum sativum*) ont montré un pouvoir antimicrobien plus faible que la précédente, seuls les souches de *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* qui ont été presque résistantes à l'huile essentielle de coriandre à une concentration de 6,25% à des valeurs de 15mm, 12mm et 12mm respectivement. Tandis que les deux souches fongiques (*Aspergillus*

*niger* et *Candida albicans*) sont fortement résistantes, alors que *Candida albicans* est résistante à l'huile essentielle de la menthe poivrée à une concentration de 6,25% avec une valeur de 7,5mm.

**Tableau XIII:** Diamètres des zones d'inhibition (DZI) des six souches étudiées vis-à-vis les trois huiles essentielles

Souches microbiennes	Gram	Concentrations (%)	Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
			HET	HEM	HEC
<b>Souches bactériennes</b>					
<i>Escherichia coli</i>	-	100	45	37	43
		50	36,5	31	34,5
		25	36	25	27
		12,5	34	22	20
		6,25	22	19	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	100	60	70	67
		50	52	40	29
		25	45	28,5	15
		12,5	40	22	14
		6,25	34	16	12
<i>Salmonella</i>	-	100	47	24	49
		50	38	23	30
		25	30	21,5	20
		12,5	24	20	17
		6,25	19	14	12
<b>Souches fongiques</b>					
<i>Aspergillus niger</i>		100	56	45	59
		50	54	43,8	55
		25	51	29	27,5
		12,5	46	13	09
		6,25	39	09	00
<i>Candida albicans</i>		100	46	55	47
		50	45	50	44
		25	42	23	18
		12,5	34,9	12	14,5
		6,25	34	7,5	00
<i>Penicillium sp.</i>		(100 - 6,25)	ND	ND	ND

L'activité antimicrobienne a été témoinnée par des antibiotiques (Gentamicine, Chloramphénicol) pour les bactéries dont le diamètre des zones d'inhibition est de 21mm pour *Salmonella* et 26mm, 24mm pour *S. aureus* et 19,5mm, 26mm pour *E. coli* respectivement, et (Fluconazole, Cotrimoxazole et Amphotricine B) pour la levure et le champignon. Dont ces derniers ont été fortement résistants aux antifongiques (**Annexe XVII**).

### 1.5.3 Méthode quantitative

Les concentrations minimales inhibitrices ont été déterminées par la méthode de contact direct en milieu solide, pour les souches qui ont présenté une importante sensibilité. La gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 2% à 0.03%. Les valeurs sont listées dans le Tableau XIV.

En revanche, en présence de l'huile essentielle de la coriandre, l'ensemble des souches bactériennes ont été inhibées à une concentration de 0,25%, alors que la CMI de la menthe poivrée et le thym vis-à-vis *S. aureus* et *Salmonella* sont plus faibles de 0,25% et 0,125% par rapport à *E. coli* a une valeur de 0,5% et 0,06%, respectivement.

*Candida albicans* demeure le germe le plus sensible avec une CMI de 0,25%, suivi par *Asergillus niger* (0.5% vis-à-vis les huiles essentielles du thym et menthe poivrée et 0,25% vis-à-vis huile essentielle de coriandre).

**Tableau XIV** : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des cinq souches étudiées vis-à-vis les trois huiles essentielles

Souches microbiennes	Gram	Concentrations (%)	Pourcentage d'inhibition (%)		
			HET	HEM	HEC
<b>Souches bactériennes</b>					
<i>Escherichia coli</i>	-	2	-	-	-
		1	-	-	-
		0,5	-	-	-
		0,25	-	+	-
		0,125	-	+	+
		0,06	-	+	+
		0,03	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>		2	-	-	-

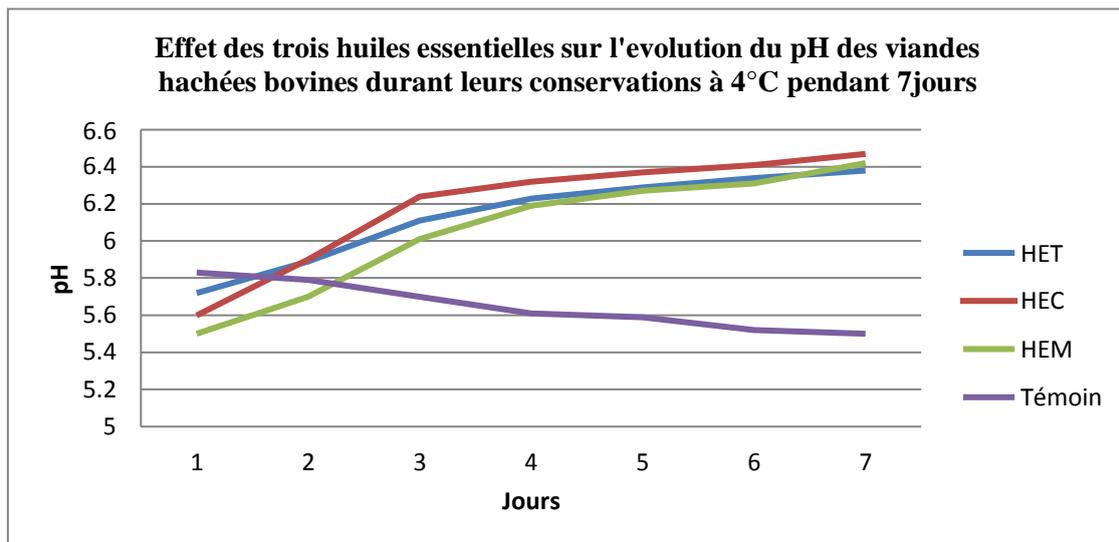
	+	1	-	-	-
		0,5	-	-	-
		0,25	-	+	-
		0,125	-	+	+
		0,06	+	+	+
		0,03	+	+	+
<hr/>					
<i>Salmonella</i>		2	-	-	-
		1	-	-	-
	-	0,5	-	-	-
		0,25	-	-	-
		0,125	-	+	+
		0,06	+	+	+
		0,03	+	+	+
<hr/>					
<b>Souches fongiques</b>					
<hr/>					
<i>Aspergillus niger</i>		2	-	-	-
		1	-	-	-
		0,5	-	-	-
		0,25	+	+	-
		0,125	+	+	+
		0,06	+	+	+
		0,03	+	+	+
<hr/>					
<i>Candida albicans</i>		2	-	-	-
		1	-	-	-
		0,5	-	-	-
		0,25	-	-	-
		0,125	+	+	+
		0,06	+	+	+
		0,03	+	+	+

## 1.6 Application des huiles essentielles dans des denrées alimentaires

### 1.6.1 Cas de la viande hachée bovine

#### 1.6.1.1 Effet sur le pH

L'évolution du pH au cours de la conservation des viandes hachées supplémentées ou non est présentée dans la figure 20 (**Annexe XX**).



**Figure 20 :** Effet des trois huiles essentielles sur l'évolution du pH des viandes bovines hachées durant leurs conservations à 4°C pendant 7 jours. Avec : HET (huile essentielle du thym) ; HEC (huile essentielle de coriandre) ; HEM (huile essentielle de menthe poivrée)

La variation du pH au cours du temps est statistiquement hautement significative ( $p < 0,01$ ) pour les échantillons HEC, HET et HEM. Nous avons remarqué que le pH diminue de  $5,83 \pm 0,04$  à  $5,50 \pm 0,04$  pour les viandes témoin, et pour les échantillons supplémentés des huiles essentielles de coriandre, thym et menthe poivrée, ou le pH atteint dans le 7<sup>ème</sup> jour est de 6.47, 6.42 et 6.38 respectivement. D'après la Figure 20, nous avons remarqué une légère augmentation du pH pour les échantillons additionnés de trois huiles essentielles au cours de la durée de conservation (7 jours).

### 1.6.1.2 Analyse des caractéristiques organoleptiques

L'analyse sensorielle des viandes hachées supplémentées des huiles essentielles du thym, menthe poivrée et coriandre ont montré qu'après 24h de conservation à 4°C, une odeur caractéristique selon l'huile essentielle testée, tandis qu'une faible odeur désagréable a été présentée au cours du 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour de conservation. La couleur a été significative à la couleur de la viande après 24h de conservation, alors qu'après 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour un virage de couleur en vers s'est présenté avec un aspect un peu moelleux et présence d'exsudat au dernier jour.

### 1.6.1.3 Analyse microbiologique

Un suivi microbiologique a été effectué dans l'objectif d'évaluer l'effet des huiles essentielles du thym, menthe poivrée et coriandre, à des doses de 15 $\mu$ l, sur la qualité microbiologique des viandes hachées bovines au cours de leur conservation à 4°C. Les flores dénombrées sont la flore mésophile aérobie totale (FTAM) et les entérobactéries au cours du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de conservation en comparaison avec le témoin (Tableau XV) (Annexe XX).

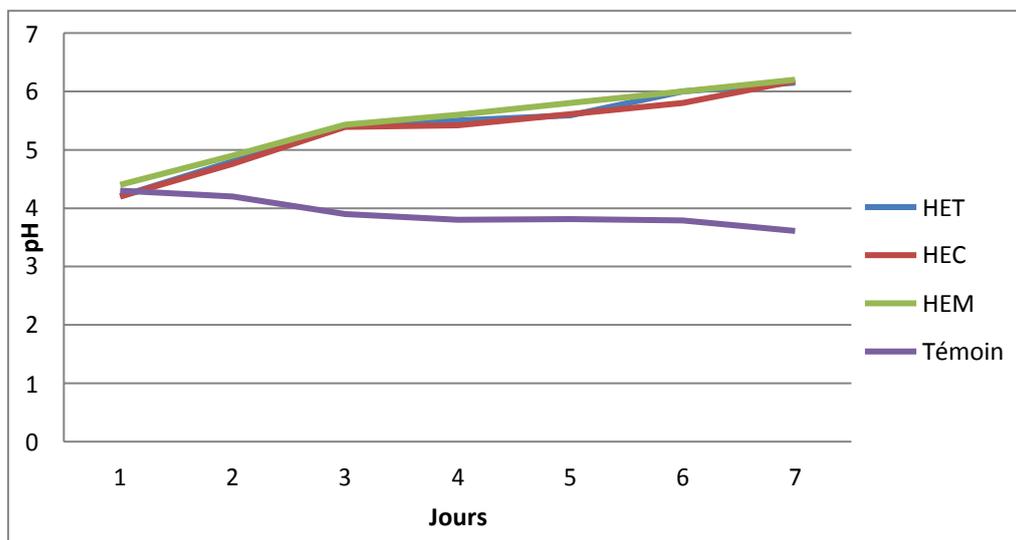
**Tableau XV** : Résultats d'analyse microbiologique des viandes hachées.

	1er	3ème	7ème
<b>Viande hachée</b>	FTAM Entérobactéries	+/-	-
<b>Témoin</b>	FTAM (<5 $\times$ 10 <sup>5</sup> ) Entérobactéries (< 10 <sup>4</sup> )	Indénombrable	

### 1.6.2 Cas de fromage frais

#### 1.6.2.1 Effet sur le pH

L'évolution du pH au cours de la conservation de fromage frais supplémentées ou non est présentée dans la figure suivante (**Figure 21**) (Annexe XX).



**Figure 21** : Effet des trois huiles essentielles sur l'évolution du pH de fromage frais durant leurs conservations à 4°C pendant 7 jours. Avec : HET (huile essentielle du thym) ; HEC (huile essentielle de coriandre) ; HEM (huile essentielle de menthe poivrée).

### 1.6.2.2 Appréciation organoleptique

L'analyse sensorielle des fromages frais supplémentés des huiles essentielles du thym, menthe poivrée et coriandre ont montré une très forte odeur caractéristique selon l'huile essentielle testée après 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jour, tandis qu'au 7<sup>ème</sup> jour une très faible odeur de fromage s'est montrée. Alors que l'aspect et la couleur n'a pas été changée durant toute la période de conservation (7 jours).

### 1.6.2.3 Analyse microbiologique

Un suivi microbiologique a été effectué dans l'objectif d'évaluer l'effet des huiles essentielles du thym, menthe poivrée et coriandre, à des doses de 15µl, sur la qualité microbiologique de fromage frais au cours de leur conservation à 4°C. Les flores dénombrées sont la flore mésophile aérobie totale (FTAM) et les entérobactéries au cour du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de conservation en comparaison avec le témoin (Tableau XVI) (Annexe XX).

**Tableau XVI** : Résultats d'analyse microbiologique de fromage frais.

		1er	3ème	7ème
<b>Fromage frais</b>	FTAM Entérobactéries		+/-	-
<b>Témoin</b>	FTAM (<5× 10 <sup>5</sup> ) Entérobactéries (< 10 <sup>4</sup> )		Indénombrable	

## 2 Discussion

Plusieurs études menées dans le cadre de la surveillance sanitaire des denrées alimentaires, ont montré que les bactéries *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont parmi les principaux agents pathogènes responsables d'intoxications alimentaires.

Ces dernières ont été isolées de denrées alimentaires incriminées dans les toxi-infections alimentaires, purifiées, identifiées et entretenues par repiquage sur milieu nutritif gélosé a fin d'évaluer leurs résistance vis-à-vis les trois huiles essentielles testées.

L'entraînement à la vapeur d'eau de la partie aérienne de *Mentha piperita* de la région de Bejaia a fourni le rendement le plus élevé (1,4%) non seulement en comparaison avec le

thym mais aussi avec la même espèce de l'autre région ; celle de **Goudjil (2016)** de la région de Ain Moussa avec un taux de 0,84% et de **Benabdallah (2017)** de la région de Constantine avec un taux de 1%, et de **Moghaddam et al. (2013)** de l'Iran avec le pourcentage de 1.38% qui cohérent avec nos résultat. Les études de **Beldet (2015)** ont présenté un taux inférieur à 0,45%, ce qui confirme de la région d'origine influe fortement la sécrétion de l'huile d'une plante aromatique, notant que l'extraction a été réalisée par hydro-distillation.

Par contre, le rendement en huile essentielle extraite du *Thymus vulgaris* est de 1,3%, cette valeur se rapproche de celle rapportée par **Aomari et Sehaki (2018)**.

Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs en même temps ; d'une part à la drogue utilisée et donc aux pratiques culturelles, mais aussi aux facteurs climatiques et environnementaux, à l'intensité du métabolisme de plante, à savoir l'espèce, l'âge et la période de la cueillette. Néanmoins important est la situation géographique (**Bennadja et al., 2013**).

Les trois huiles essentielles sont considérées comme bactériostatiques, en présentant des zones d'inhibitions importantes vis-à-vis les cinq souches microbiennes à l'exception de *Penicillium*.

L'huile essentielle du thym (*Thymus vulgaris*) a enregistré un diamètre moyen des zones d'inhibitions des huiles brutes testées varie de [21mm à 70 mm] ; ce qui permet de qualifier d'excellente l'activité de nos huiles sur 95% des souches considérées.

Cependant, ces résultats sont meilleurs par rapport à ceux rapportés par certains auteurs dont les diamètres moyens des zones d'inhibition des huiles essentielles de plusieurs espèces de thym se situent dans un intervalle de [13,3mm à 35,6mm] (**Rasooli et al., 2002 ; Dob et al., 2006 ; Rota et al., 2008 ; Maksimavic et al., 2008 ; Haddouchi et al., 2009**).

L'analyse comparative des résultats entre les différents groupes physiologiques de la microflore testée laisse apparaitre des comportements variables. Ainsi, pour les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* l'intervalle de variation des diamètres des zones d'inhibition est de [12 mm à 49 mm]. Par ailleurs, nous avons noté une conduite variable des différents sous-groupes de cette famille. D'autre part, nos résultats sont meilleurs par rapport à ceux obtenus lors d'une étude menée par **Saidali et al. (2014)**, où quelques souches de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*,

*Citrobacter*, *Salmonella* et *E. coli*) se sont montrées moyennement sensibles à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec des diamètres des zones d'inhibition variant de 10 à 15mm.

L'huile essentielle du thym atteste d'une activité efficace contre la bactérie *Escherichia coli*, qui est répandu dans les aliments avariés, provoquant des troubles intestinaux et de graves diarrhées. Cette huile a montré une efficacité statistiquement significative contre *Escherichia coli*, parallèlement avec le témoin positive (Gentamicine et Ciprofloxacine) à des zones de 19,5 mm et 26mm respectivement.

En revanche, *Salmonella* possède un potentiel de résistance un peu plus élevé par rapport aux autres espèces suite aux faibles zones d'inhibitions observées vis-à-vis des trois huiles essentielles. Les résultats obtenus ont montré qu'un important effet antibactérien a été exercé par les huiles essentielles du thym et la menthe poivrée.

Ces résultats sont probablement liés à la composition chimique de cette huile essentielle et son activité antimicrobienne qui pourrait principalement être dues aux composés majoritaires.

Concernant *Staphylococcus aureus*, une bactérie hautement pathogène à manifestée d'une sensibilité variable à cette huile essentielle, il faut noter que l'activité antibactérienne la plus élevée a été enregistrée avec l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* à différentes concentrations de 100 à 6,25%.

Ces résultats suggèrent que *S. aureus* est plus sensible qu'*E. coli* et *Salmonella*. Cette sensibilité plus marquée des Gram (+) par rapport aux Gram (-) vis-à-vis des huiles essentielles a été déjà observée dans plusieurs études antérieures. La grande résistance des Gram (-) est liée en partie à la complexité de la paroi cellulaire de ces micro-organismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire des Gram (+) (O'Bryan et al., 2015 ; Yang et al., 2015 ; Akbili et al., 2016 ; Elansary et al., 2020).

Cette grande activité antibactérienne peut-être reliée dans le cas d'huile essentielle du thym à la présence du thymol qui est majoritaire et aux constituants dominants dont le thymol fait partie. Ce composé phénolique est en effet, connu pour ses propriétés antimicrobiennes. D'autres travaux ont souligné que plus les teneurs en phénols sont élevés plus l'efficacité antimicrobiennes des huiles essentielles est grande (Ouakouak et al., 2021).

L'activité antibactérienne d'huile essentielle de coriandre vis-à-vis des trois souches bactériennes testées peut-être due aux constituants terpéniques et aux dérivés du phénylpropane qu'elle contient le linalol et l'estragole qui sont des composés majoritaires des essences de coriandre. En effet, les terpénoïdes et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux d'huile. Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires, la dégradation de la paroi cellulaire, l'altération de la membrane cytoplasmique et l'épuisement de la force motrice des protons (Ouis, 2015).

Cependant, les effets antibactériens rapportés de l'huile de menthe poivrée contre les différentes bactéries. Dans l'enquête d'Anwar et ses collaborateurs, elle a montré un effet antimicrobien naturel contre différentes souches de bactéries, mais leur activité variait en fonction de la concentration des constituants chimiques volatils (Anwar et al., 2017). Selon Samber et al. (2015), ont montré que le menthol, l'un des principaux composants des huiles essentielles de l'espèce *Mentha*, inhibait la pompe ( $H^+$ -ATPase) et l'acidification intracellulaire dans les cellules de *C. albicans*. Ils ont également rapporté que le menthol inhibait la voie de biosynthèse de l'ergostérol et influençait la fluidité et l'intégrité de la membrane, entraînant ainsi une fuite du contenu intracellulaire.

En revanche, dans une étude antérieure, la rupture de la membrane plasmique, sa dépolarisation et sa perméabilité accrue ont été rapportées, confirmant ainsi que différentes méthodes peuvent conduire à des résultats différents (Almeida et al., 2019).

Le thymol, carvacrol, menthole et linalol constituaient le principal composé phénolique d'huile essentielle du thym, menthe poivrée et coriandre respectivement, par leurs capacités à modifier la morphologie des hyphes et à provoquer des hyphes agrégats entraînant une réduction des diamètres des hyphes et des lyses de leurs parois. De plus, ils sont lipophiles ce qui lui permettent d'interagir avec la membrane cellulaire des cellules du champignon, altérant la perméabilité de la membrane en permettant la perte des macromolécules (Numpaque et al., 2011 ; Moghtader, 2012 ; Agili, 2014 ; René Degnon et al., 2017 ; Hussain et al., 2018).

Les trois huiles testées ont montrées une meilleure activité antibactérienne comparée à celle des antibiotiques classiques (Gentamicine et Ciprofloxacine) vis-à-vis les trois souches

étudiées *E. coli*, *S. aureus* et *Salmonella* qui ont révélé sensible avec des zones d'inhibitions de (19,5 ; 26 ; 21 et 26 ; 24 ; 21 mm) respectivement. Toutefois, la gentamycine considérée comme étant un antibiotique à large spectre contre de nombreux germes (Mississauga, 2017).

L'activité antifongique de Bahbahani et al. (2013) avec 5µl donne un diamètre d'inhibition de 45.7 mm; meilleur résultat a été observé avec *Aspergillus niger*. D'après Kumar et al. (2017) l'huile essentielle (HE) de *Thymus vulgaris* a un pouvoir antifongique plus efficace par rapport à une autre huile, le test a été réalisé sur trois souches différentes d'*Aspergillus niger* avec des zones d'inhibition entre (23,3 à 61,1 %). Bouddine et al. (2012) a utilisé l'HE de *Thymus vulgaris* à 62%Thymol (composant phénolique) a donné des résultats élevé avec zone d'inhibition de diamètre 56 mm, cette inhibition due à la richesse d'HE au thymol

D'après l'étude de Hassain et al. (2018), l'activité de HE de *Thymus vulgaris* a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques respectifs dans les concentrations a donné une concentration final efficace. Sachant que le diamètre de zone d'inhibition mesurant DZI= 15 mm à 500mg/ml effet inhibitrice modérée sur la croissance d'*Aspergillus Niger* et DZI =17mm à la concentration de 250mg/ml et considéré comme fort inhibiteur sur la croissance sur la moisissure mentionnée.

Ces résultats concordent également avec nos observations précédentes, qui ont montré qu'*Aspergillus niger* présente des zones d'inhibition qui varie de 59 à 0mm à 100 et 6,25% respectivement.

Les résultats obtenues ont montré que l'activité antimicrobienne est en fonction de la souche cible, il s'est avéré que toutes les souches bactériennes et fongiques testées ont été sensibles vis-à-vis des trois huiles essentielles à l'exception des souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus niger*) vis-à-vis l'huile essentielle de coriandre à une concentration de 6,25%.

Les huiles essentielles évaluées dans notre étude ont manifesté une meilleure activité antifongique comparée à celle de témoin et/ou l'antifongique classique (Fluconazole et Amphotricine B) qui s'est révélé inefficace contre *C. albicans* et *A. niger*.

- **Concentration minimale inhibitrice et fongicide (CMI, CMF)**

Nos résultats de concentration minimale inhibitrice (CMI), montrent que l'huile essentielle (HE) de menthe poivrée exerce une activité inhibitrice importante contre toutes les souches étudiées. Une concentration de 0,25% (v/v) est suffisante pour arrêter la croissance de *S. aureus* tandis que pour les Gram négatif, elle est plus efficace avec une concentration de 0,5% (v/v) vis-à-vis *E. coli* et 0,25% contre *Salmonella*. En ce qui concerne la concentration minimale fongicide (CMF) de l'HE de menthe poivrée contre *A. niger* et *C. albicans* dans la présente étude est de 0,5 et 0,25 % (v/v) respectivement après 48h d'incubation à 25°C, car aucune croissance de colonie fongique n'a été observée à cette concentration. À des concentrations plus faibles (0,25 ; 0,125 ; 0,06 et 0,03%) et (0,125 ; 0,06 et 0,03%) respectivement aux deux souches, des colonies fongiques ont commencé à apparaître après 10h d'incubation. Une étude menée par **Tullio et al. (2019)** a montré une activité non négligeable contre *Candida krusei*, *C. albicans* et *C. glabrata* affichant les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration fongicide minimale (CMF) les plus faibles allant de 0,06-0,125%, (v /v).

Tandis que l'huile essentielle du thym présente une activité inhibitrice contre *Salmonella* et *S. aureus* a des concentrations de 0,125% (v/v) et une concentration de 0,06% (v/v) est largement suffisante à inhiber le développement d'*E. coli*, *Aspergillus niger* et *Candida albicans* ont été inhibés à 0,5 % et 0,25% (v/v) respectivement.

Cependant, l'huile essentielle des graines de coriandre, une concentration de 0,25% (v/v) est très efficace pour inhiber la croissance de toutes les souches bactériennes et fongiques.

- **Conservation des denrées alimentaires par les huiles essentielles**

1. **Cas du fromage frais**

- a) **Analyse sensorielle et effet du pH**

Les bactéries lactiques fermentent le lactose et acidifient le lait du fait de la production massive d'acide lactique. La croissance des bactéries lactiques dans le lait, puis le caillé, entraîne la consommation de lactose et l'excrétion de l'acide lactique conduisant à l'abaissement du pH. Cette fonction acidifiante de ce type de bactérie est déterminante dans le processus d'élaboration des fromages (**Leksir, 2018**).

Selon **Mekhnache et Chaib Rassou (2019)**, la conservation sous vide du fromage donne un pH de 4.19 ; puis elle diminue au cours du temps jusqu'à 4.1 mais reste proche de celle trouvée par **Aissaoui Zitoun et Zidoune (2016)**, ce qui est significatif à nos résultats pour le fromage frais (témoin) non supplémenté d'huile essentielle ou l'agent pathogène.

Selon **Aissaoui Zitoun et al. (2011)**, l'augmentation du contenu d'acide lactique au cours de l'affinage suggère que l'acidification empêche le développement des bactéries qui oxydent l'acide lactique et permettent donc la neutralisation du caillé.

#### **b) Analyse microbiologique**

##### **- Recherche et dénombrement de la flore mésophiles**

**Dib et Filali (2018)** ont trouvé des valeurs entre  $10^6$  et  $10^9$  UFC/g pour les échantillons non épicés ; ce qui est fortement significatif à nos observations tandis que des charges plus faibles de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/g pour les échantillons épicés, ou ces résultats sont assez élevés par rapport à ceux trouvés par **Benidir et Medfouni (2018)** dans un échantillon non épicé avec une matière première de chèvre, et largement proches aux résultats des échantillons supplémentés des huiles essentielles.

Notons ainsi, l'absence totale des levures et moisissures dans nos résultats.

##### **- Recherche des coliformes fécaux**

Selon **Boulhmouta et Tounsi (2019)**, l'absence totale des coliformes totaux et fécaux que ce soit dans un fromage conservé en atmosphère normale ou sous vide peut-être expliqué par l'effet de pH très faible et l'effet de l'acidité de la masse fromagère et que les coliformes ne supportent pas les milieux acides, dont cela est confirmé par l'étude réalisé par **Boudjerrar et Messaoudi (2018)**.

##### **- Recherche de la flore pathogène**

La présence des germes pathogènes dans les fromages peut provoquer des intoxications alimentaires, et leur absence signifie que la traite du lait est faite dans de bonnes conditions hygiéniques.

Dans l'ensemble des études effectuées sur l'analyse du fromage et frais et selon le journal officiel de la république algérienne (**JORA, 2017**), les résultats obtenus indiquent une faible présence des germes pathogènes après 24h de conservation et qui se diminue jusqu'au

l'absence totale de ces germes que ce soit : *Salmonella*, *S. aureus* et *Claustridium* durant une période de 7jrs, nos résultats sont similaires avec celle de **Benidir et Medfouni (2018)**.

## 2. Cas de la viande hachée bovine

### a) Analyse sensorielle et effet du pH

L'évolution du pH au cours de la conservation des viandes hachées par les trois huiles essentielles augmente au cours du temps. Ces résultats sont similaires à celles d'autres chercheurs, **Amany et al. (2010)** et **Ayari et al. (2016)**. Dans ces recherches, il y a eu une augmentation significative des valeurs moyennes de pH de tous les échantillons traités avec des huiles essentielles d'ail, de thym et de citron à toutes les concentrations au 7<sup>ème</sup> jour de conservation. Nos résultats sont en accord aussi avec ceux obtenus par **Skandamis et Nychas (2001)** qui a trouvé que l'ajout d'HE d'origan à la viande hachée augmente les valeurs de pH au cours de la conservation. L'élévation du pH est peut-être due à la décarboxylation des acides aminés par les micro-organismes (**Yazin et Abou-Taleb, 2007 ; Ayari et al., 2016**).

Les viandes bovines crues libèrent par écoulement spontanée un liquide, appelé exsudat, au cours de leur conservation. Le liquide contient des éléments nutritifs hydrosolubles qui seront perdues. Cette perte provoque des changements de la qualité gustative et technologique des viandes ; à savoir le goût, l'odorat et l'aspect. Ce phénomène d'exsudation est plus prononcé lorsque les viandes sont hachées en raison de la destruction de leurs réseaux protéiques (**Aouidi et al., 2016**). Un pH acide présente une perte très importante au cours de la conservation. Les échantillons témoin possèdent un pH acide, alors que les échantillons des viandes supplémentés des huiles essentielles et qui possèdent des pH proches de la neutralité montrent des pertes plus faibles par rapport au témoin et ce qui coïncide avec l'étude de **Molette (2004)**.

Au cours de leur conservation, les viandes hachées bovines subissent des changements dans leurs compositions biochimiques. Ces changements appréciés sont responsables des altérations de la qualité organoleptique du produit. Parmi les critères les plus importants du rejet des viandes bovines hachées par le consommateur sont le goût du rancissement ainsi que le brunissement de la couleur. Ces deux phénomènes sont dus, respectivement, à des réactions d'oxydation des protéines et de la matière grasse dans les viandes bovines (**Ed-Dra et al., 2018**).

**Tajik et al. (2014)** a montré que l'utilisation de l'huile essentielle de clou de girofle à 0,01% a diminué l'oxydation lipidique de la viande traitée par rapport au témoin pendant la conservation à 8°C pendant 9 jours.

La couleur de la viande dépend de quatre composantes majeures : le développement des bactéries en surface de la viande (**Rodriguez-Estrada et al., 1997**), le pH, la quantité de myoglobine (**Jacquot et al., 2011**) et la structure chimique de la myoglobine (**Chaijan, 2008**). En fait, la décoloration indésirable de la viande pendant la conservation est souvent attribuée à l'oxydation de la myoglobine dans la surface de la viande (**Chaijan, 2008 ; Ed-Dra et al., 2018**).

Dans notre étude, nous avons observé que la viande hachée supplémentée de l'huile essentielle des trois huiles essentielles a permis de réduire la quantité de met-myoglobine, ces résultats sont contraire à ceux présentés par **Huang et al. (2011)** qui ont montré que l'utilisation de l'extrait du nœud des rhizomes de lotus (LRK) ne présente pas une efficacité sur la formation de la met-myoglobine. **Smaoui et ces collaborateurs (2016)** ont montré que l'utilisation de l'huile essentielle de *Mentha piperita* a permis de retarder l'accumulation de la Met-Mb dans la viande bovine hachée au cours de la réfrigération à 4°C. Il a expliqué ses résultats par la richesse de l'huile essentielle de *Mentha piperita* en composés polyphénolique. Parallèlement, notre résultat donc peut être expliqué par la richesse de l'huile essentielle de cannelle par les composés phénoliques (**Shan et al., 2007 ; Smaoui et al., 2016**).

#### **b) Analyse microbiologique**

La viande est un aliment nutritif qui fournit des conditions idéales pour la croissance microbienne qui peuvent entraîner le développement de réactions indésirables impliquant une détérioration des propriétés de saveur, d'odeur, de couleur, de sensibilité et de texture des aliments (**Saucier, 2016 ; Sirocchi et al., 2017**). Dans ce contexte, le suivi de la croissance microbienne de certains micro-organismes dans les produits alimentaires pouvant causer des maladies d'origine alimentaire est un intérêt majeur (**Lucera et al., 2012**).

La réfrigération est la méthode de conservation la plus courante de la viande crue et des produits à base de viande. Dans notre étude, nous avons utilisé les huiles essentielles de thym, menthe poivrée et coriandre dans la conservation de viande hachée bovine au réfrigérateur à 4°C.

Nos résultats ont montré que l'ajout des trois huiles essentielles avec une concentration de 15µl, permet une bonne conservation de la viande hachée pendant 2 jour (nombre de FTAM  $<5 \times 10^5$  germes/gramme (**Guiraud, 1998**), nombre des entérobactéries  $< 10^4$  germes / gramme (**Deslandes, 1999**)).

Ces résultats peuvent être expliqués par l'activité antimicrobienne des huiles. Les expériences de **Khaleque et al. (2016)** ont montré que l'utilisation de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) avec une concentration de 0,9 % permet de réduire la présence de *Listeria monocytogenes* dans la viande hachée. D'autres études similaires ont montré que l'utilisation de l'huile essentielle de cannelle avec une concentration de 2,5 % a permis l'inhibition de *Listeria monocytogenes* dans la viande hachée.

Les trois huiles essentielles testées ont permis de réduire le nombre des colonies des FTAM et des entérobactéries par rapport aux témoins. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'augmentation de pH de la viande et donc l'inhibition des bactéries. Ils peuvent être aussi expliqués par l'effet antimicrobien de leurs composés poly-phénoliques (thymol, carvacrol, menthole, linalol) (**Samber et al., 2015 ; Hussain et al., 2018 ; Almeidar et al., 2019 ; Ouakouak et al., 2021**).

A fin d'approfondir nos résultats, ces modifications n'ont pas été causées suite à une altération microbienne mais probablement à une altération chimique et/ou enzymatique suite aux modifications organoleptiques observées, et donc, on peut dire que ces produits peuvent être destinés à la consommation vu qu'ils sont dotés d'une bonne qualité sanitaire.

En comparant l'activité des trois huiles sur la denrée réfrigérée testée, nous avons remarqué que l'huile essentielle de menthe poivrée avait une activité inhibitrice plus forte, suivi d'huile essentielle du thym puis de la coriandre, dont cette dernière présente un effet conservateur très significatif sur la viande hachée plus que le fromage par rapport aux deux autres huiles.



**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

Le travail entrepris au cours de cette présente étude a compris d'isoler et d'identifier des germes pathogènes alimentaires à partir de divers denrées alimentaires selon le JORA (2017). De plus à évaluer l'activité antimicrobienne de trois huiles essentielles, dont deux sont extraites par un procédé d'entraînement à la vapeur d'eau, passant par la suite à une épreuve de conservation alimentaire.

Les analyses bactériologiques ont montré la présence d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* et de *Penicilium*.

Les résultats conquis sont d'une grande importance, duquel le rendement des huiles essentielles était variable selon l'espèce, ou *Mentha piperita* qui a donné un rendement important de 1,4% suivi du *Thymus vulgaris* (1,3%), néanmoins l'extraction à partir de *Coriandrum sativum* n'a donné aucun résultat en deux fois d'essais.

L'activité antimicrobiennes de nos résultats varie d'une espèce à l'autre et aussi selon l'espèce testées et la concentration d'huile essentielle. Une activité puissante du *Thymus vulgaris* sur toutes les souches bactériennes testées avec un intervalle de [19-68mm] et de [34-56 mm] pour les souches fongiques à des concentrations de 100 à 6,25%. L'huile essentielle de *Coriandrum sativum* et de *Mentha piperita* était de moindre activité en comparaison avec la première, avec des intervalles de [12-67mm] et [14-70mm] pour les souches bactériennes et de [00-59mm] et [7,5 -55 mm] pour les souches fongiques respectivement.

L'huile essentielle de thym a montré une activité bactéricide de 0,125% sur *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* et de 0.06% sur *Escherichia coli* et de 0,5% ; 0,25% sur *Aspergillus niger* et *Candida albicans* respectivement. Tandis que l'huile essentielle de la coriandre s'est dévoilée avec une concentration de 0,25% sur l'ensemble des souches testées ; bactériennes et fongiques. Cependant, l'effet bactéricide d'huile essentielle de menthe poivrée s'est arboré a 0,25% pour *Salmonella*, *S. aureus* et *C. albicans*, et de 0,5 % sur *E. coli* et *Aspergillus niger*

En conclusion, l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* est jugée d'une grande importance ; à savoir leurs activités antifongique plus qu'antibactérienne et son faible effet conservateur sur la viande hachée bovine. Malgré cela, les deux autres huiles sont ainsi estimées d'une meilleure activité antimicrobienne et leurs préférable effet conservateur, et particulièrement sur le fromage frais.

Ces résultats prometteurs de cette étude nous motivent :

- À mener des expérimentations plus approfondies et des études ethnopharmacologiques notamment « *in vivo* » à fin de témoigner les résultats obtenus « *in vitro* », ainsi que des tests de toxicité des huiles essentielles ; dans le cadre de la valorisation de la flore Algérienne.
- D'identifier les poly-phénols en général et les flavonoïdes en particulier qui pourraient avoir une activité antimicrobienne pour approfondir non seulement les connaissances sur les différentes molécules pourvues de cette activité.
- De suivre le potentiel de conservation par les huiles essentielles, pour confirmer l'innocuité de ces substances volatiles afin de pouvoir estimer son degré de sécurité et son éventuelle applicabilité dans le domaine alimentaire. Tenant compte de leurs activités antimicrobiennes et leurs profils aromatiques, il serait envisageable de mener des essais d'incorporation de ces substances dans les aliments et les préparations alimentaires.
- De proposer d'éventuelles préparations à usage thérapeutique et notamment contre les intoxications alimentaires ; à base des huiles essentielles et l'investigation de mélanges d'extrait à base de plusieurs espèces végétales.



**REFERENCES**



- ✓ **Abdelli W.**, (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 104p.
- ✓ **Abusheliabi A.**, Al-Holy M. A., Al-Rumaithi H., Al-Khalidi S., Al-Nabulsi A. A., Holley R A. et Ayyash M., (2017). Inhibition de la croissance des agents pathogènes d'origine alimentaire dans le lait de chamelle : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* et *E. coli O157:H7*. Czech J. Food Sci., 35: 311-320.
- ✓ **Adwan G.**, Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F, (2006). Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. Turk. J. Biol, 30, 239-242p.
- ✓ **Ait-Ouazzou A.**, (2012). Caractérisation des huiles essentielles de plantes aromatiques d'origine méditerranéenne et évaluation de leur activité antimicrobienne en combinaison avec d'autres méthodes de conservation des aliments. Thèse de doctorat de l'Université de Saragosse. Espagne.
- ✓ **Andersson MA**, Hakulinen P, Honkalampi-Hamalainen U, Hoornstra D, Lhuguenot JC, Maki-Paakkanen J., (2007). Profil toxicologique du céréulide, la toxine émétique de *Bacillus cereus*, dans des essais fonctionnels avec des cellules humaines, animales et bactériennes. *Toxicon* ; 49 : 351-67.
- ✓ **Annou G.**, (2018). Activités biologiques des épices constitutives d'un mélange « Ras el hanout » utilisé par les habitants de Ouargla. Thèse de Doctorat Ès Sciences de la vie, université kasdi merbah Ouargla, pp 13-14.
- ✓ **Aloui N.**, (2018). Etude de la contamination fongique alimentaire et mycotoxines. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mhammed V-Rabat. Maroc.
- ✓ **Anwar, F.**; Alkharfy, KM; Najeeb-ur-Rehman ; Adam, EHK ; Gilani, A.-U.-H. , (2017). Variations chimio-géographiques de la composition des volatiles et des attributs biologiques des huiles essentielles de *Mentha longifolia* (L.) d'Arabie Saoudite. Int. J. Pharmacol. , 13 , 408-424.
- ✓ **Afnor.** , (2000). Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1et 2).

- ✓ Afnor. , (1986). Recueil des Normes françaises – huiles essentielles-, AFNOR. Paris. (1986). 57p.
- ✓ Aomari L et Sehaki C., (2018). Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de Thym, Caractérisation et évaluation de l'activité antimicrobienne. Faculté des sciences. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- ✓ Antolak, H.; Czyłowska, A.; Kręgiel, D., (2018).Activité de *Mentha piperita* L. Extrait d'éthanol contre les bactéries de l'acide acétique *Asaia* spp. *Aliments*, 7.
- ✓ Almeida, E.T.D.C.; De Souza, G.T.; Guedes, J.P.D.S.; Barbosa, I.M.; De Sousa, C.P.,(2019).Castellano, L.R.C.; Magnani, M.; De Souza, E.L. *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. *Food Microbiol.*82, 20–29.
- ✓ AFNOR, E., (1986). Méthodes d'essai. Recueil des normes françaises.
- ✓ Amara N., Bougherara Y., (2017). Activité antimicrobienne de l'huile essentielle du Cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.). *Journal algérien de production naturelle*. 5(2) : 455-462.
- ✓ Alexa, E. ; Danciu, C.; Radulov, I; Obistioiu, D.; Sumalan, RM ; Morar, A.; Dehelean., (2018).CA Criblage phytochimique et activité biologique de *Mentha piperita* L. et *Lavandula angustifolia* Mill. Extraits. *Anal. Cellule. Pathol.* 2678924.
- ✓ Archambault M., et Rubin J. E., (2020). Antimicrobial resistance in *Clostridium* and *Brachyspira* spp. and other anaerobes. *Microbiology spectrum*, 8 (1).



- ✓ **B**addi M., Nassik S., Alali S. et Elhkaiki A., (2021). Cooccurrence de mycotoxines dans les aliments pour volailles et les ingrédients alimentaires commercialisés au Maroc. *Spécial aviculture*. Vol.9(3).
- ✓ **B**archan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., et Laglaoui, A., (2016). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*.
- ✓ **B**eigi, M., Toriki-Harchegani, M., & Ghasemi Pirbalouti, A., (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha × piperita* L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 267- 276.
- ✓ **B**enabdallah, A., Boumendjel, M., Aissi, O., Rahmoune, C., Boussaid, M., & Messaoud, C., (2018). Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. *South African Journal of Botany*, 116, 131-139.

- ✓ **Benner Jr., R.A.**, (2014). Organismes préoccupants mais non d'origine alimentaire ou d'origine alimentaire confirmée : micro-organismes d'altération. Tome 2 : risques et maladies. Dans : Motarjemi, Y., Moy, J., Todd, E. (Eds), *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, p. 245-250.
- ✓ **Ben Miri Y. et Djenane Dj.**, (2018). Evaluation de la protection de l'impact algérien *Cuminum Cyminum L.* et *Coriandrum sativum L.* Huile essentielles sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et la production de B-Aflatoxine. *Journal pakistanais des sciences biologiques* (Pak J Biol Sci PJBS), n°21(2), pp 67-77.
- ✓ **Birembaux Julie.**, (2017). Conseils à l'officine: prévention des infections alimentaires chez les populations à risques. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille 2 de droit et santé. 73 p.
- ✓ **Blancher M.M., Armengaud, Chastel, Darnis, Delaveau, Durand, Percheron, Raffi, Rérat, Rico, Rosset, Tubiana.**, (2002). *Ionisation des aliments*. Académie nationale de médecine. 186, no 4, 805-817.
- ✓ **Boudjema N.**, (2015). Microbiologie alimentaire. Polycopie de microbiologie. P46.
- ✓ **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Bouhdid D., Skali N.S., et Abrini J.** (2006). Thymus essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, *Congrès International de biochimies, Agadir*. 324-327.
- ✓ **Boughendjioua H.**, (2015). Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de Doctorat, Biologie Végétale, UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR – ANNABA, 15 ; 24-25 ; 34p.
- ✓ **Boumendjel .**,(2005). Conservation des denrées alimentaires. Centre Universitaire d'Eltarf.
- ✓ **Boukhobza, F.**, (2020). Intérêt de l'huile essentielle de Menthe poivrée dans les soins bucco-dentaires. *Actualités Pharmaceutiques*, 59(597), 52–53.
- ✓ **Boulade C.**, (2018). Lamiaceae : Caractéristiques et intérêts thérapeutiques à l'officine. Thèse doctorat en pharmacie. Université TOULOUSE III Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques. France.
- ✓ **Bourigault, C., et Lepelletier, D.**, (2013). Risques sanitaires liés à l'eau et à l'alimentation. Toxi-infections alimentaires. *La revue du praticien*, 63, 1-7

- ✓ **Buisson, Y. et Teyssou, R., (2007).** La sécurité Sanitaire des aliments d'origine animale: Les Toxi-infections Alimentaires Collectives. *Revue Française des Laboratoires*, vol 2002, n°348 (décembre 2007). pp. 61-66.
- ✓ **Bragason, E., Berhe, T., Dashe, D., Sørensen, K. I., Guya, M. E., et Hansen, E. B., (2020).** Activité antimicrobienne de nouvelles souches de *Lactococcus lactis* contre *Salmonella Typhimurium DT12*, *Escherichia coli O157 :H7 VT-* et *Klebsiella pneumoniae* dans le lait de chamelle cru et pasteurisé. *Journal international du lait*, (111) 104832.
- ✓ **Brindis F, González-Andrade M, González-Trujano ME., (2014).** Glycémie postprandiale et inhibition de l'activité -glucosidase par l'extrait aqueux de *Coriandrum sativum*. *Nat Prod Res* 28(22) : 2021–5 28.
- ✓ **Bupesh G., C. Amutha, S. Nandagopal, et al., (2007).** Activité antibactérienne de *Mentha piperita L.* (menthe poivrée) à partir d'extraits de feuilles - une plante médicinale. *Acta Agriculturae Slovenica*, vol. 89, pages 73-79.
- ✓ **Bornert G., (2000).** Importance des bactéries psychotropes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Médecine. Vétérinaire*, vol 151(11), 1003-1010.
- ✓ **Bowel Syndrome Symptoms.** *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 61, pp 560-571.
- ✓ **Brigiet Van Den Boogaard, Corlien Heijnen., (2005).** La conservation du poisson et de la viande : les facteurs d'altération des viandes. Marja de goffau – markusse. ISBNB : 90-8573-033-3.p835.
- ✓ **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.), Tec & Doc EMInter, pp 1120, Paris.
- ✓ **Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.), Tec & Doc EMInter, Paris.
- ✓ **Bruneton J., (2016).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.), Tec & Doc EMInter, pp1488. Paris.
- ✓ **Butler, J. A. and Martin, G., (2005).** Foodborne Illnesses. The American College of Gastroenterology. Service National Naval Medical Center. P: 301-263-9000.
- ✓ **Boubrit S. et Boussad N., (2007).** Détermination *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Ingénieur d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses. Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou.

- ✓ **Bouguerra, A.**, (2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill.
- ✓ **BALIÈRE, C.**, (2016). Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC (Thèse de Doctorat en Microbiologie), Université de Bretagne occidentale, École Doctorale des Sciences de la Mer, France. 187p.
- ✓ **Bauer et al.** , (1966). Test de sensibilité aux antibiotiques par une méthode standardisée à disque unique. *Journal américain de pathologie clinique*, 44 : 493-496.
- ✓ **Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., Djamel, T.**, (2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris L.*) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8, 1418.
- ✓ **Bardeau F.**, (2009). Les huiles essentielles Propriété et utilisation de L'aromathérapie. Découvrir les bienfaits et vert d'une Médecine ancestrale. Edition : Lanore (Paris), pp : 40-43, pp : 199-201.
- ✓ **Benabdallah A.**, (2017). Etude écologique, développement et importance des plantes médicinales du genre *Mentha* dans le parc national d'El-Kala (nord-est Algérie). Thèse de doctorat en biologie végétale. Université des Frères Mentouri, Constantine 1.
- ✓ **Bencheikh S.**, (2017). Etude des huiles essentielles de la *plante tencrium ssp aurasianum labiatae*, thèse de doctorat, université Kasdi Merbah –Ouargla, p :13.



- ✓ **Cappucino J. et Welsh C.**, (2020). Microbiology : A Laboratory manual. Loose leaf edition (12<sup>e</sup> éd.). Pearson.
- ✓ **Cash Brooks D., Michael S. Epstein et Syed M. Shah.**,( 2015). A Novel Delivery System of Peppermint Oil Is an Effective Therapy for Irritable.
- ✓ **Casetti F, Bartelke S, Biehler K, et al**, (2012). Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum L.* fruits. *Phytother Res* 26(3):420–4.

- ✓ Chbaibi A., Marouf Z., Rhazi-Filali F., Fahim M., Ed-Dra A., (2016). Evaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*. 14:355-362.
- ✓ Chiguer, B., (2014). Toxi-infections Alimentaires Collectives : Fléau Mondial à surveiller (Exemple du Maroc 2008-2012). Thèse de Doctorat en Médecine. Faculté de Médecine et de Pharmacie : Université Mohammed V- Souissi, Rabat. 104 p
- ✓ Clin C. Sud-est. , (2003). Conduite à tenir en cas de suspicion de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) en établissement de santé.
- ✓ Chen J, Ma M, Uzal FA, McClane BA, Chen J, Ma M, et al. ,(2014).Host cellinduced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut microbiota*.5: 37–41. doi:10.4161/gmic.26419.
- ✓ C.L.S.I. M7-A. 1985. Methods for dilution antimicrobiol susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard.
- ✓ C.L.S.I.-M32-P. Evaluation of Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Broth for Antimicrobial Susceptibility Testing; Proposed Guideline.
- ✓ Comité de l'antibiogramme. Société Française de Microbiologie. (<http://www.sfm.asso.fr/>).
- ✓ Cowan P., et Marjorie K., (2017). *Microbiology : A systems approach*. McGraw- Hill Education.



- ✓ Denayer S., Verhaegen B. et VanHoorde K., (2020). Maladies infectieuses humaines Pathogènes alimentaires. Laboratoire national de toxi-infections alimentaires. Rapport annuel des toxi-infections alimentaires en Belgique 2019. *LRBTTA Sciencsano*.440(41).
- ✓ Dervin, F., (2013). Le Risque de Toxi-infection Alimentaire lié aux salariés manipulant des aliments : recommandation pour la surveillance médicale des salariés. Thèse de Doctorat en Médecine, U.F.R de Médecine et de Pharmacie : Université de Rouen. 95.
- ✓ De Oliveira Hashimoto, G. S., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L., (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture*, 450, 182-186.

- ✓ **Dosso, M., coulibaly et kadio, A., (1998).** Place des diarrhées bactériennes dans les pays en développement. Manuscrit n°PF02. Journée en hommage au Professeur DODIN, A. 7 décembre 1998.
- ✓ **Duarte A, Ferreira S, Silva F, Domingues FC, (2012) .**Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine* 19(3-4):236–8.
- ✓ **Dubois-Brissonnet, F., et Guillier, L., (2020).** Les maladies microbiennes d'origine alimentaire. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 55(1), 30-38.
- ✓ **Djabou N., Lorenzi V., Guinoisea E., Andreani S., Giuliani M.C., Desjobert J.M., Bolla J.M., Costa J., Berti L., Luciani A., Muselli A., (2013).** Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against food borne or toxigenic pathogens. *Food control*. 30 :354-363.
- ✓ **Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses u de contrôle sanitaire. Edition Technique et Documentaires, Paris.
- ✓ **Delarras C., (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levures et moisissures. Edition Lavoisier, Paris ISBN : 978-2-7430-1565-7.
- ✓ **Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Cattoir, V., (2016).** Bactériologie Médicale : Technique usuelles. Elsevier Masson, Edition .543p. 123-138.
- ✓ **Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., (2010).** GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. et Biol. Sci.*, 6 (3):pp. 191-198.



- ✓ **Edet, F., (2004).** La cannelle de Ceylan et ses activités biologiques. Thèse de. Doctorat en pharmacie, Université Joseph Fourier. Faculté de Pharmacie de Grenoble-France.
- ✓ **Eidi M, Eidi A, Saeidi A, et al, (2009)** Effect of coriander seed (*Coriandrum sativum L.*) ethanol extract on insulin release from pancreatic beta cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 23(3):404–6.
- ✓ **Emilie F., (2009).** Connaissance des aliments. Bases alimentaires et notionnelles de la diététique. 2eme Edition Lavoisier. ISBN : 978-7430-1156-7.

- ✓ **Erkmen, O., et Bozoglu, T. F., (2016).** Food Microbiology Principles into Practice (1re éd.). John Wiley & Sons, Inc. *Phytothérapie*, 14(2), 88-96.
- ✓ **Elansary, HO; Szopa, A.; Kubica, P. ; Ekiert, H.; Klimek-Szczykutowicz, M.; El-Ansary, DO ; Mahmoud. , (2020).**EA Profil polyphénolique et activités antimicrobiennes et cytotoxiques des populations naturelles de *Mentha piperita* et de *Mentha longifolia* dans le nord de l'Arabie saoudite. *Processus*, 8, 479.
- ✓ **Ed-Dra, A. ; Filai, FR ; Bou-Idra, M. ; Zekkori, B. ; Bouymajane, A. ; Moukrad, N. ; Benhallam, F. ; Bentayeb, A., (2018).** Application de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* comme agent antimicrobien dans les saucisses de dinde fraîches. *J. Appl Biol & Biotechnol*, 6, 7-12.
- ✓ **ELYAAGOUBI M., Hicham MECHQOQ, Abdellah ELHAMDAOUI, Venugopal JRV MUKKU, Abdelhamid EL MOUSADIK, Fouad MSANDA et Nouredine EL AOUAD. , (2021).** Revue des espèces marocaines de *thymus* : usages traditionnels, composition chimique des huiles essentielles et effets biologiques. *Journal d’Ethnopharmacologie, sous presse*. Volume 246.



- ✓ **Fatma GUESMI, Issam SAIDI, Ahmed LANDOULSI, (2020).** L'espèce *Thymus hirtus willd. ssp. algeriensis* (Boiss. et Reut.) Murb: Description ethnobotanique, ontogenèse, phénologie et utilisations phytopharmacologiques. *Annales de l'INRAT*, Volume 93. P :(1-10).
- ✓ **Fernandez X., Chemat F., (2012).** La chimie des huiles essentielles. Editions Vuibert. 288p.
- ✓ **Fleming.A., (2014) :** Toxi-infection Alimentaires (TIAC) en Région Rhône-Alpes : Bilan Et Analyse Des Causes. Gestion Opérationnelle D'une Suspicion De TIAC par une Direction Départementale De La Cohésion Sociale Et De La Protection Des Populations (DD(CS) PP) : Exemple Dans le Département De La Loire. Thèse de doctorat en Médecine Vétérinaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie : université Claude-Bernard-Lyon I.217p.
- ✓ **Franco-Buenaventura D., et Farcia-Perdomo H. A., (2020).** Vacuum-assisten closure device in the postoperative wound car dor fournisseur's gangrene : a systematic review. *International Urology and Nephrology*, 53(4), 641-653.

- ✓ Frédéric Borges, (2014). Sécurité sanitaire des aliments. ENSAIA. Université de Lorraine.
- ✓ Fernandez X., Chemat F., (2012). La chimie des huiles essentielles. Editions Vuibert, 288p.
- ✓ Fertoul F et Mahrech H., (2009). Etude de l'effet insecticide de l'huile essentielle et l'extrait aqueux de *Mentha piperita* par contact et inhalation sur *Rhyzopetha dominica* et *Tribolium castaneum*. Faculté des sciences agrovétérinaire et biologique. Université Saad Dahleb Blida 01.
- ✓ Fekih N.,(2014). Propriétés chimiques et biologiques des HE de 3 espèces du genre pinus poussant en Algérie ,thèse de docteur ES-science en chimie ,Université Abou Beker Belkaid –Telemcen ,p :16.
- ✓ **FIL 60B (1990)** : Produits laitiers secs - Dénombrement de *Staphylococcus aureus* - Technique du nombre le plus probable.
- ✓ **FIL 138 (1986)** : Lait sec – Dénombrement du *Staphylococcus aureus* - Technique par comptage des colonies à 37°C.
- ✓ **FIL 145 (1990)** : Lait et produits à base de lait. Dénombrement de *Staphylococcus aureus* - Technique de comptage des colonies V à 37°C.
- ✓ Fouillet A., (2021). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2019. *Santé publique France*. 12pages.
- ✓ Fouillet A., Nelly Fournet, Cécile Forgeot, Gabrielle Jones, Alexandra Septfons, Léa Franconeri, Katia Ambert-Balay, Jeannot Schmidt, Patrick Guérin , Henriette de Valk , Céline Caserio-Schönemann., (2020). Grandes flambées concomitantes de visites d'urgence de gastro-entérite aiguë chez l'adulte et d'événements d'origine alimentaire suspectés d'être liés à des crustacés crus, France, décembre 2019 à janvier 2020. *Euro Surveill*. 25(7).



- ✓ José F. Vouillamoz, Bastien Christ. , (2020). *Thymus vulgaris L.* : Thym. Plante médicinales, aromatiques et stimulantes. *Suisse*. Volume 12. PP (547-557).
- ✓ Joffin C. et Joffin J. Noel., (2000). Microbiologie Alimentaire. 5ème édition. Centre régional de documentation pédagogique (CRDP) d'Aquitaine Bordeaux. France. 212p.
- ✓ JORA n° 42 (15 juin 2005). Arrêté 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des *Salmonella* dans le lait et les produits laitiers.



- ✓ **Haour A.**, (2018). Toxi-infections alimentaires collectives, vue d'ensemble (exemple du maroc 2008-2017) et mise en relief sur le cas particulier de listeriose. Thèse pour l'obtention du doctorat en Pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie rabat Université Mohammed 5.
- ✓ **Harbaj S.**, (2019). Toxi-infections alimentaires collectives. Thèse de doctorat. Université Mohammed V. Faculté de médecine et de pharmacie. Rabat-Maroc.
- ✓ **Hartmann P, Simon L. et Blech M.F.**, (2009). Risques sanitaires liés à l'eau et à l'alimentation, Toxi-infections alimentaires ; *Revue du Practicien* 5 : 685-7.
- ✓ **Hermana N. S. P., Nilasari Z., Yuniarti E., Riyanto A., Safika, Indrawari A. et Pasaribu F. H.**, (2020). Antibioticrosistance profile of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* and *Klebsiella spp.* isolated from chicken farm in Bogor, Sukabumi, and Cianjur, West Java. *Journal of physics : Conferences series*, 1430, 012021.
- ✓ **Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R.**, (2015). L'application des plantes médicinales dans la médecine traditionnelle et moderne: une revue de *Thymus vulgaris*. *Int J Clin Med* 06: 635–642.
- ✓ **Howell K.**, (2016). Spoilage : east spoilage of food and beverages. In : Caballero, B., Finglas, P.M, Toldra, F. (Eds.), *Encycloedia of food and health*, vol. 5. Academic Press, Oxford, pp. 113-117.
- ✓ **Haddouchi F., Zerhouni K., Sidi-Yekhelef A., Chaouche T.M.**, (2016). Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas subsp.* Rupestre. *Bulletin de la société royale des sciences de Liège*. 85 : 152-159.
- ✓ **Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S.**, (2010). Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: pp.1070-1078.
- ✓ **Husain, FM; Ahmad, moi; Khan, MS ; Ahmad, E.; Tahseen, Q. ; Khan, MS ; Alshabib.**, (2015).NA Les sous-MIC de l'huile essentielle de *Mentha piperita* et du menthol inhibent le quorum sensing et le biofilm des bactéries Gram-négatives. *De face. Microbiole.* 6 , 420.
- ✓ **Hassain A.S., Ali K.H., Abbood H.N.**, (2018).Evaluation of Antifungal Activity of Plant Extracts of (*Thymus vulgaris*) (*Cinnamomum*) against fungal. *Advances in Life Science and Technology*. Vol.67.



- ✓ INSP, (2010). Info-Santé. Bulletin d'information de santé publique, Algérie.
- ✓ INSP, (2017). Info-Santé. Bulletin d'information de santé publique, Algérie.



- ✓ Gadaka M. A., Muazu A. B. et Muhammad I.U., (2021). Analyse phytochimique et élémentaire des feuilles de méthanol extrait de thé de la menthe poivrée (*Mentha piperita L.*). *Science alimentaire et gestion de la qualité*. Vol (108), pp 50-53.
- ✓ Ganesan Mahendran, Laiq-Ur Rahman, (2020). Mises à jour ethnomédecines, phytochimiques et pharmacologiques sur la menthe poivrée (*Mentha × piperita L.*) - Un examen. *Phytotherapy Research*. 34\_(9), pp 2088-2139.
- ✓ Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- ✓ Garnier, F. et Mainardi, J.L. Bactériémies et Endocardites. In : Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Cattoir, V., (2016). *Bactériologie Médicale : Techniques usuelles*. Elsevier Masson, Edition 3. 543p : 123-138.
- ✓ Garnier, F. et Denis, F., (2007). *Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif*. Elsevier Masson. Chapitre 29 : 251-254.
- ✓ Guiraud J.P., (2012). *Microbiologie des principaux produits alimentaires, Microbiologie alimentaire*. Ed ©Dunod, Paris.P 365.
- ✓ Ghedira K. et Goetz P., (2015). *Coriandrum sativum L.* (Apiaceae) : Coriandre. *Phytothérapie*, 13:130-134.
- ✓ Guiraud j.-P., (2003). *Microbiologie alimentaire*. Dunod – RIA, 696 Limsowtin G.K.Y., Broome M.C., powell I.B. Lactic acid bacteria, taxonomy. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Roginski H. Oxford, Elsevier. 2004, 1470-1478.
- ✓ Gürsoy A., Durlu-Özkaya F., Yildiz F. et Aslim B., (2010). Set Type Yoghurt Production by Exopolysaccharide Producing Turkish Origin Domestic Strains of *Streptococcus thermophilus* (W22) and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (B3). *Kafkas Universite Veteriner Fakultesi Dergisi*, 16, 81-86.

- ✓ Gauthier A., (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux. France.
- ✓ Goudjil M.B., (2016). Composition chimique, activité antimicrobienne et anti-oxydante de trois plantes aromatiques. Thèse de doctorat en génie de procédés et environnement. Université Kasdi Merbah-Ouargla.



- ✓ Kačániová, M., Galovičová, L., Ivanišová, E., Vukovic, N. L., Štefániková, J., Valková, V., Borotová, P., Ľiarovská, J., Terentjeva, M., Felšöciová, S., & Tvrďá, E. , (2020). Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Essential Oil for Its Application in Foods. *Foods*, 9(3), 282.
- ✓ Khaleque, M., C. Keya, K. Hasan, M. Hoque, Y. Inatsu and M. Bari, (2016). "Use of cloves and cinnamon essential oil to inactivate *Listeria monocytogenes* in ground beef at freezing and refrigeration temperatures." *LWT-Food Science and Technology* 74: 219-223.
- ✓ Khare CP, (2007). Indian Medicinal Plants. An Illustrated Dictionary, Heidelberg, 164
- ✓ Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA. , (2010). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal , and Viral Diseases. A Data Synthesis. 2015; 1–21.
- ✓ King, L.A., Loukiadis, E., Mariani-kurkdjian, P., Haeghebaert, S., Weill, F.X., BALIERE, C., Ganet, S., Gouali, M., Vaillant, V., Pihier, N., Callon, H., Novo, R., Gaillot, O., Thevenot-sergentet, D., Bingen, E., Chaud, P., Devalk, H. ,(2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: [H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*, 20:1136–1144.
- ✓ Kim J. J., Johnson J. K., Stucke E. M., Surkin J. D., Zhao L., Lydecher A., Mudy L., et Roghmann M. C., (2020). Burden of perianal *Staphylococcus aureus* colonization in nursing home residents increases transmission to healthcare worker gowns and gloves. *Infection control and hospital epidemiology*, 17(12). pp1396-1401.
- ✓ Kheyar N., Meridja D., Belhamel K., (2014). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Journal Algérien de production naturelle*. 2 :18-26.

## L

- ✓ **L**aghchimi A., Znini M., Majidi L., Renucci F., El Harrak A., Costa J., (2014). Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple). *Journal of Materials and Environmental Science*. 5 (6) : 1770-1780.
- ✓ **L**obstein, A., et Couic-Marinier, F., (2016). Huile essentielle de *Menthe poivrée*. *Actualités Pharmaceutiques*, 55(558), 57–59.
- ✓ **L**uquet F.M. et Corrieu G., (2008). Bactéries lactiques et probiotiques. Lavoisier/ Tec et Doc. 320 pages. Paris, France.
- ✓ **L**awrence BM, Tucker AO., (2002). Le genre *Thymus* comme source de produits commerciaux. Dans: Stahl-Biskup E, Sáez F (eds) *Thyme, le genre Thymus*. Taylor et Francis, Londres, pp 252-262.
- ✓ **L**indström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H., (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol*. 28: 192–198. doi:10.1016/j.fm.2010.03.020.
- ✓ **L**anotte P. et Merghetti L., (2007). Démarche de l'examen bactériologique médicale-Technique usuelles. Editin Masson-Paris. pp. 50-73.

## M

- ✓ **M**ahon C. R. et Lehman D. C., (2019). Textbook of diagnostic microbiology (6<sup>e</sup> éd.) Elsevier.
- ✓ **M**aier S. et Eckmann C., (2020). Fournier gangran als senderform der nekrotisierenden Fasziiitis. *Der Chirurg*, 91(4), 307-312.
- ✓ **M**andal, Sb. et Mandal, M., (2015). Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essentiel oil : chemistry and biological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 5, Issue 6. pp421-428.
- ✓ **M**anfred et Nicol Moll. , (2000). Précis des Risques Alimentaires (2eme tirage). Edition TEC et DOC, London, Paris, NEW YORK. p 6, 243.
- ✓ **M**ergenhagen K. A., Croix M., Starr K. E., Sellick J. A. et Lesse A. J., (2020). Reply to

Sfeir, « Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal screening : Clinical use for excluding diabetic foot infection with MRSA ». *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(7).

- ✓ Mewes S, Krüger H, Pank F., (2008). Diversités physiologiques, morphologiques, chimiques et génomiques de différentes origines du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Genet Resour Crop Evol* 55: 1303–1311.
- ✓ Mohamad Ali Chakass, Françoise Boussioud Corbières, Jean-Pierre Reduron. ,(2011). "Étude palynologique de quatre espèces d'Apiacées alimentaires et médicinales (L., Lam., Mill., (Mill.) Fuss) au Liban", *Acta Botanica Gallica*.
- ✓ Mohammad Jamal Saharkhiz, Marjan Motamedi, Kamiar Zomorodian, (2012). Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L... *ISRN Pharmaceutics*, vol 2012.
- ✓ Mulyukin AL., Suzina NE., Melnikov VG., Galchenko VF., EL'-Registan G.L., (2014). Dormant state and phenotypic variability of staphylococcus aureus and corynebacterium pseudodiphtheriticum. *Microbiologie* (00262617). Vol. 83 Numéro 1/2, p149-159. 11p.
- ✓ Modungo C., (2018). Effet d'un traitement combinant hautes pressions et bioconservation sur l'inactivation et la reprise de croissance des spores de *Bacillus* et *Clastridium*. Thèse de doctorat en génie des procédés alimentaires. Université de Bourgogne Franche-Comté. France.
- ✓ Mahfouf N., Bennadja S., Nasri H., Djahoudi A., Heni S., (2017). Antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Origanum vulgare* L. Against *Escherichia coli* strains. *Researchgate*. 5 :1391-1399.
- ✓ Mayachiew P. et Devahastin S., (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*. 41; pp. 1153-1159.
- ✓ Menaceur F., (2015). Contribution à l'étude photochimique et biologique de l'érigéron, du fenouil commun, de la lavande et du gévrier. Thèse de doctorat en sciences alimentaires. Ecole nationale supérieure agronomique El-Harrach-Alger.
- ✓ Mohammedi Z., (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.
- ✓ Magalhaes, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77: 1559-1566.
- ✓ Mohammedi Z, Bachik S, Belkaroube N.,(2010).Potentiel antifongique et anti aflatoxinogène des huiles essentielles d'une *Thymus fontanesii* Boiss and Reut. Les

technologies de laboratoire. 5 (19), 10-15.

- ✓ Moghtader, M., (2013). In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *Afr. J. Plant Sci.* 7, 521–527.
- ✓ McFarland, J., (1907). The nephelometer : an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Assoc.* 49 : 1176-1178.



- ✓ Nabih N. et Abou-Taleb M., (2007). Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1): pp. 01-09.
- ✓ **NF EN ISO 6888-1/A1 (janvier 2004)**. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) - Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker (IC : V08-014-1)
- ✓ **NF-ISO 6888-3 (Juin 2003)** .Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de Staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et d'autres espèces). Partie 3 : Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres.
- ✓ **NF V08-057-1 (Janvier 2004)** : Microbiologie alimentaire - Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C - Partie 1 : Technique avec confirmation des colonies. (*en cours de révision*).
- ✓ **NF V59-105 (Octobre 1982)** : Gélatine alimentaire - Recherche de *Staphylococcus aureus*.



- ✓ Obame engona L. C., (2009). Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse de doctorat en sciences biologiques appliquées. Université de Ouagadougou.
- ✓ Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Glover, R. L., et Jespersen, L., (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional furaprocesing in Ghana. *Food microbiology*, 32(1), 72-78.
- ✓ Ouakouak H., Adel Benarfa 2, Messaoudi M., Begaa S., Barbara S., Benchikha N. et Simal-

Gandara J., (2021). Propriétés Biologiques des Huiles Essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. Plants. (10), 786.

- ✓ O'Bryan, Californie ; Pendleton, SJ; Crandall, PG ; Ricke, SC., (2015). Potentiel des huiles essentielles végétales et de leurs composants en agriculture animale – études *in vitro* sur le mode d'action antibactérien. De face. Veter-Sci. 2.



- ✓ Peter Y., Wong Y., David D., Kitts, (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97: 505-515.
- ✓ Pinto, L., Cefola, M., Bonifacio, MA, Cometa, S., Bocchino, C., Pace, B.,... Baruzzi, F., (2021). Effet des vapeurs d'huile de thym rouge (*Thymus vulgaris* L.) sur la décomposition fongique, les paramètres de qualité et la durée de conservation des oranges pendant l'entreposage au froid. *Food Chemistry*, 336, 127590. doi: 10.1016 / j.foodchem.2020.127590.
- ✓ Pascoe B., Dans L., Wilkinson TS., Harris LG., Bodger O., Mack D., et al. ,(2014). Dormant cells of *staphylococcus aureus* are resuscitated by spent culture supernatant. Schliever PM edition. PLOSONE. 9:e85998. Doi : 10-1371/ journal.pone, 0085998.
- ✓ Prescott C.E., Hope G.D., Belvins L.L., (2003). Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianaе*. 55: 64-72.
- ✓ 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. *Society of Food Science and Technology*. 36(7), 679-684.



- ✓ Ramanathan, H., (2010). Food Poisoning Threat to Humans. Marsland Press. New York, USA. 66 p.
- ✓ Ray, B., et Bhunia, A., (2013). Fundamental Food Microbiology (5e éd.). CRC Press.
- ✓ Raymond M., (2005). L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université de Nantes, 25 ; 27 ; 34 ; 42 ; 62 ; 67p.

- ✓ **Riccioni L.** et Orzali L., (2012). Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) Essential Oils against Some Pathogenic Seed Borne Fungi". *Journal of Essential Oil Research*, vol. 23, n°6, pp 43-47.
- ✓ **Riedel S.,** Morse S. A., Mietzmer T.A. et Miller S., (2019). Jawecs Melnick and Adelbergs Medical microbiology 28 E (28<sup>e</sup> éd.). McGraw-Hill education / Medical.
- ✓ **Rossetto O,** Megighian A, Scorzeto M, Montecucco C., (2013). Botulinum neurotoxins. *Toxicon*; 67:31-6.
- ✓ **Ryan K. J.,** Ahmad N., Alspaugh A. J., Drew L. W., Laggunoff M., Pottinger P., Reller B. I., Reller M. E., Sterling C. R. et Weissman S., (2018). Sherris medical microbiology, Seventh Edition (7<sup>e</sup> éd.). McGraw-Hill education / Medical.



- ✓ **Satyal P,** Murray BL, McFeeters RL, Setzer WN., (2016) .Caractérisation des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* à partir de divers emplacements géographiques. *Aliments* 5:70.
- ✓ **Saulat Jahan. ,** (2012). Epidemiology of Foodborne Illness, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, Dr. Benjamin Valdez (Ed.), ISBN: 978-953-307-916-5, InTech, Stage, Option : Alimentation, Nutrition et Santé, Filière : Sciences Alimentaires et Nutrition: Institut Nationale de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires.
- ✓ **Schmid H,** Baumgartner A., (2013). Foyers de TIA en Suisse, Statistiques actuelles, tendances future directives pratiques pour l'analyse des flambées et rappel historique. Confédération suisse ; Département fédéral de l'intérieur DFI Office fédéral de la santé publique 3003 Berne, Suisse.
- ✓ **Sergelidis D.** et Abraham A., (2009): Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control*, 20, 1-10.
- ✓ **Silva F.,** Ferreira S., Duarte A., (2014). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 19(1):42–7.

- ✓ **Silva F, Ferreira S, Queiroz JA, Domingues FC. , (2011).** Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J Med Microbiol* 1479–86.
- ✓ **Singh Rajinder, Muftah A.M. Shushni et Asma Belkheir., (2015).** Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita L...* *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, n°3, pp 322-328.
- ✓ **Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K. and Nychas G.J.E., (2001).** Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli O157:H7*. *Italian Journal of Food Science*, 13(1), 65-75.
- ✓ **Smaoui, S., A. B. Hsouna, A. Lahmar, K. Ennouri, A. Mtibaa-Chakchouk, I. Sellem, S. Najah, M. Bouaziz et Mellouli L., (2016).** "Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat." *Meat science* 117: 196-204.
- ✓ **Samber, N.; Khan, A.; Varma, A.; Manzoor, N., (2015).**Activité anti-candida synergique et mode d'action de l'huile essentielle de *Mentha piperita* et de ses principaux composants. *Pharmacie. Biol.* 53, 1496-1504.
- ✓ **Sujana, P.; Sridhar, TM; Josthna, P.; Naidu., (2013).**CV Activité antibactérienne et analyse phytochimique de *Mentha piperita L.* (menthe poivrée) - Une importante plante médicinale polyvalente. *Un m. J. Plante. Sci.* 4, 77-83.
- ✓ **Sun C., Wang Y., Ma S., Zhang S., Liu D., Wang Y., et Wu C., (2021).** Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and enterococci from food products at retail in Beijing, China. *Food control*, 119, 107483.
- ✓ **Saba, I.; Anwar, F., (2018).**Effet des régions de récolte sur les attributs physico-chimiques et biologiques de la menthe verte extraite par fluide supercritique (*Mentha spicata L.*) Leaves Essential Oil. *J. Essent. Ours à pétrole. Plantes.*21, 400-419.
- ✓ **Singh, R.; Shushni, MA ; Belkheir, A., (2015).** Activités antibactériennes et antioxydantes de *Mentha piperita L.* *Arab. J. Chem.* 8, 322-328.



- ✓ **Taleb S., Messat M et Boulakehal N., (2019).** Les toxi-infections alimentaires individuelles et collectives. *Bulletin de santé, chu de Constantine.* Vol 5. pp3-7.
- ✓ **Tanouti, A., (2016).** Microorganismes Pathogenes Portes Par les Aliments : classification,

epidemiologie et moyens de prévention. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Pharmacie. Université MOHAMMED V-RABAT, Faculté de Medecine et de Pharmacie. 85p.

- ✓ Teuscher E., Anton R., Lobstein A., (2005). Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 521p
- ✓ Tisserand M., (2014). Aromatherapy vs MRSA: Antimicrobial essential oils to combat bacterial infection, including the superbug. Singing Dragon, 192p.
- ✓ Toe E., (2018). Évaluation des facteurs de risques de bio contamination par *Salmonella* et *Escherichia coli* virulents de la chaîne alimentaire des légumes à Abidjan (Côte d'Ivoire). Thèse de doctorat. Université Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire).
- ✓ Tannous, Joanna. Patuline., (2015). mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes : nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approches préventives. PhD, Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- ✓ Tadjeddine N., Lassouani A. et Benabdallah Keddari A., (2021). anti-microbial study of *Schinus molle* L. fruit essential oil western Algerian region. Rhazes: Green and Applied Chemistry, Volume 11, N°2, 108-117.
- ✓ Tullio, V.; Roana, J.; Scalas, D.; Mandras, N., (2019). Evaluation of the Antifungal Activity of *Mentha piperita* (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. *Molecules*, 24.



- ✓ Uzal FA, Francis P.J., Songer J.G., Popoff M.R., (2016). General Physiological and Virulence Properties of the Pathogenic Clostridia. *Clostridial Diseases of Animals*. John Wiley. Oxford. pp. 7–11.



- ✓ Vierling E., (2008). *Aliments et boissons : filières et produits*. France : Éditions Doin.
- ✓ Vandepitte J. et al., (1991). *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. Geneva. World Health Organization.

## W

- ✓ **Waltner-Toews D., Zinsstag J., Schelling E., Whittaker M.A., Tanner M. et coord., (2020).** Théorie et pratique des approches intégrées de la santé. *One health-une seule santé*. France. Edition Quae.
- ✓ **Willey J., Sherwood L. et Woolverton C. J., (2021).** Prescott's microbiology (10e éd.). McGraw-Hill education.
- ✓ **Wu, Z. ; Tan, B.; Liu, Y.; Dunn, J.; Guerola, PM ; Tortajada, M.; Cao, Z. ; Ji, P., (2019).** Composition chimique et propriétés antioxydantes des huiles essentielles de menthe poivrée, de menthe verte native et de menthe verte écossaise. *Molécules*, 24, 2825.
- ✓ **World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. 1981.** Technical report series 673 (Révision 1981). W.H.O., Geneva – p156-192.

## Y

- ✓ **Yang, X.-N.; Khan, I.; Kang, SC., (2015).** Composition chimique, mécanisme d'action antibactérienne et activité antioxydante de l'huile essentielle de feuille d'arbuste à feuilles caduques *Forsythia koreana*. *Pac asiatique. J. Trop. Méd.* 8, 694-700.

## Z

- ✓ **Zhang P., Chang C., Liu H., Li B., Yan Q., et Jiang Z., (2020).** Identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of functional foods*, 65, 103751.
- ✓ **Ziane, M., (2015).** Caractérisation, identification et étude de la thermorésistance de souches de *Bacillus cereus* isolées de semoule de couscous. Thèse doctorat. Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
- ✓ **Zorana Kovacevic, Miodrag Radinovic, Ivana Cabarkapa, Nebojša Kladar et Biljana Božin. , (2021).** Agents naturels contre les agents pathogènes de la mammites bovine. *Antibiotiques*. 10, 205.
- ✓ **Zweifel C., Zychowska M.A. et Stephan R., (2004).** Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* isolated

from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal-Food Microbiol.* 92, 45.

- ✓ Zaidi, S.; Dahiya, P., (2015). Activité antimicrobienne in vitro, analyse phytochimique et contenu phénolique total de l'huile essentielle de *Mentha spicata* et *Mentha piperita*. *Int. Res. J.* 22, 2440-2445.



**ANNEXE**

**Annexe I : Doses minimum infectantes des principaux agents pathogènes de TIAC (Schmidet *al.*, 2013 ; Chiguer, 2014)**

Agents pathogènes	Dose minimum infectante(UFC/g)
<i>Salmonella enterica</i>	10 à 10 <sup>6</sup> /g
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ 10 <sup>5</sup> /g
<i>Clostridium perfringens</i>	+ 10 <sup>5</sup> /g
<i>Listéria monocytogenes</i>	10 <sup>5</sup> /g à 10 <sup>6</sup> /g
<i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>5</sup> /g
<i>Escherichia coli O : 157</i>	<10/g
<i>Shigella spp</i>	<10/g
<i>Campylobacter jejuni</i>	10 <sup>4</sup> /g à 10 <sup>5</sup> /g
Novovirus	10 à 100 unités virales
Virus de l'hépatite A	Pas d'indication, mais le virus se transmet facilement ce qui indiquerait que la dose infectieuse est faible
<i>Giardia Lamblia</i>	L'ingestion de quelques kystes
<i>Entamoeba histolytica</i>	1000 kystes
<i>Cryptosporidium parvum</i>	10 à 30 oocystes

**Annexe II : Bactéries incriminées dans les TIAC dans les pays du Maghreb et en France (INSP, 2010).**

Germe	Forme	Production de toxines	Pays Maghreb	France	Facteurs de contamination	Syndrome
<i>C. botulinium</i>	S	+	+	+	Conserves familiales mal stérilisées	N/V
<i>Salmonella</i>	V	+	+	+	Aliments peu ou pas cuits (viandes, volailles, œufs, fruits de mer)	D
<i>S. aureus</i>	V	+	+	+	Lait et produits laitiers, crèmes, pâtisseries, mayonnaises	D
<i>Shigella</i>	V	+	+	+	Alimentation peu ou pas cuites	D
<i>E. coli</i>	V	+	+	+	Viandes, volailles, lait cru, eau non chlorée	D
<i>C. perfringens</i>	S	+	+	+	Plats cuisinés la veille (viandes en bouillon, sauce)	D
<i>Campylobacter jejuni</i>	V	+	+	+	Volailles, viandes rouges, lait non pasteurisé	D
<i>Bacillus cereus</i>	S	+	-	+	/	D
(+) : recherché (-) : non recherché			(N/V) : Symptômes neurologiques ou vasomotrices (D) : Symptômes digestives			

### Annexe III : Bilan des toxi-infections alimentaires collectives en France en 2019(Fouillet, 2021)

<b>TIAC déclarées aux ARS ou DDPP, France, 2019</b>						
<b>Agent</b>	<b>Foyers</b>		<b>Malades</b>		<b>Hospitalisations</b>	
	N	%(‡)	N	%(‡)	N	%(‡)
<b>Total agents confirmés <sup>(1)</sup></b>	<b>390</b>	<b>22</b>	<b>4 577</b>	<b>29</b>	<b>281</b>	<b>46</b>
<i>Salmonella dont*</i> :	139	36	807	18	161	57
Enteritidis	35	25	213	26	53	33
Typhimurium	45	32	258	32	42	26
Variant monophasique Typhimurium	3	2	17	2	3	2
Autres sérotypes**	5	4	85	11	6	4
Sérotypes indéterminés	51	37	234	29	57	35
<i>Campylobacter</i>	55	14	241	5	23	8
<i>Bacillus cereus</i>	62	16	988	22	37	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	4	107	2	8	3
<i>Clostridium perfringens</i>	39	10	957	21	10	4
Norovirus	49	13	1 342	29	18	6
Histamine	8	2	41	1	4	1
Toxine diarrhéique DSP	1	0	3	0	0	0
Autres pathogènes <sup>(2)</sup>	20	5	91	2	20	7
<b>Total agents suspectés<sup>(3)</sup></b>	<b>1 102</b>	<b>62</b>	<b>8 789</b>	<b>56</b>	<b>227</b>	<b>37</b>
<i>Salmonella</i>	44	4	327	4	9	4
<i>Campylobacter</i>	6	1	38	0	1	0
<i>Bacillus cereus</i>	293	27	2 155	25	46	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	428	39	2 369	27	89	39
<i>Clostridium perfringens</i>	35	3	687	8	1	0
Virus	230	21	2 846	32	38	17
Histamine	28	3	181	2	18	8
Toxine diarrhéique DSP	14	1	97	1	8	4
Autres pathogènes <sup>(4)</sup>	24	2	89	1	17	7
<b>Total agents indéterminés <sup>(5)</sup></b>	<b>291</b>	<b>16</b>	<b>2 275</b>	<b>15</b>	<b>101</b>	<b>17</b>
<b>Total foyers</b>	<b>1 783</b>	<b>100</b>	<b>15 641</b>	<b>100</b>	<b>609</b>	<b>100</b>

‡ Pour les différents agents (*Salmonella*, *Clostridium perfringens*...) % du total des agents confirmés ou suspectés

\* Pour les sérotypes de salmonelles, % du total des salmonelles confirmées

\*\* Autres sérotypes : 2 TIAC *S. Infantis*, 1 Chester, 1 Munster, 1 Thompson

(1) Foyers dans lesquels un agent pathogène compatible avec les signes cliniques présentés par les malades est isolé dans un échantillon d'origine humaine (selles, sang, vomissement) et / ou dans les aliments consommés par les malades

(2) STEC (2), *Clostridium Botulinum* (1), *Shigella* (9), *Yersinia enterocolitica* (3), Ciguatera (5)

(3) Foyers dans lesquels aucun agent pathogène n'a été retrouvé ou recherché. L'agent est alors suspecté à partir de la durée médiane d'incubation, des signes cliniques présentés par les malades et des aliments suspectés.

(4) Ciguatera (14), *Vibrio parahaemolyticus* (3), Datura (2), STEC (1), Toxique (3), *Shigella* (1)

(5) Foyers répondant à la définition d'une TIAC, mais dans lesquels les informations recueillies n'ont pas permis de suspecter un agent

\* (Agence régionale de santé (ARS) et/ou Direction départementale (de la cohésion sociale) de la protection des populations (DD(CS)PP))

**Annexe IV:** Composition chimique de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* L. (Abdelli, 2017 et Zorana et al., 2021)

Espèce	Familles	Compositions (%)		
		Références	(Abdelli, 2017)	(Zorana et al., 2021)
<i>Thymus vulgaris</i>	<b>Phénols (20 - 80%)</b>	<b>Thymol</b>	<b>(30 - 70)</b>	<b>45.22</b>
		Carvacrol	(3 - 15)	2.55
	<b>Alcools</b>	Linalool	(4 - 6.5)	2.55
		$\alpha$ -terpinéol	(7.8 – 8.9)	0.23
	<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>	<i>p</i> -cymène	(15 – 20)	23.83
		$\gamma$ -terpinène	(5 – 10)	3.12
		bornéol, camphre, limonène, myrcène, $\beta$ -pinène, <i>trans</i> sabinène hydrate et terpinène-4-ol	(0.5 – 1.5)	(0.21-1.71)
	<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>	$\beta$ -caryophyllène	(1 – 3)	4.91

**Annexe V:** Composition chimique de l'huile essentielle du *Mentha x piperita*.

Espèce	Compositions (%)			
	Références	(Benabdallah, 2018)	(De Oliveria, 2016)	(Beigi, 2018)
<i>Mentha piperita</i>	$\alpha$ -pinène	2.1	0.8	<b>1.2</b>
	Sabinène		0.4	0.9
	$\beta$ -Pinène	1.6	1.3	1.6
	$\alpha$ -Terpinène			0.4
	<i>p</i> -Cymène		0.1	0.3
	Limonène	3	3.5	2.6
	Eucalyptol	6.7	2.1	8.2
	$\gamma$ -Terpinène		0.1	0.6
	Terpinolène		0.1	0.2
	Linalool		0.1	0.3
	<b>Menthone</b>	<b>20.4</b>	11	13

	Menthofurane		<b>22.5</b>	<b>11.9</b>
	Isomenthone	7.3		
	neo-isomenthol		0.2	3.7
	<b>Menthol</b>	<b>49.9</b>	27.5	3.5
	$\alpha$ -Terpinéol			
	cis-Isopulégone	0.4	12.8	
	Pipéritone		0.6	0.4
	<b>Acétate menthyle</b>		12.5	<b>8.7</b>
	$\beta$ -Bourbonène			0.2
$\beta$ -Caryophyllène		0.5	1.5	
Germacrène D			1.7	

**Annexe VI : Effets bénéfiques des huiles essentielles de la coriandre, menthe poivrée et du Thym pour l'homme et sur le produit**

<b>Espèce</b>	<b>Coriandre <i>Coriandrum sativum</i></b>	<b>Menthe poivrée <i>Mentha x piperita</i></b>	<b>Thym <i>Thymus vulgaris L.</i></b>
<b>Effet Bénéfique pour l'homme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Tonique digestive.</li> <li>→ Antimicrobienne.</li> <li>→ Antidouleurs.</li> <li>→ Antifatigue.</li> <li>→ Stimule la mémoire.</li> <li>→ Comestible et non toxique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimule le système nerveux, Tonique générale,</li> <li>Antispasmodique gastrique et colique,</li> <li>Augmente la pression sanguine et d'énergie cardiaque (Dilatation des vaisseaux sanguins par application externe),</li> <li>Emménagogue,</li> <li>Action sur le système respiratoire (expectorant dans l'asthme, la bronchite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>→ Antiseptique.</li> <li>→ Antibiotique.</li> <li>→ Antibactérien majeur.</li> <li>→ Anti-infectieux.</li> <li>→ Exportant (contre les inflammations de la sphère respiratoire)</li> <li>→ Efficace contre les infections intestinales, gastro-entérite, intoxication alimentaire, diarrhées infectieuses.</li> <li>→ Astringente, antitussive, vermifuge, tonique (et neurotonique psychique).</li> <li>→ immunostimulante et rééquilibrante.</li> </ul>

		chronique), Antimicrobienne, Action dans la tuberculose, Analgésique, Action sur la peau.	
<b>Effet Bénéfique sur le produit</b>	<p>→ Maintien la durée de conservation des aliments en empêchant la détérioration microbienne.</p> <p>→ Associer les propriétés gustatives et produire un effet esthétique comme arôme, épice et herbe médicinale.</p>		<p>Selon (RESALA) Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments ou l'application par vaporisation en surface d'aliments contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation.</p>
<b>Référence</b>	<b>(Mandal et al., 2015)</b>	<b>(Erceau et Pasquier, 2016)</b>	<b>(Boughendjioua, 2015 ; Pinto, 2021)</b>

**Annexe VII : Évolution du nombre de foyers par agent causal et personnes concernées en Belgique (2006-2019)**  
**(Denayer et al., 2020)**

TIAC (nombre)														
Agent	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<i>Salmonella</i>	14	8	3	5	5	2	6	10	5	4	2	2	3	5
<i>Staphylococcus</i>	7	5	2	2	0	2	2	4	3	4	2	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	6	7	2	4	4	8	2	4	11	5	0	1	4	1
<i>Campylobacter</i>	5	2	6	4	3	5	1	9	1	2	3	4	2	1
Norovirus	4	10	7	7	7	2	9	1	5	2	7	3	3	3
<i>E. coli</i> <i>O157/STEC</i>	1	2	3	1	2	3	3	10	1	2	2	2	2	1
<i>Listeria</i>	3	5	1	2	0	1	0	2	1	0	0	0	0	2
<i>C. perfringens</i>	0	0	1	4	0	0	0	2	1	0	4	2	0	2
Autres	10	1	6	8	6	5	9	9	4	4	0	3	3	2
Pas d'échantillons			23	36	58	170	195	192	227	248	289	241	312	469
Inconnu	66	40	50	32	21	83	100	68	111	80	68	46	68	85
<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>80</b>	<b>104</b>	<b>105</b>	<b>106</b>	<b>281</b>	<b>327</b>	<b>311</b>	<b>370</b>	<b>351</b>	<b>377</b>	<b>304</b>	<b>397</b>	<b>571</b>
Personnes touchées (nombre)														
Agent	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<i>Salmonella</i>	134	99	39	68	55	7	38	33	80	68	139	14	554	216
<i>Staphylococcus</i>	48	69	32	24	0	7	3	59	36	112	25	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	175	57	10	53	88	87	24	30	46	83	0	3	12	4
<i>Campylobacter</i>	48	10	31	8	304	103	2	45	2	10	6	18	6	2
Norovirus	154	348	439	91	258	13	94	20	275	29	205	90	223	41
<i>E. coli</i> <i>O157/STEC</i>	2	16	11	4	6	8	30	41	2	8	14	10	6	3
<i>Listeria</i>	3	5	2	4	0	11	0	4	2	0	0	0	0	4
<i>C. perfringens</i>	0	0	100	43	0	0	0	88	17	0	302	182	0	36
Autres	32	17	5	27	3 058	229	192	45	23	9	0	19	49	49
Pas d'échantillons			105	169	305	521	544	575	842	850	862	774	979	1 504
Inconnu	436	230	67	364	137	553	557	372	464	504	436	299	387	598
<b>Total</b>	<b>1 032</b>	<b>851</b>	<b>841</b>	<b>855</b>	<b>4 211</b>	<b>1 539</b>	<b>1 484</b>	<b>1 312</b>	<b>1 789</b>	<b>1 673</b>	<b>1 989</b>	<b>1 409</b>	<b>2 216</b>	<b>2 457</b>

**Annexe VIII : (Arrêté N° 179/MS/CAB du 17 Novembre 1990)**

**Liste des  
Maladies à Déclaration Obligatoire (MDO)  
en Algérie**

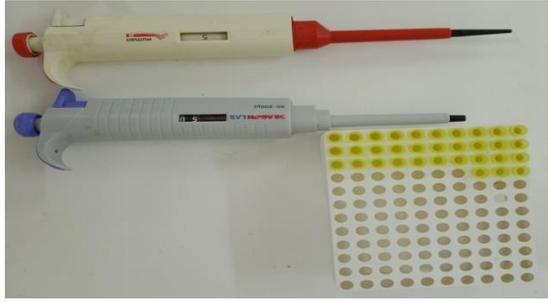
- Nombre : Trente deux (32) maladies infectieuses
- Elles sont groupées en fonction de leur mode de transmission
- Liste :
  - Choléra
  - Fièvre typhoïde et paratyphoïde
  - Dysenteries amibiennes et bacillaires
  - Toxi-infections alimentaires collectives
  - Hépatites virales
  - Diphtérie
  - Tétanos
  - Coqueluche
  - Poliomyélite
  - Rougeole
  - Méningite cérébro-spinale
  - Autres méningites non tuberculeuses
  - Tuberculose
  - Paludisme
  - Leishmaniose cutanée
  - Leishmaniose viscérale
  - Kyste hydatique
  - Rage
  - Charbon
  - Brucellose
  - Bilharziose
  - Lèpre
  - Leptospirose
  - Urétrite gonococcique
  - Urétrite non gonococcique
  - Syphilis
  - Infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV)
  - Typhus exanthématique
  - Autres rickettsioses (fièvre boutonneuse méditerranéenne)
  - Peste
  - Fièvre jaune
  - Trachome

## Annexe IX : Matériel et Appareillage du laboratoire

**Tableau I : Matériels utilisés.**

Appareillages	Outils de laboratoire	Milieux de culture solides	Autres produits
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ordinateur de laboratoire munis d'APIWEB (logiciel)</li> <li>• Etuve.</li> <li>• Autoclave.</li> <li>• Stérilisateur.</li> <li>• Bain Marie.</li> <li>• Microscope optique.</li> <li>• Réfrigérateur</li> <li>• Etuve 37°C.</li> <li>• Etuve 44°C.</li> <li>• Etuve 55°C</li> <li>• Etuve 25°C.</li> <li>• pH-mètre.</li> <li>• Densitomètre</li> <li>• Homogénéisateur</li> <li>• Sacs stomacher</li> <li>• Becher</li> <li>• Plaque chauffante</li> <li>• Balance de précision</li> <li>• Balance électrique</li> <li>• Agitateur magnétique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipette.</li> <li>• Pied à coulisse.</li> <li>• Pipette Pasteur.</li> <li>• Anse de platine.</li> <li>• Tubes à essais stérile.</li> <li>• Portoir</li> <li>• Lame et lamelle.</li> <li>• Tubes secs.</li> <li>• Flacon sterile</li> <li>• Boite de pétri</li> <li>• Pince métallique.</li> <li>• Ecouvillons.</li> <li>• Seringues stériles.</li> <li>• Poire.</li> <li>• Bec Benzen.</li> <li>• Bocal et eau de javel.</li> <li>• Spatule</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gélose VRBL.</li> <li>• Gélose TGEA.</li> <li>• Gélose OGA.</li> <li>• Gélose Sabouraud+chloramphénicol.</li> <li>• Gélose Hektoen.</li> <li>• Gélose Hektoen.</li> <li>• Gélose Muller-Hinton (MH).</li> <li>• Gélose nutritive.</li> <li>• Gélose viande de foie</li> <li>• Bouillon BHIB</li> <li>• Bouillon nitrate</li> <li>• Gélose chapman</li> <li>• Gélose XLD</li> <li>• Milieu citrate de simons.</li> <li>• Milieu TSI</li> <li>• Milieu Clark et lups</li> <li>• Milieu mannitol mobilité</li> <li>• Milieu urée indole</li> <li>• Milieu bouillon nitrate</li> <li>• Milieu Moeller (ADH/ODH/ODC)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcool à 70%.</li> <li>• Huile de vaseline.</li> <li>• Huile à immersion.</li> <li>• Eau oxygénée.</li> <li>• Eau physiologique.</li> <li>• DMSO</li> <li>• Tween 80°</li> <li>• Huiles essentielles</li> <li>• disque vierge (6mm et 9mm de diamètre).</li> <li>• Plasma humain.</li> <li>• Disques d'antibiotiques (6 mm de diamètre) contenant l'ATB à des concentrations déterminées.</li> <li>• Diluant TSE.</li> <li>• Bouillon SFB (DC/SC)</li> </ul> <p><b>Réactifs</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Réactif Zim A et Zim B</li> <li>• Réactif de Voges Proskauer (VPI, VPII).</li> <li>• Réactif de Kovacs.</li> <li>• Réactif de James.</li> <li>• Réactif de Grisse (Nitrate I et NitrateII).</li> <li>• Rouge de methyl.</li> </ul> <p><b>Colorants</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Violet de Gentian.</li> <li>• Lugol.</li> <li>• Fuchine.</li> <li>• Bleu de méthylène</li> </ul> <p><b>Additifs</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Tellurite de potassium</li> <li>Alun de fer</li> <li>Sulfite de sodium</li> </ul>

## Annexe X: Matériel non biologique



**Figure 01:** Micropipette de 5 et de 50-200 $\mu$ l.



**Figure 02:** Stérilisateur (Kronos B23. Newmed, Italy).



**Figure 03 :** Pied à coulisse de 0-150mm.



**Figure 04 :** Bain-marie (Référence : 6001196, J.P. Selecta, Espagne).



**Figure 05 :** Etuve de 25°C, 37°C, 55°C et 44°C (Référence : 2001243, J.P., Espagne).

## Annexe XI : Matériel biologique



**Figure 06 :** Huile essentielle de coriandre.



**Figure 07 :** Huile essentielle de la menthe poivrée.



**Figure 08 :** Huile essentielle du thym.

## Annexe XII : Préparation des milieux de cultures

### A. Préparation du milieu Miller-Hinton (BIO-RAD, 2009)

#### 1. Composition théorique en (g/l d'eau distillée\*)

Le milieu Mueller-Hinton avec ou sans addition de sang de mouton est préparé selon la formule décrite par W.H.O.

- Infusion de viande 2,0
- Hydrolysate de caséine 17,5
- Amidon de maïs 1,5
- pH final  $7,3 \pm 0,1$
- $\text{Ca}^{2+}$  20 - 25 mg/L
- $\text{Mg}^{2+}$  10 - 12,5 mg/L

\*Formule adaptée pour assurer les meilleures performances du milieu.

#### 2. Technique de préparation

- Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.
- Mélanger 25 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Stériliser à l'autoclave à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes. Répartir en tubes ou flacons stériles.



Figure 09 : Préparation de milieu Muller Hinton.

### B. Préparation du bouillon cœur de cervelle (BIO-RAD, 2011)

### 1) Composition théorique

Peptone	10 g
Extrait de cervelle	12,5 g
Extrait de cœur	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Hydrogénophosphate disodique anhydre	2,5 g
Glucose	2 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final =  $7.4 \pm 0,2$

### 2) Technique de préparation

Toujours agiter avant chaque utilisation. Dissoudre 37 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (chauffer si nécessaire). Répartir à raison de 5 ou 10 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes.

## Annexe XIII : Préparation des témoins

### 1) Préparation du témoin d'opacité (turbidité) Mac Farland 0,5 (McFarland J, 1907)

- Ajouter 0,5 ml d'une solution à 0,048 mol/L de  $\text{BaCl}_2$  (1,175% p/v  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à 99,5 ml d'une solution 0,18 mol/L (0,36 N) de  $2\text{SO}_4$  (1% v/v) et agiter vigoureusement.
- Vérifier la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et des cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 et 0,13.
- Distribuer la suspension dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. Sceller les tubes.
- Une fois scellés, conserver ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Avant usage, mélanger vigoureusement le tube à l'aide d'un Vortex (6 mois de conservation). Cette suspension est préparée afin de réaliser l'aromatogramme.



**Figure 10 :** suspension calibrée à 0,5 MF (échelle d'opacité) comparée avec de l'eau distillée

### 2) Préparation de l'antifongique

Nous avons préparé une solution mère de 500mg de Fluconazole diluée dans 50ml d'eau distillé, puis agitée à l'aide d'un vortex pendant 30min.



**Figure 11 :** Solution préparée d'antifongique (Fluconazole).

### 3) Préparation d'antibiotique

Nous avons préparé une solution mère de 80mg/2ml de Gentamicine diluée dans 50ml d'eau distillé, puis agitée à l'aide d'un vortex pendant 30min.

A partir de la solution mère, nous avons préparé les solutions filles suivantes, en se basant sur la loi de la dilution  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ , dont :

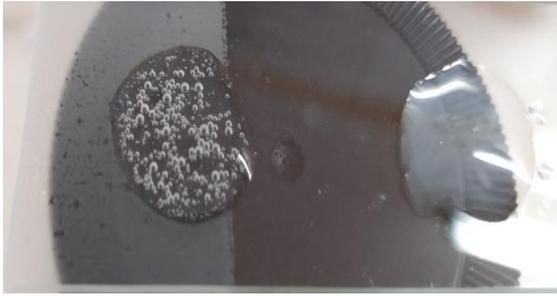
$C_1$  : Concentration de la solution mère 1mg/ml

$V_1$  : Volume de la solution mère

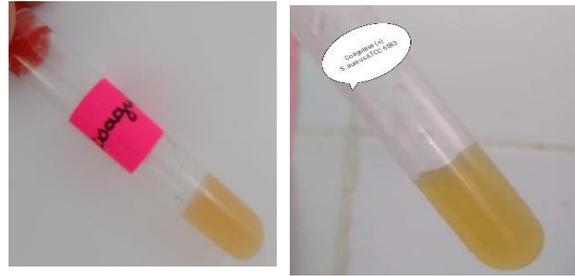
$C_2$  : Concentration de la solution fille

$V_2$  : Volume de la solution fille (dans notre travail nous avons choisis le volume 25ml)

## Annexe XIV : Identification des Cocci à Gram (+)



**Figure 12 :** Résultat du Test Catalase (+) de *S. aureus*.



**Figure 13:** Résultat du Test Coagulase (+) de *S. aureus* isolée de la denrée alimentaire (B) Réaction Coagulase (+) d'une souche *S. aureus* ATCC 6583 (Témoin+).



**Figure 14 :** (A) Galerie Api-Staph d'identification biochimique de *Staphylococcus* avant incubation  
(B) Résultat d'identification de *Staphylococcus aureus* par de la galerie Api-Staph après 24h d'incubation à 37°C.



**Figure 15 :** Solution *Staph*-médium d'enrichissement de *S. aureus*.

Identification Microbienne via les API [Mode de compatibilité] - Excel

Fichier Accueil Insertion Mise en page Formules Données Révision Affichage Aide Rechercher des outils adaptés

Police Alignement Nombre Styles

TÉLÉCHARGER UNE VERSION AUTHENTIQUE D'OFFICE Votre licence n'est pas authentique et vous êtes peut-être victime d'une contrefaçon logicielle. Évitez toute interruption et protégez aujourd'hui vos fichiers grâce à la version authentique d'Office. Obtenir une version authentique

API 20 Staph	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR	P(taxon/profil)	P(taxon/profil)	P(plus typique)	S	taxons
profil	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-				1,00E-05	
Staphylococcus aureus	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	1,99E+39	97,8%	1,99E+39	1,00	Staphylococcus aureus
Staphylococcus auricularis	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0	9,09E+29	0,0%	1,23E+39	-0,83	-
Staphylococcus capitis	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0	1,43E+33	0,0%	3,60E+38	-0,08	-
Staphylococcus carnosus	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0	2,13E+33	0,0%	1,71E+39	-0,18	-

Staphylococcus aureus	Exc Id
T	1,00
GLU	+
FRU	+
MNE	+
MAL	+
LAC	+
TRE	+
MAN	+
XLT	-
MEL	-
NIT	+
PAL	+
VP	+
RAF	-
XYL	-
SAC	+
MDG	-
NAG	+
ADH	+
URE	+
LSTR	-

15	VP	+
16	RAF	-
17	XYL	-
18	SAC	+
19	MDG	-
20	NAG	+
21	ADH	+
22	URE	+
23	LSTR	-

Figure16: Identification de *Staphylococcus aureus* par le logiciel de lecture Excel Staph-Api.

## Annexe XV : Table de lecture de la galerie miniaturisée (API 20STAPH)

Tests	Composant actif	Réaction/Enzyme	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>0</b>	Aucun	Témoin Négatif	Rouge	-
<b>GLU</b>	D-glucose	Témoin Positif	Rouge	Jaune
<b>FRU</b>	D-fructose	Acidification	Rouge	Jaune
<b>MNE</b>	D-mannose			
<b>MAL</b>	D-maltose			
<b>LAC</b>	D-lactose (origine bovine.			
<b>TRE</b>	D-tréhalose			
<b>MAN</b>	D-mannitol			
<b>XLT</b>	Xylitol			
<b>MEL</b>	D-mélibiose			
<b>NIT</b>	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	<b>NIT 1 +NIT2/ 10min</b>	
			Incolore/rose pale	Rouge
<b>PAL</b>	$\beta$ -naphtylphosphate	Phosphatase Alcaline	<b>ZYM A + ZYM B/ 10 min</b>	
			Jaune	Violet
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl-carbinol	<b>Réactifs VP1 + VP2/ 10mn</b>	
			Incolore/Rose pale	Rose/violet
<b>RAF</b>	D-raffinose	Acidification	Rouge	Jaune
<b>XYL</b>	D-xylose			
<b>SAC</b>	D-saccharose			
<b>MDG</b>	Méthyl- $\alpha$ D-glucopyranoside			
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine			
<b><u>ADH</u></b>	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/Orange
<b><u>URE</u></b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/Violet

## Annexe XVI : Identification des bacilles à Gram (-)



Figure 17 : Résultat de la galerie classique de *Salmonella*.

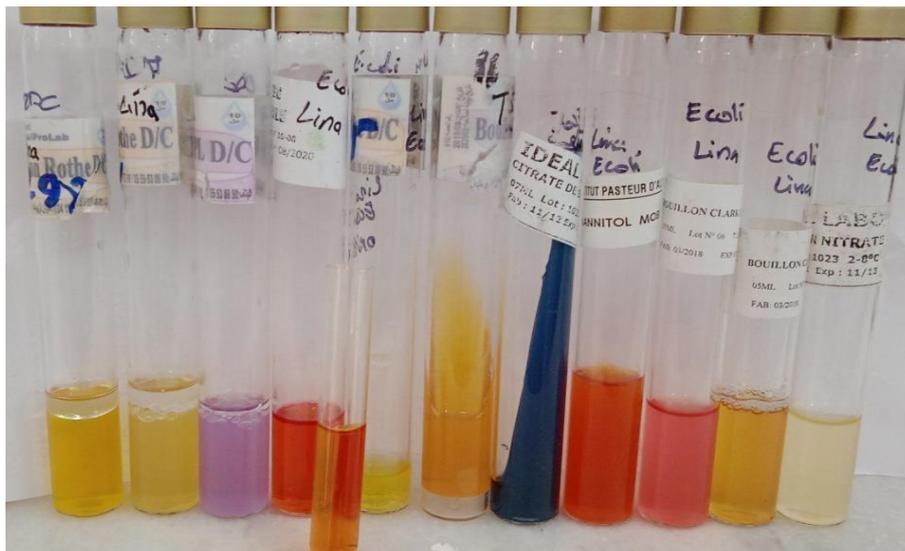
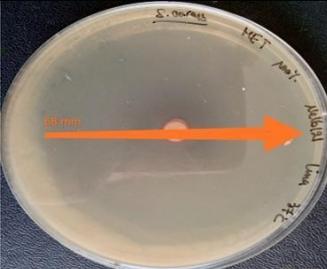
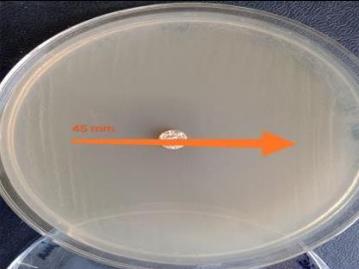
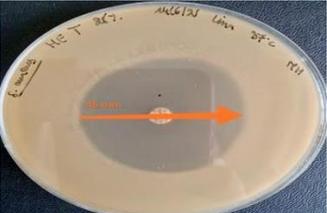
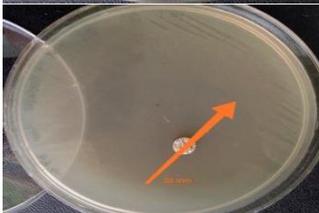
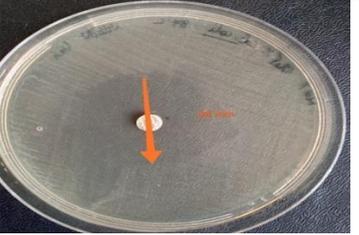
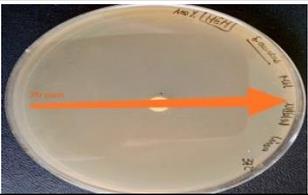
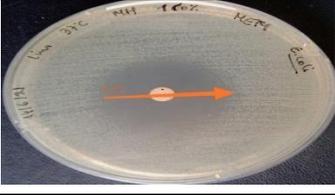
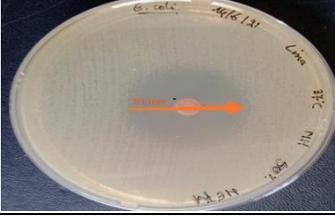


Figure 18 : Résultat de la galerie classique de *Escherichia coli*.

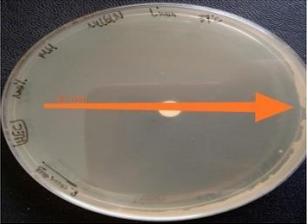
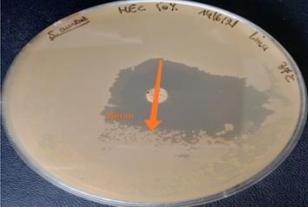
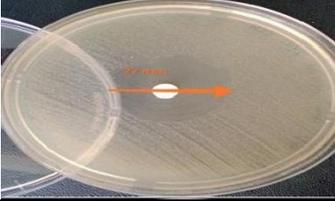
**Annexe XVII : Résultats d'activité antimicrobienne des huiles essentielle**  
**Tableau II** : Figures de diamètres des zones d'inhibition (DZI) des trois souches bactériennes étudiées vis-à-vis huile essentielle du *Thymus vulgaris*

[C] %	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
100			
50			
25			
12,5			
6,25			

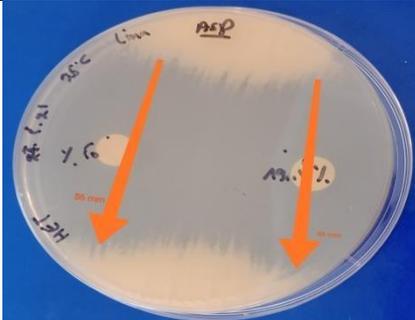
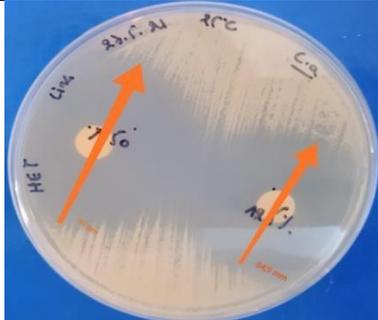
**Tableau III :** Figures de diamètres des zones d'inhibition (DZI) des trois souches bactériennes étudiées vis-à-vis huile essentielle du *Mentha piperita*

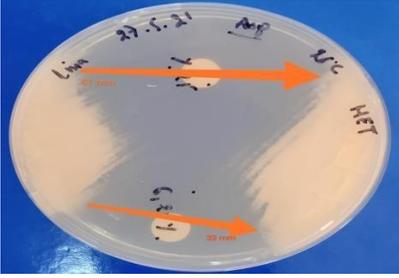
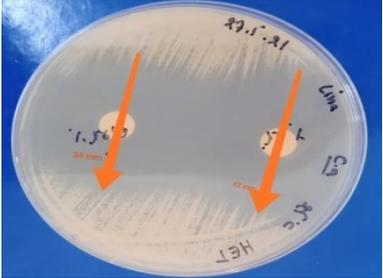
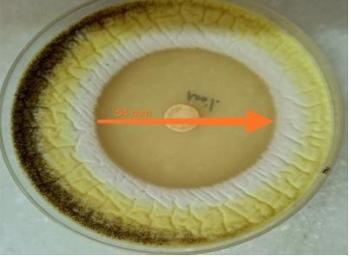
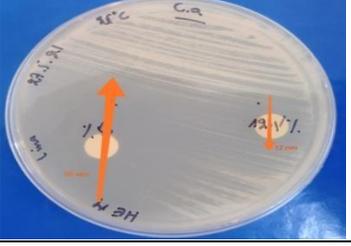
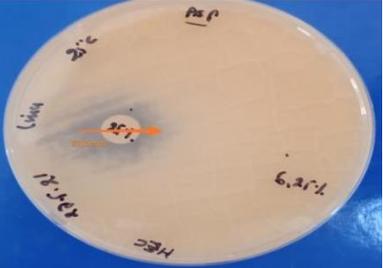
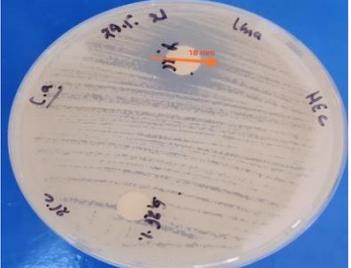
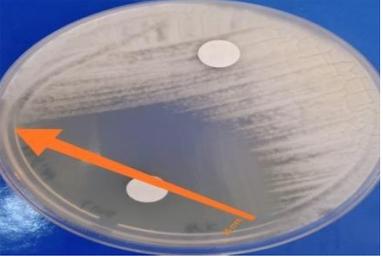
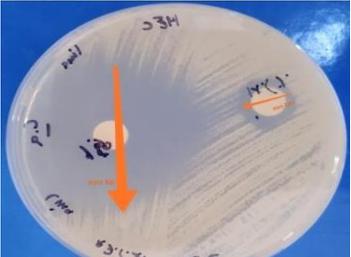
[C] %	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
100			
50			
25			
12,5			
6,25			

**Tableau IV :** Figures de diamètres des zones d'inhibition (DZI) des trois souches bactériennes étudiées vis-à-vis huile essentielle du *Coriandrum sativum*

[C] %	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
100			
50			
25			
12,5			
6,25			

**Tableau V :** Figures de diamètres des zones d'inhibition (DZI) des deux souches fongiques étudiées vis-à-vis les trois huiles essentielle

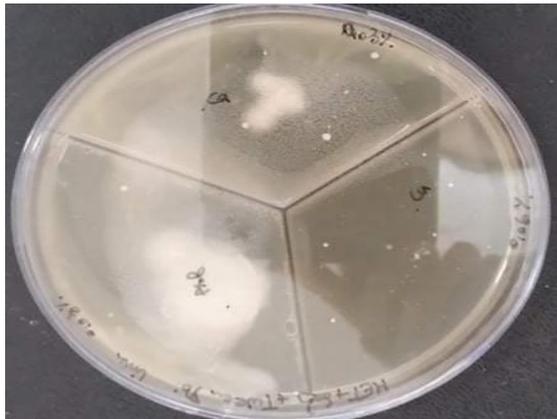
HE	Concentrations (%)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
HET	50 ; 12,5		

	25 ; 6,25		
	100		
HEM	50 ; 12,5		
	25 ; 6,25		
HEC	100		
	25 ; 6,25		
	50 ; 12,5		

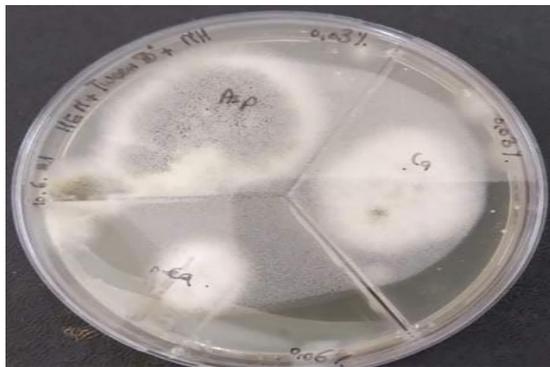
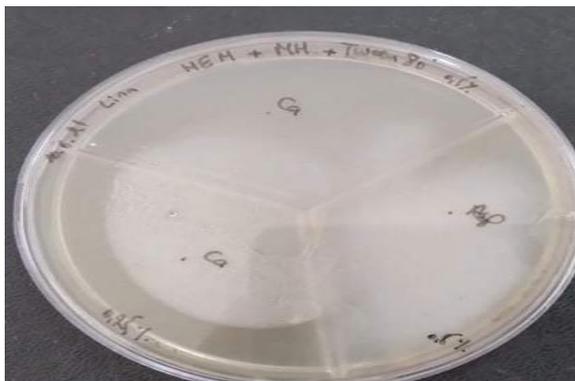
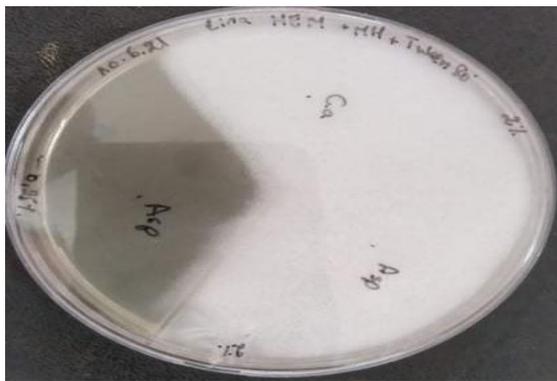
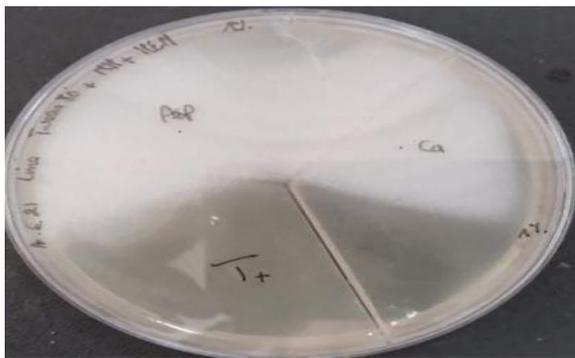
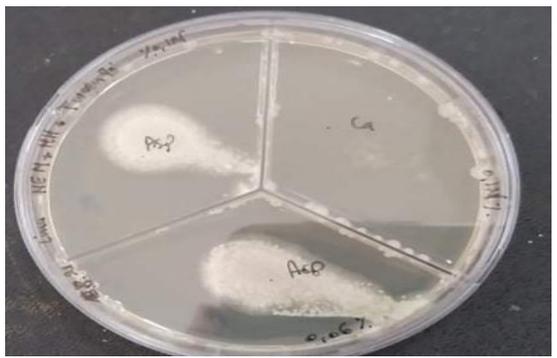
**Tableau VI :** Figures des résultats de la concentration minimale fongicide des trois huiles essentielles testées sur *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

HEC		
HET		

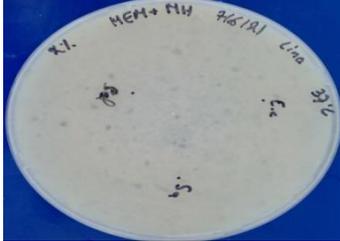
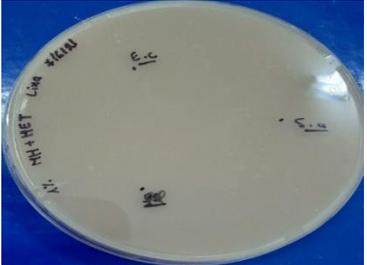
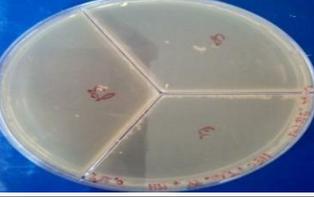
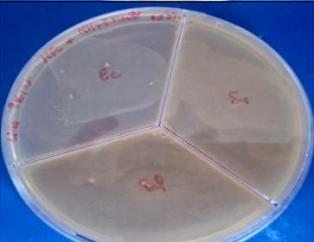
HET

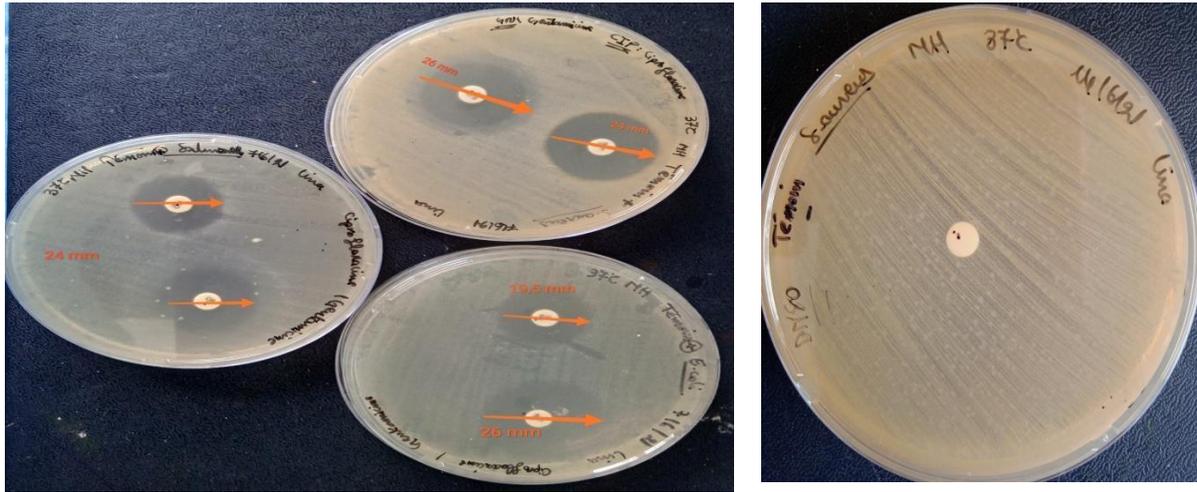


HEM

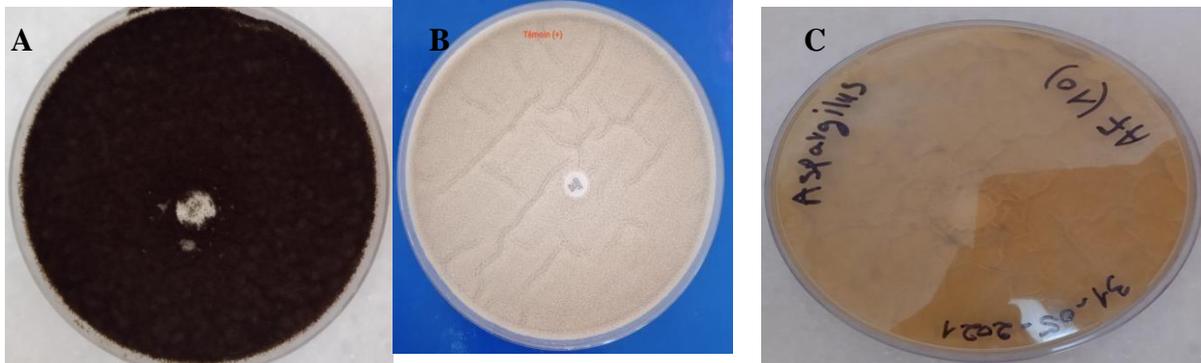


**Tableau VII :** Figures des résultats de la concentration minimale fongicide des trois huiles essentielles testées sur *E. coli* ; *S. aureus* et *Salmonella*.

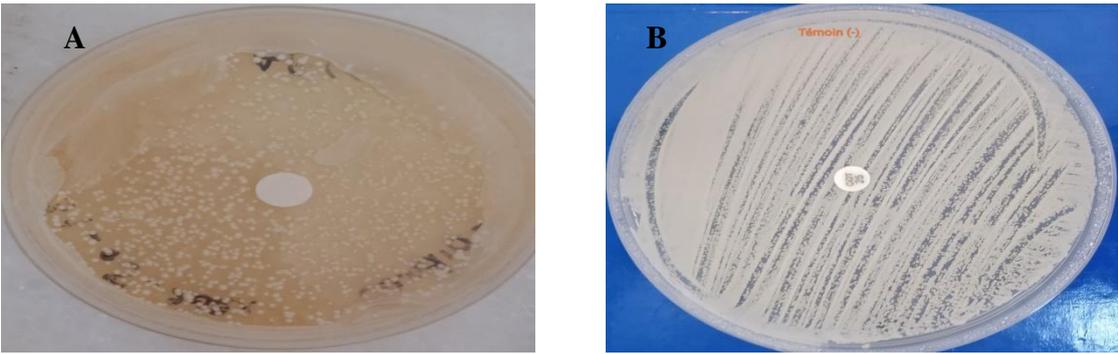
C(%)	HET	HEM	H
2			
1			
0,5			
0,25			
0,125			
0,06			
0,03			



**Figure 19 :** (A) Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques (Gentamicine et Chloramphénicol) sur les souches bactériennes étudiées. (B) Effet du témoin négatif le Démethylsulfoxyde(DMSO) sur *Staphylococcus aureus*.



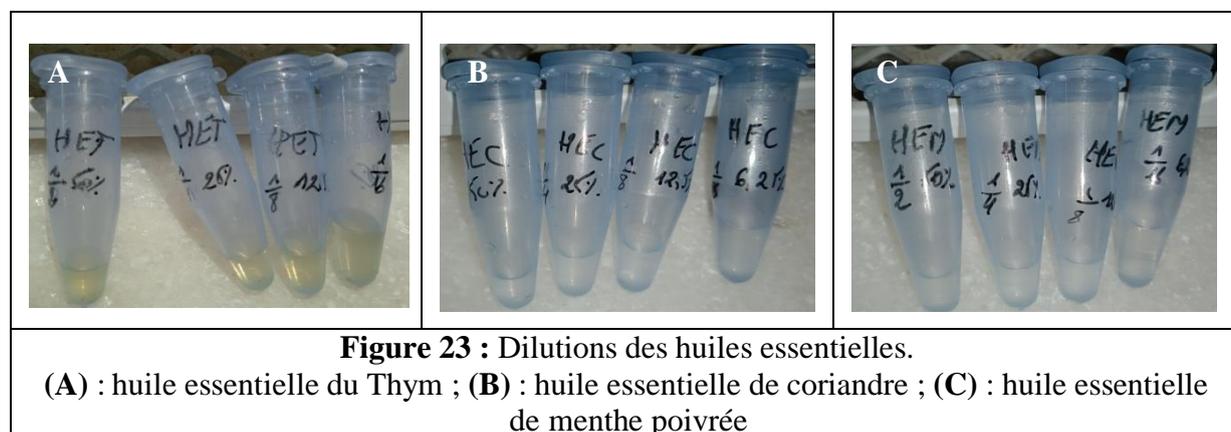
**Figure 20 :** Effet des antifongiques sur la croissance d'*Aspergillus niger* (A) Fluroconazole , (B) : Cotrimoxazole et (C) : Amphotricine B.



**Figure 21 :** Effet des antifongiques sur la croissance de *Candida albicans* (A) Fluroconazole et (B) : Cotrimoxazole



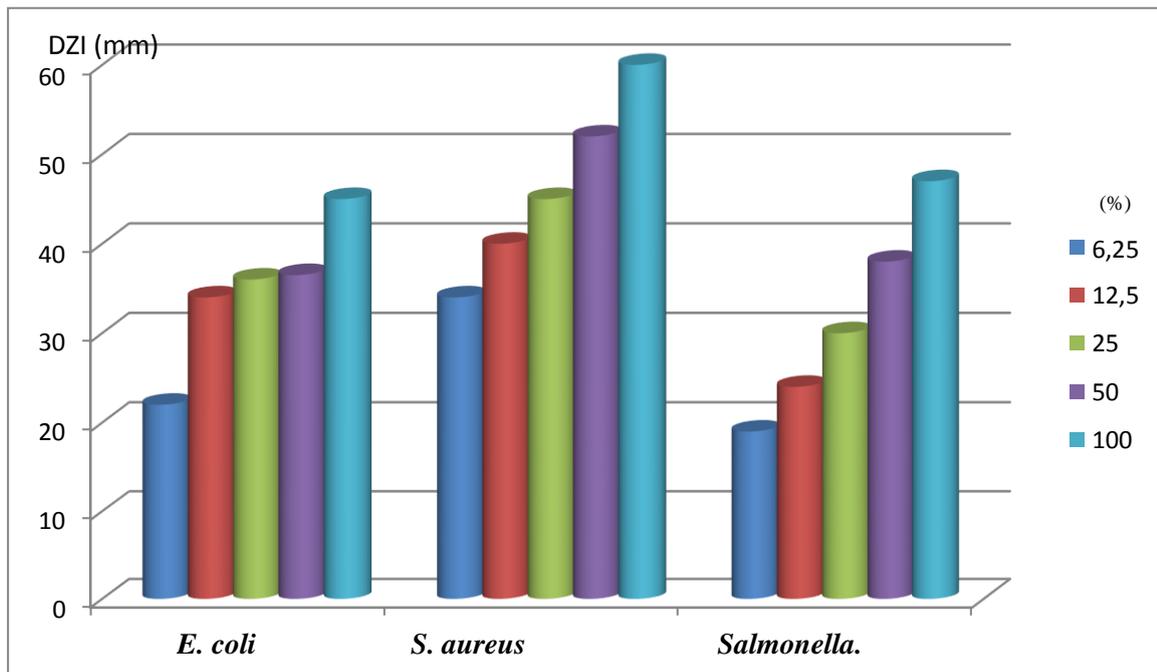
**Figure 22** : Mesure du diamètre de la zone d'inhibition (DZI) par un pied de coulisse.



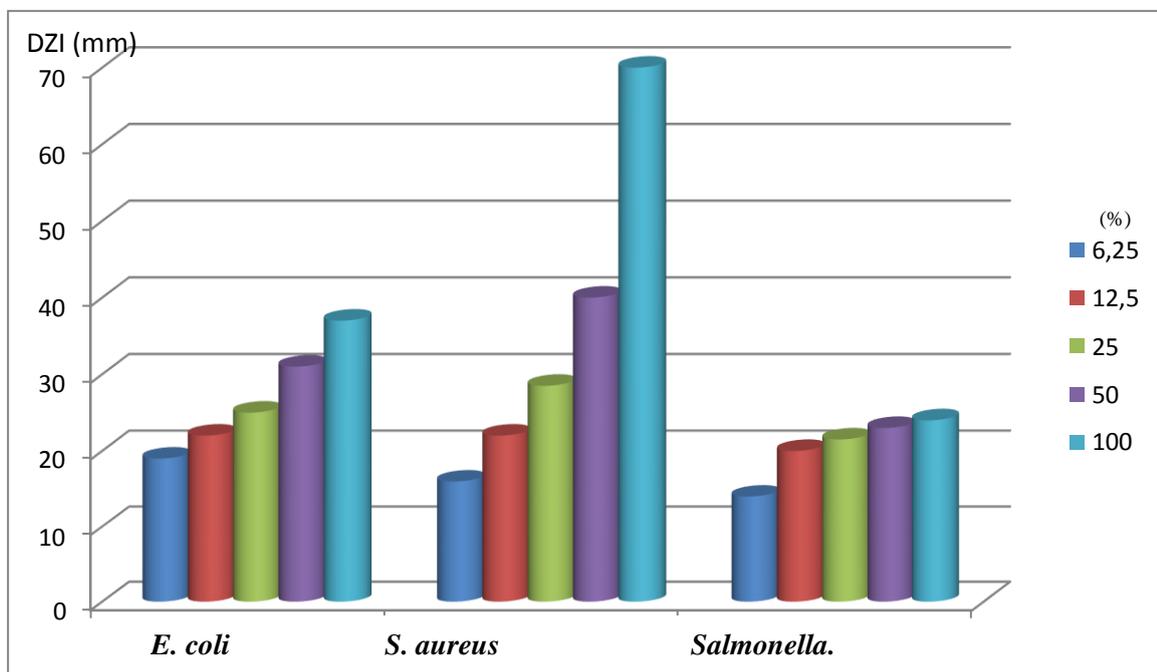
**Figure 23** : Dilutions des huiles essentielles.

(A) : huile essentielle du Thym ; (B) : huile essentielle de coriandre ; (C) : huile essentielle de menthe poivrée

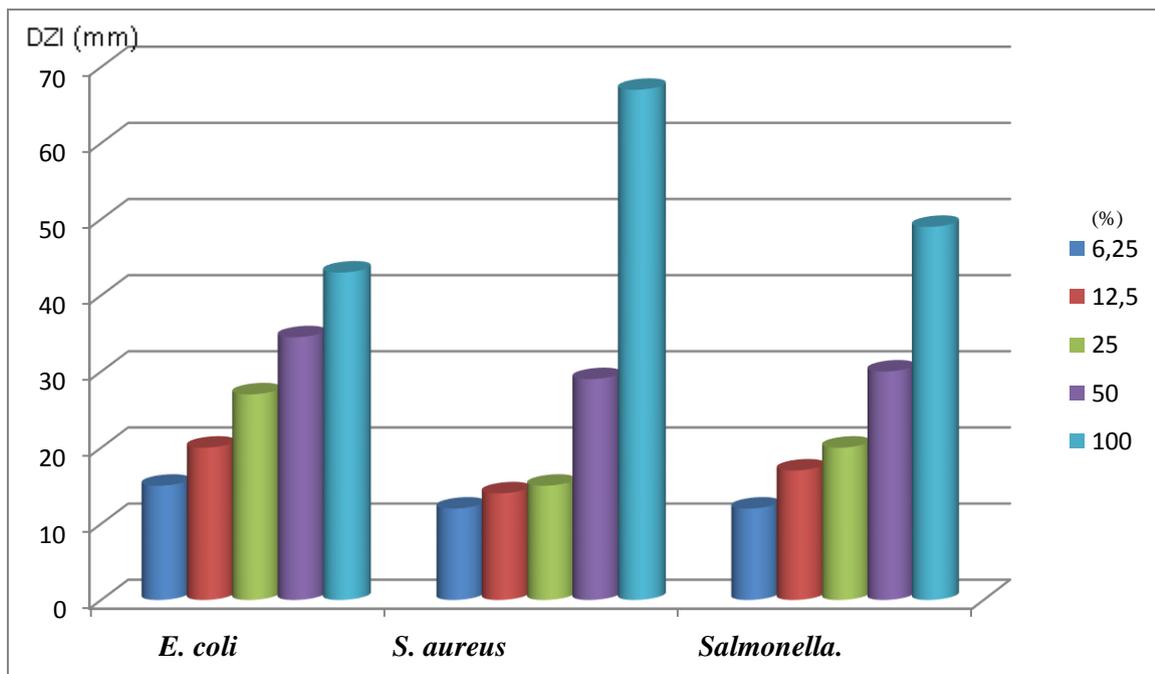
## Annexe XVIII : Résultats d'activité qualitative des huiles essentielles



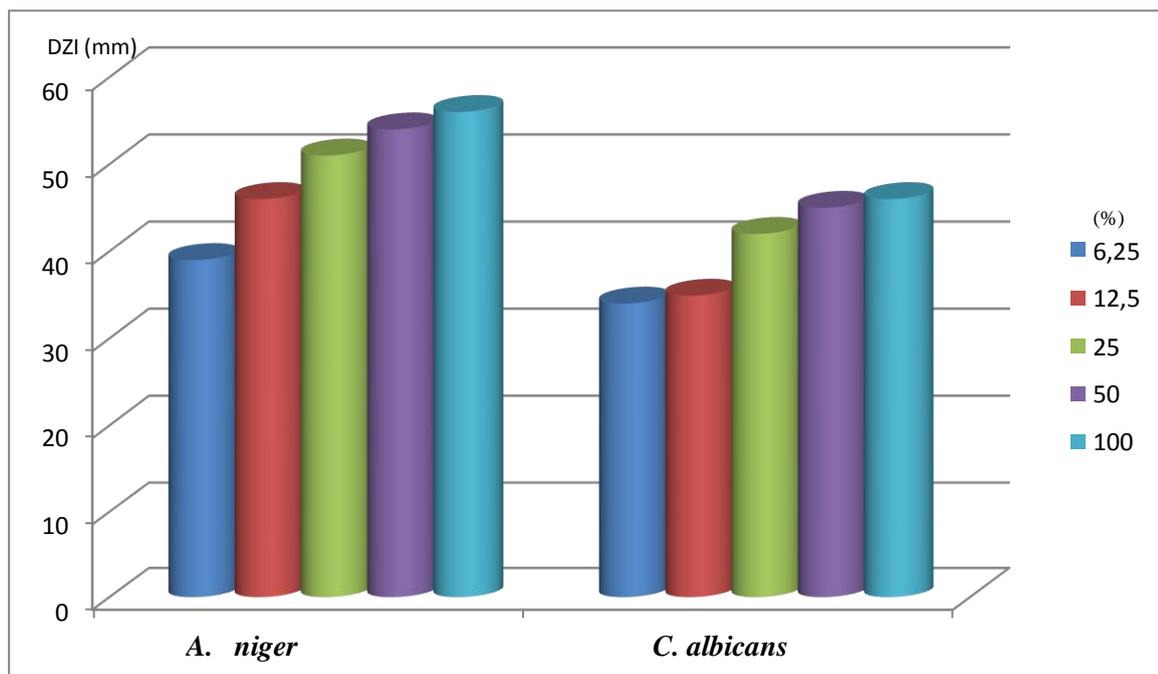
**Figure 24 :** Effet de l'huile essentielle de Thym à différentes concentration (%) sur les bactéries isolées.



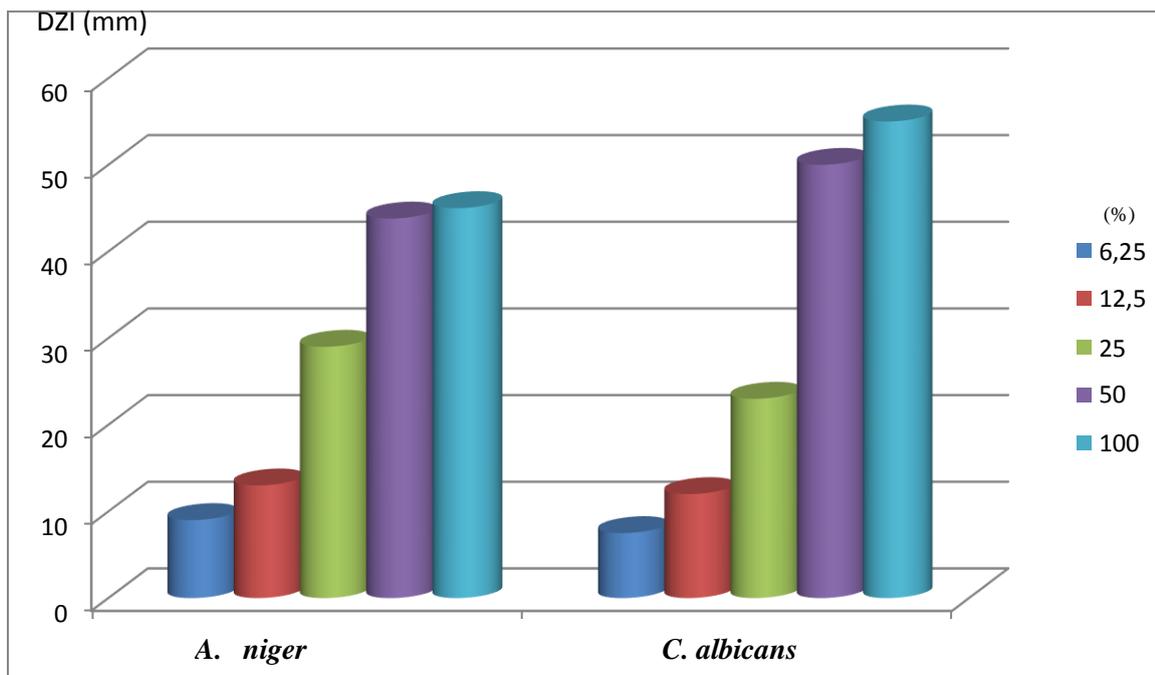
**Figure 25 :** Effet de l'huile essentielle de Menthe poivrée à différentes concentration(%) sur les bactéries isolées.



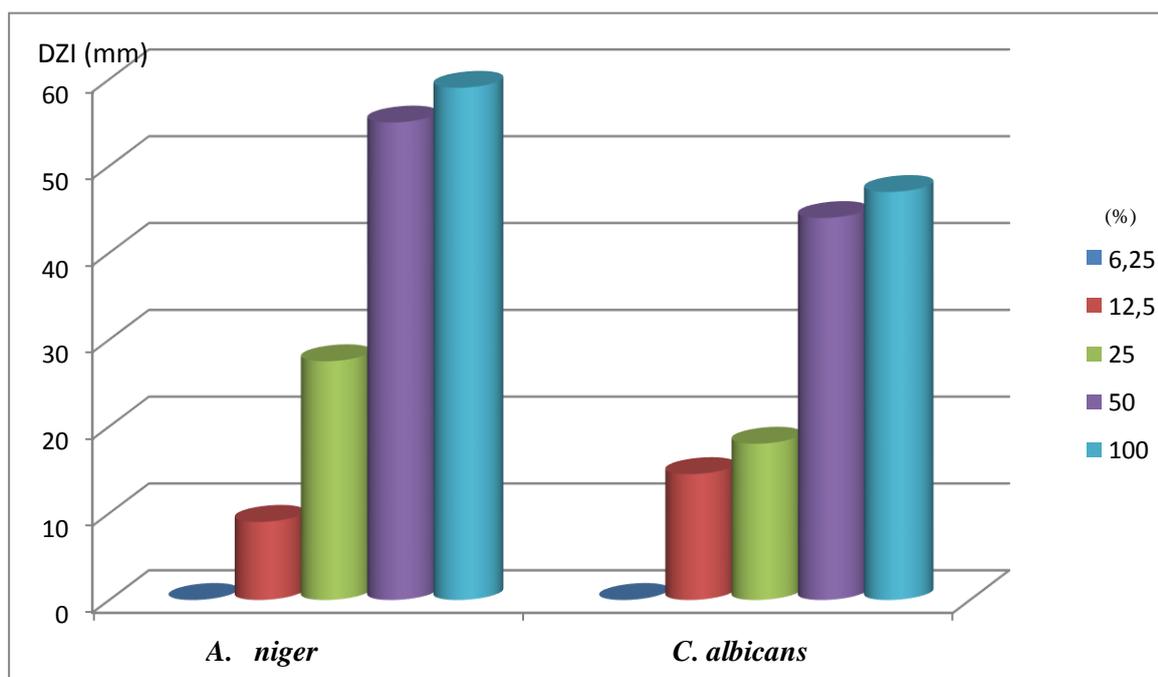
**Figure 26 :** Effet de l'huile essentielle de Coriandre à différentes concentration (%) sur les bactéries isolées.



**Figure 27 :** Effet de l'huile essentielle de Thym à différentes concentration (%) sur les souches fongiques.



**Figure 28** : Effet de l'huile essentielle de menthe poivrée à différentes concentration(%) sur les souches fongiques.



**Figure 29** : Effet de l'huile essentielle de coriandre à différentes concentration (%) sur les souches fongiques.

## **Annexe XIX**

### **Contrôle microbiologique des denrées alimentaires après conservation**

L'étude microbiologique concerne l'identification et la recherche de germes indésirables de contamination afin de vérifier la qualité hygiénique de la viande hachée et du fromage frais.

L'analyse microbiologique a été réalisée en trois étapes : La préparation des dilutions, l'ensemencement dans les milieux de culture appropriés et le dénombrement des microorganismes.

Chaque test doit être répété pendant la conservation.

#### **1. Préparation de la solution mère**

Une prise de 25g de fromage et/ou de viande est mélangée à 225ml de diluant (TSE) cette préparation correspond à la solution mère.

#### **2. Préparation des dilutions décimales**

Les dilutions décimales sont effectuées dans des conditions strictes d'asepsie, en prenant des tubes stériles dans lesquels on pipette aseptiquement 9 ml de liquide diluant.

On prélève 1 ml dans la suspension de départ à l'aide d'une pipette de 1 ml après l'avoir homogénéisée soigneusement sur Agitateur-Vortex et on la porte dans le premier tube de dilution ( $10^{-1}$ ). On homogénéise le contenu de ce tube  $10^{-1}$  et l'on ensemence le tube  $10^{-2}$  et ainsi de suite en changeant à chaque fois de pipette jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-7}$ .

#### **3. Détermination de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)**

La flore mésophile est l'ensemble de germes capables de se multiplier à l'air libre avec une croissance optimale à 30°C. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du produit et pourra donner une indication sur son état de fraîcheur ou de décomposition (**Guiraud, 2012**). Le dénombrement est réalisé sur gélose TGEA. Le milieu est ensemencé dans la masse avec un millilitre des dilutions  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  après incubation à 30°C pendant 72 heures puis on compte les colonies formées.

## **4. Recherche des germes indicateurs de contamination fécale**

### **a. Coliformes totaux**

Le dénombrement des coliformes totaux comme microorganismes marqueurs d'une contamination fécale pour les fromages est la plus approprié ainsi que pour les viandes (**Guiraud, 2003**).

Pour le dénombrement de ce groupe, on utilise le milieu VRBL. Un volume de 1 ml d'inoculum est ensemencé en masse et incubé à 37°C pendant 24 heures (**Joffin et Joffin, 2000**). L'inoculation est réalisée sur gélose VRBL, par ensemencement en masse à raison de 1ml des dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  dans chaque boîte de pétri et incubation à 37°C pendant 24 heures.

### **b. Dénombrement des coliformes fécaux**

Le dénombrement des coliformes fécaux est effectué par l'ensemencement en surface sur milieu VRBL en surface, à raison de 0,1ml des dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  dans chaque boîte de pétri et couler le milieu et incubé à 44°C pendant 24 heures.

## **5. Recherche des germes pathogènes**

### **a) Staphylocoques dorés**

La maîtrise de la contamination des produits laitiers et des viandes par *Staphylococcus aureus* est un enjeu économique et sanitaire. Ce germe provoquant une toxi-infection alimentaire, leur dénombrement est effectué en deux étapes :

- Enrichissement dans le milieu liquide Giolittii-Cantoni, additionné de tellurite de potassium, ensemencé par les dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  puis incubation à 37°C pendant 48 heures. Les tubes comptés positifs sont ceux qui présentent un noircissement.
- Ensemencement par étalement avec 0,1 ml à partir des tubes positifs, sur milieu Chapman puis incubation à 37°C pendant 24 heures à 48 heures (**Guiraud, 2012**).

### **b) Recherche de *Salmonella***

Ce sont les germes les plus dangereux du point de vue sanitaire, leur recherche s'effectue pour suivre l'évolution de la qualité sanitaire de produits finis. Leur présence dans les aliments peut provoquer des intoxications alimentaires. La méthode utilisée pour la recherche des

Salmonelles est décrite dans l'Arrêté du 23 janvier 2005 publié dans le JORA n° 42 du 15 juin 2005.

**Jour 1 :** Pré-enrichissement : 25 g de fromage ou de viande hachée sont introduits dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée préalablement stérilisée. La préparation est homogénéisée sur vortex et incubée à 37°C pendant 16 à 20 heures.

**Jour 2 :** Enrichissement : L'enrichissement proprement dit, se fait à partir du milieu de pré-enrichissement en introduisant 10 ml en double dans des flacons de SFB (Selenite-F Broth) l'incubation se fait à 37°C et à 44°C.

**Jour 3 :** Isolement : Chaque flacon fera l'objet d'un isolement sur deux milieux gélosés différents à savoir : milieu gélosé Hektöen et Gélose SS.

**Jour 4 :** Lecture des boîtes et identification : Cinq colonies caractéristiques et distinctes font l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

### c) Recherche et dénombrement des *Clostridium sulfito-réducteurs*

Les *Clostridium* sont des bacilles Gram (+), souvent de grande taille, généralement mobiles. Elles sont capables de sporuler. Ces germes sont catalase (-) et anaérobies. Cependant l'espèce *Clostridium sulfito-réductrice* qui a l'aptitude à sporuler, est le signe d'une contamination fécale ancienne (Guiraud, 2003).

On chauffe les tubes contenant 2 ml des dilutions  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  à 80 °C pendant 8 à 10 min. Puis à un refroidissement immédiat sous courant d'eau, dans le but d'éliminer les formes végétatives et garder uniquement les formes sporulées.

Porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes puis ajouter environ 20 ml de gélose viande de foie (VF) et 4 gouttes d'Alun de fer et 1 ml de sulfate de sodium.

## 6. Levures et moisissures

A partir des dilutions décimales,  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ , un volume de 0,1 ml est porté aseptiquement dans une boîte de Pétri contenant de la gélose Sabouraud au chloramphénicol ou OGA. Les gouttes sont étalées à l'aide d'un râteau stérile, puis incubées à 25 °C pendant 5 jours.

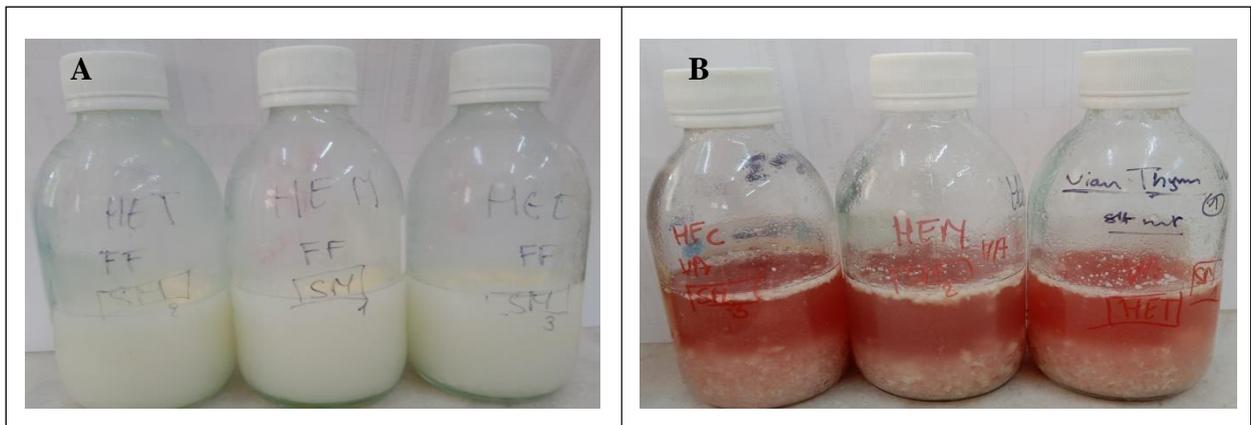
Dans le souci de ne pas se retrouver en face des boites envahies, soit par les levures soit par les moisissures, les lectures et les dénombrements sont réalisés tous les jours à part pour les levures et pour les moisissures.

Les colonies des levures et des moisissures se présentent sous des aspects lisses et filamenteux, respectivement. L'opération est exécutée de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le même diluant. Une boîte du milieu utilisé est incubée telle quelle, dans le même endroit et les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu  
**(Giraud, 2012**

## Annexe XX : Résultats des tests d'application des huiles essentielles sur les denrées alimentaires

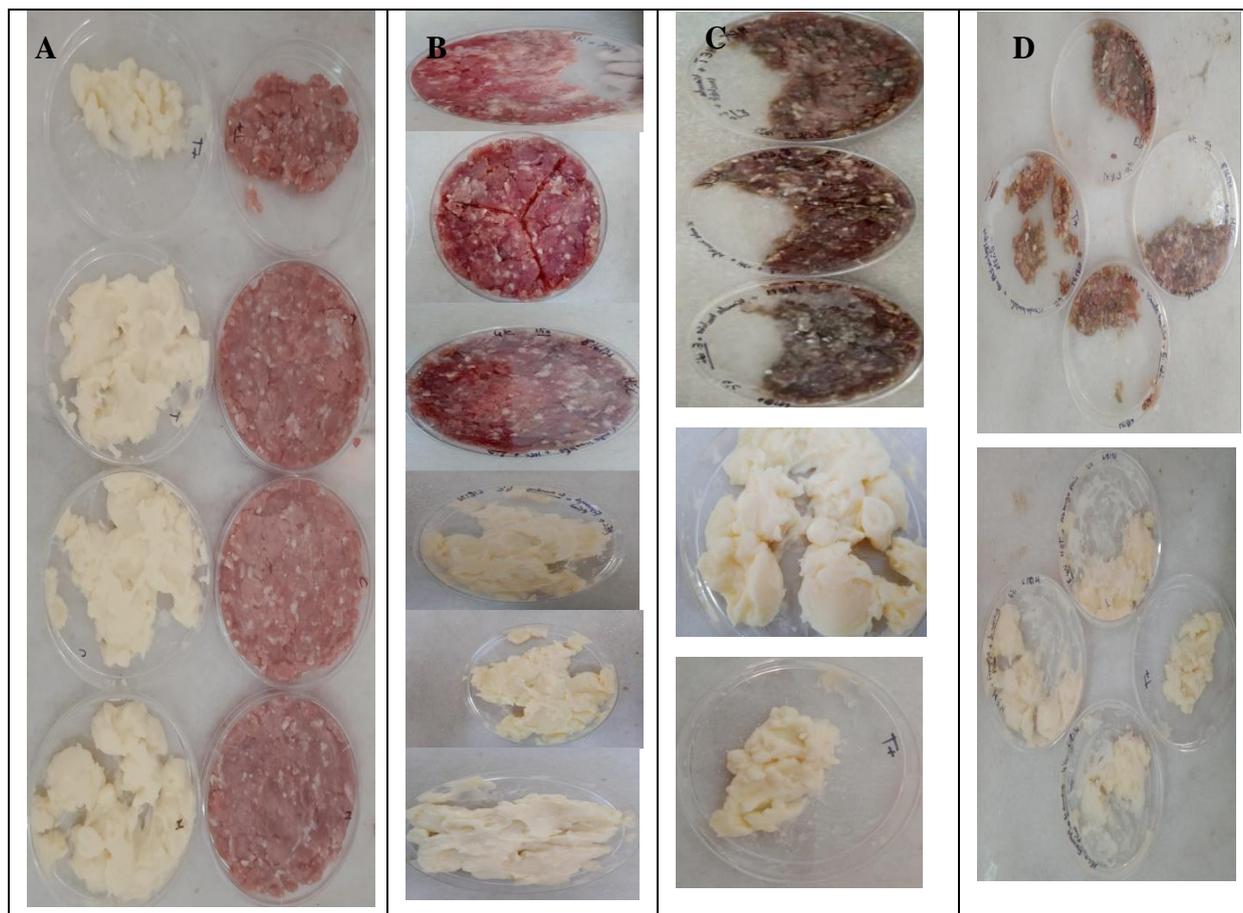


**Figure 30:** Etapes de la préparation des denrées alimentaires à analysées.  
**(A) :** Appareil Stomacher, **(B) :** Viande hachée bovine, **(C) :** Fromage frais, **(D) :** les échantillons homogénéisés.



**Figure 31:** Solution mère des denrées alimentaires conservés à 4°C par les huiles essentielles du thym, menthe poivrée et coriandre.

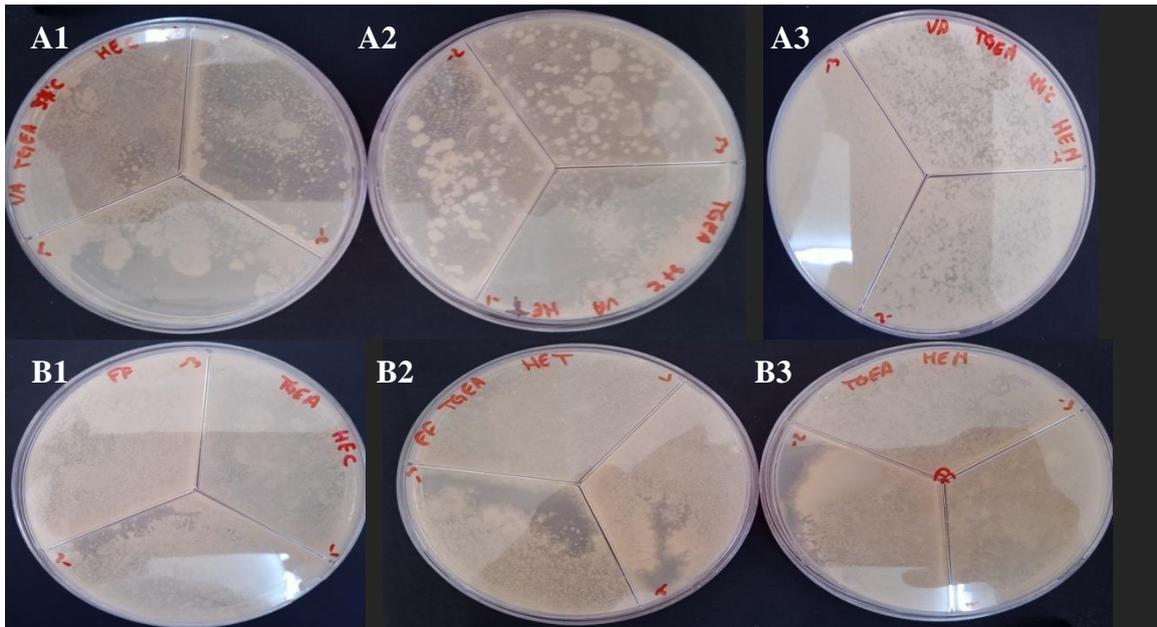
**(A)** Fromage frais ; **(B)** : Viande hachée bovine



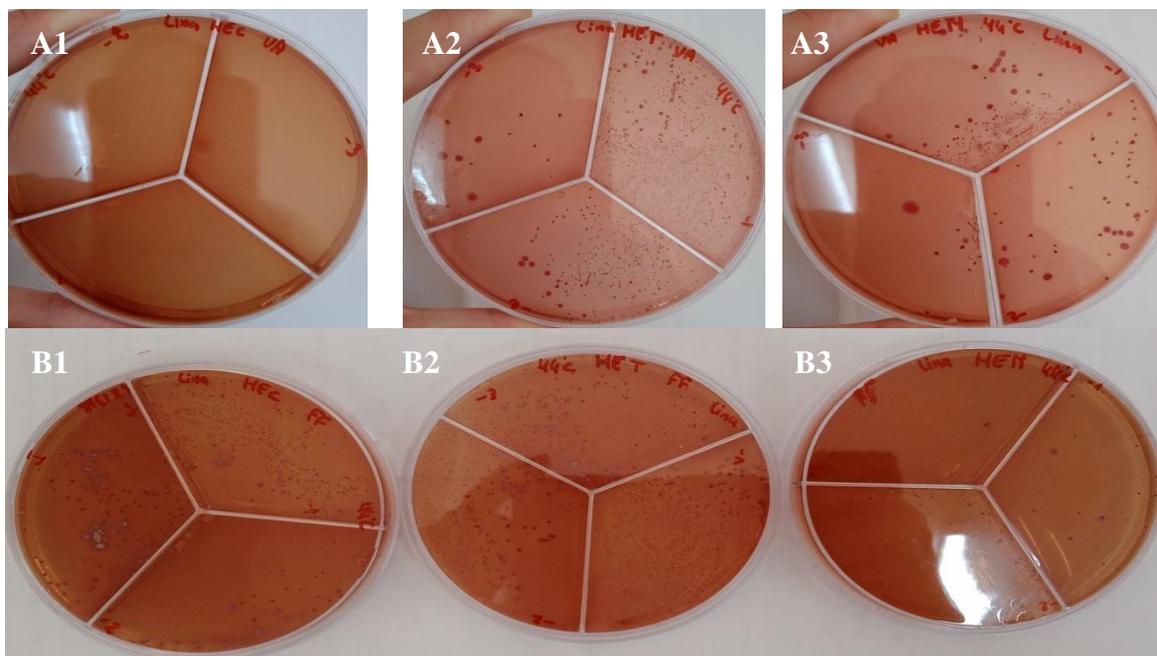
**Figure 32 :** Résultats de l'analyse sensorielle des denrées alimentaires (A) additionnée d'agent pathogène et des huiles essentielle durant le 1<sup>er</sup> (B), 3<sup>eme</sup> (C) et 7<sup>eme</sup> jour (D) de conservation.



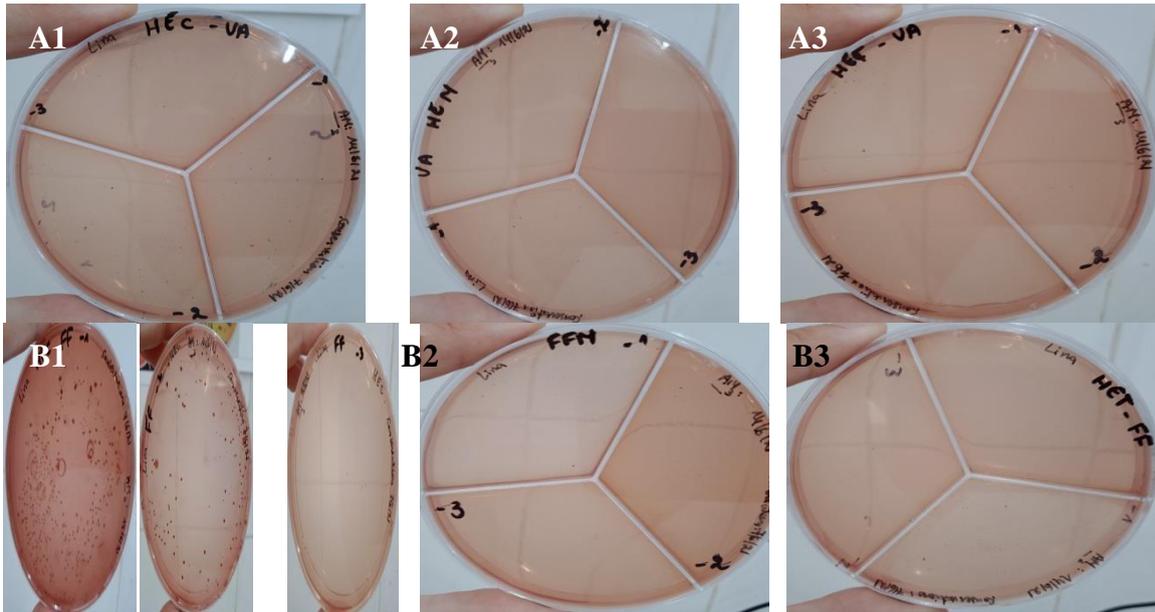
**Figure 33:** Résultats de conservation de la viande hachée bovine additionnée des trois huiles essentielles après le 3<sup>ème</sup> jour de conservation.



**Figure 34** : Résultats du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans le milieu TGEA au cours du 1<sup>ère</sup> analyse de viande hachée bovine (A) et fromage frais (B) additionnées des trois huiles essentielles. Avec : (A1, A2, A3) et/ou (B1, B2, B3) : échantillons additionné d'huile essentielle de coriandre, thym et menthe poivrée respectivement.



**Figure 35** : Résultats du dénombrement de coliforme fécaux dans le milieu VRBL au cours du 3<sup>ème</sup> jour d'analyse de viande hachée bovine (A) et fromage frais (B) additionnées des trois huiles essentielles. Avec : (A1, A2, A3) et/ou (B1, B2, B3) : échantillons additionné d'huile essentielle de coriandre, thym et menthe poivrée respectivement.



**Figure 36** : Résultats du dénombrement de coliforme fécaux dans le milieu VRBL au cours du dernière d'analyse de viande hachée bovine (A) et fromage frais (B) additionées des trois huiles essentielles. Avec : (A1, A2, A3) et/ou (B1, B2, B3) : échantillons additionné d'huile essentielle de coriandre, thym et menthe poivrée respectivement.



**Figure 37** : Mesure de pH des denrées alimentaires conservées