

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة الجيلالي بونعاما خميس مليانة
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de: Biologie



Mémoire de fin d'études
*En vue de l'obtention du diplôme de **Master***
***Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie*
***Filière**: Biologie et Agro Sciences*
***Spécialité**: Analyse biologique et biochimique*

Thème

Etude de l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles sur
un des agents responsables de Scombrotoxisme (*Klebsiella*
pneumoniae)

Présenté par :

M^{elle} BENAZIZA DEHBIYA
M^{elle} BENHALIMA YAMINA

Soutenu le: 18 septembre 2017, Devant le jury:

Président : Mr Brada.M

Pr à UDB Khemis Miliana

Examineur : Mr Kouache

MAA à UDB Khemis Miliana

Examinatrice : Zaouadi.N

MAB à UDB Khemis Miliana

Promotrice : Mme Benouaklil

MAA à UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2016/2017

Dédicace

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,
Pour votre cœur qui m'a tant donné
Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,
Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,
Pour vous qui m'avez tant aimé.

A ma sœur : Razika.

A mes frères: Abdellah, Aissa, Sidali, Youcef, Abdenour et Khaled mechaal.

A mes nièces : Assma et Rehab

A ma grand-mère Aicha et mon grand-père Djilali

A ma tante Khaira et mon oncle Mohammed

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université :

Yamina ,Amina, Assia, Samira, Fella,

Souad, Sabrina, Chafika, Amina arabe, Ibtissem,

Sans oublier : Khaira et Abdelmalek

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Dehbiya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts
A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents,
leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne
saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir
veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier
assez de m'avoir donné le meilleur.

A ma chère soeur fatima et son marie Ali.

Ames sœur Hamida, Fadoi et Rahil

A mes chers frères mohamed et Ayoub.

Je n'oublie jamais le générosité illimitée de mes amis,
Amina Arab, Bensmaaili Amina, Ibtissem, Samira, Assia,
Abdelmalek, Khayra, Chaima, Bouchra ,Fella et Chafika

A mes oncles et mes tantes.

A tous mes cousines Malika, Fatima, nassima, Nabila, Assia et Maroi.

A mes cousin Djilali benhalima, Youcef et mohammed

A mon binôme Dehbiya avec qui j'ai partagé les bons et les durs
moments.

A toute ma famille et à tout ce qui me connais-je-vous

aime.

Yamina

Remerciements

*Nos remerciements s'adressent tout d'abord à DIEU, le tout puissant qui nous a tracé le chemin de nos vies et accordé la volonté et la patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire. Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive connaissance à notre promotrice **Mme Benouaklil .**, pour nous avoir encadré et dirigé ce travail et pour sa disponibilité, ses conseils et le temps Qu'elle a bien voulu nous consacrer.*

*Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements aux membres de jury.
Merci à la Président **M^r Brada.**, d'avoir fait l'honneur de présider le jury.
Que l'Examineur **M^r Kouache.**, l'Examinatrice **M^{me} Zaouadi.**, trouvent ici l'expression de nos Plus hautes considérations et de notre sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.*

Merci pour les remarques, suggestions et critiques que vous allez apporter, qui vont, Sans doute, nous permettre d'enrichir le contenu de ce travail.

Un grand merci s'adresse à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à L'achèvement de ce modeste travail. Nous remercions tous nos enseignants qui nous ont suivis le long de nos études. Veuillez agréer nos professeurs l'expression de nos sentiments très respectueusement dévoués.

Nous remercions également Mr Faysal, M^{me} Aicha, Mr Mohamed, M^{elle} Aicha, M^{me} Najdiba, M^{me} Affaf, M^{elle} Wassila, pour les nombreux services qu'ils nous ont rendu durant la réalisation de ce travail.

Dehbiya et Yamina

ملخص

يعتمد عملنا على استخراج, تحليل و دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية لاوراق النباتات التالية: الإكليل (*Rosmarinus officinalis L.*) الزعتر (*Thymus vulgaris L.*) و الرند (*Laurus nobilis L.*) على واحد من العوامل المسببة للتسمم الغذائي (*Klebsiella pneumoniae*) Scombrottoxisme.

سجلنا مردود الزيوت العطرية لهذه النباتات المستخرجة عن طريق التقطير المائي كالاتي : $0.02 \pm 34,6\%$ بالنسبة للإكليل, $0.01 \pm 78,93\%$ بالنسبة للزعتر و $0.01 \pm 48\%$ بالنسبة للرند.

الزيوت العطرية المتحصل عليها شكلت محور دراسة تحليلية لبعض المعايير الفيزيوكيميائية حيث سجلت نبتة الزعتر اكبر كثافة (1.02). كما ان جميع المحاليل المدروسة كانت نوعا ما حمضية. مؤشر الانكسار ينحصر بين 1.47 و 1.50. بالنسبة لاعلى درجة حموضة كانت لزيت الزعتر وهي 9.25. مؤشرات الاسترة لجميع المحاليل انحصرت بين 22.44 و 70.12 فيما كان مؤشر التصبن بين 18.8 و 68.72

سمح التحليل الكروماتوغرافي الغازي المزوج مع مطيافية الكتلة (GC/MS) لنبتة إكليل الجبل بتحديد 64 مركبا و المكونات الأساسية هي : ($9,34\%$ borneol), ($8,22\%$ α pinene), ($6,64\%$ comphre), ($5,64\%$ Bornyl acétate

النشاط البكتيري للمحاليل المفحوصة (زيت اكليل الجبل, الزعتر, الرند, اكليل +زعتر, اكليل +رند, زعتر+رند, اكليل +زعتر+رند) أظهر نشاطا قويا مضادا للبكتيريا المدروسة حيث أعطت نبتة الزعتر أكثر فعالية حيث بلغت مساحة الإنتشار (37مم) و الأقل فعالية هي الرند (10مم) كما أن الحد الأدنى للتركيز (CMI) تراوح بين 0.5 ملغ/مل بالنسبة للزعتر و 100 ملغ / مل بالنسبة للاكليل والرند.

دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا لمختلف المحاليل على مادة غذائية (سردين) بتطبيق الحد الأدنى للتركيز وفقا لكل محلول و كذلك رصد حركية نمو البكتيريا لمدة 07 أيام على درجة حرارة 4 ± 1 أظهرت انخفاض ملحوظ بالنسبة لجميع المحاليل في نمو *Klebsiella pneumoniae* خلال سبعة أيام من التخزين خاصة من طرف نبتة الزعتر .

كلمات البحث : الاكليل, الزعتر , الرند ,التقطير المائي, النشاط المضاد للبكتيريا ,الحفظ الغذائي .

Résumé

Notre travail porte sur l'extraction, l'analyse et l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. sur un des agents responsables du scombrotisme (*Klebsiella pneumoniae*).

Les rendements en huiles essentielles des feuilles du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), du Thym (*Thymus vulgaris* L.) et de Laurier (*Laurus nobilis* L.) extraites par procédé d'hydrodistillation sont respectivement de 0.30% \pm 0.01, de 0.69% \pm 0.02 et de 0.34% \pm 0.01.

Les huiles essentielles obtenues ont fait l'objet d'une étude analytique de certains paramètres physico-chimiques. La densité la plus élevée est celle de *Thymus vulgaris* L.(1.02). Toutes les solutions testées ont un pH légèrement acide. Les valeurs d'Indice de réfraction varient entre 1.47 et 1.50. Le plus grand indice d'acide est de 9.25 caractérisant *Thymus vulgaris* L. Les valeurs d'indice d'ester oscillent entre 22.44 et 70.12 Alors que celles de l'indice de saponification fluctuent entre 18.8 et 68.72.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a permis d'identifier 64 composés de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et les principaux constituants sont : le Bornéol (9.34%), α Pinène (8.22%), le Camphre (6.94%) et le Bornyl acétate (5.64%).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et de leurs mélanges (HE.R, HE.T, HE.L,HE.RT,HE.RL,HE.RL,HE.RLT) a été évaluée par la méthode d'aromatogramme. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.à la plus forte action antibactérienne contre *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) avec une zone d'inhibition de 37mm \pm 0.01. Les concentrations minimales inhibitrices varient entre 0.5 μ g/ml pour *Thymus vulgaris* et 100 μ g/ml pour *Rosmarinus officinalis* L. et *laurus nobilis* L.

L'étude de l'activité antibactérienne sur une matrice alimentaire (Sardine) par application des différentes CMI et le suivi de la cinétique de croissance de *Klebsiella pneumoniae* durant 7 jours à 4 \pm 1°C a dévoilé une inhibition de croissance de la souche étudiée pour toutes les solutions testés surtout par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Laurus nobilis* L., CG-MS, activité antibactérienne, bioconservation.

Abstract

Our work focuses on the study of the Antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. and *Laurus nobilis* L. against one of the responsible of Scombrototoxicity (*Klebsiella pneumoniae*).

The essential oils yields of the Rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.), thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and Laurel leaves (*Laurus nobilis* L.) extracted by hydrodistillation process are respectively $0.30\% \pm 0.01$, $0.69\% \pm 0.02$ and $0.34\% \pm 0.01$.

The essential oils obtained have been the subject of an analytical study of some Physico-chemical parameters. The highest density is that of *Thymus vulgaris* (1.02). All solutions tested are slightly acid pH. The values of refractive index vary between 1.47 and 1.50. The largest index acid is 9.25 characterizing *Thymus vulgaris*. The ester index values oscillate between 22.44 and 70.12, where as those of the saponification fluctuate between 18.8 and 68.72.

The gas chromatography coupled with mass spectrometry analysis (GC-MS) has led to the identification of 64 compounds of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. and major constituents are: Borneol (9.34%), α pinene (8.22%), the Camphor (6.94%) and the bornyl acetate (5.64%).

The antibacterial activity of essential oils studied and their mixtures (EO.R, EO.T, EO.L, EO.RT, EO.RL, EO.TL, EO.RTL) has been evaluated by the method of aromatogramme. The results obtained show that the essential oil of *Thymus vulgaris* L. have the highest antibacterial action against *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) with a zone of inhibition of $37\text{mm} \pm 0.01$. The minimum inhibitory concentrations vary between $0.5\mu\text{g/ml}$ for *Thymus vulgaris* L. and $100\mu\text{g/ml}$ for *Rosmarinus officinalis* L. and *Laurus nobilis* L.

The study of the antibacterial activity on a food matrix (Sardine) by application of the different MIC and monitoring the growth kinetics of *Klebsiella pneumoniae* during 7 days at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ has unveiled a growth inhibition of the strain studied for all the solutions tested primarily by the essential oil of *Thymus vulgaris* L.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L., *Laurus nobilis* L., GC-MS, antibacterial activity, bioconservation

Liste des tableaux

Tableau I.1 : I.1 : Principaux composés de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. de divers pays.....	8
Tableau I.2 : Principaux composés de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> L. de divers régions.....	11
Tableau I.3 : Principaux composés de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> L. de divers pays.....	14
Tableau II.1 : Solutions testées.....	23
Tableau III.1 : Caractères organoleptique des huiles essentielles étudié.....	31
Tableau III.2 : Caractères physico-chimiques des solutions testées.....	32
Tableau III.3 : Composition chimique d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	35
Tableau III.4 : Diamètre des zones d'inhibition en mm des huiles essentielles.....	37
Tableau III.5 : Classification des solutions testées selon le diamètre d'inhibition.....	39
Tableau III.6 : Concentration minimale inhibitrice.....	40
Tableau III.7 : Classification croissante des concentrations minimales inhibitrice des huiles essentielles selon Aligiannis et ses collaborateurs 2001.....	41

Liste des figures

Figure 1 : Aspect morphologique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	7
Figure 2 : Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	8
Figure 3 : aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	10
Figure 4 : Photo de <i>Thymus vulgaris</i> L.	11
Figure 5 : Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i>	13
Figure 6 : Photo de <i>Laurus nobilis</i> L.	14
Figure 7 : Photo <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
Figure 8 : Dispositif d'hydrodistillation.....	18
Figure 9 : Activité antibactérienne.....	25
Figure10 : Teneurs en eau : (a) <i>Rosmarinus officinalis</i> L., (b) <i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Laurus nobilis</i> L.....	29
Figure 11 : Rendements en huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Thymus</i> <i>vulgaris</i> L. et <i>Laurus nobilis</i> L.....	30
Figure 12 : Huiles essentielles : (a) <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (b) <i>Thymus vulgaris</i> L <i>Laurus Nobilis</i> L.....	31
Figure 13 :Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus</i> <i>officinalis</i> L.....	34
Figure 14 : Effet inhibiteur des solutions testé vis-à-vis <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
Figure 15 : Concentration minimale inhibitrice des solutions testées.....	42
Figure 16 : Effet inhibiteur des solutions testées : (a) HE.R, (b) HE.T, (c) HE.L, (d) HE.RT, (e) HE.RL, (f) HE.TL, (g) HE.RTL, vis-à-vis <i>k. pneumoniae</i> inoculé à la chair de poisson.....	44

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

ATCC: American Type Culture Collection.

CG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Cip : Ciprofloxacin.

CMI : Concentration minimum d'inhibition.

d : densité.

HE.L : Huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

HE.R : Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

HE.T : Huile essentielle de *Thymus vulgaris* L.

HE.RL : Huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Laurus nobilis* L.

HE.RT : Huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Thymus vulgaris* L.

HE.T L : Huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Laurus nobilis* L.

HE.RTL : Huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., de *Thymus vulgaris* L. et de *Laurus nobilis* L.

Ia : Indice d'acide.

Ie : Indice d'ester.

Is : Indice de saponification.

MH : Mueller Hinton.

RHE : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

TSA : Tryptic Soja Agar.

T : Teneur en eau exprimée en pourcentage.

ufc/g : Unité Formant Colonie par gramme.

Table des matières

Dédicace.....	1
Remerciements.....	
ملخص.....	
Résumé.....	
Abstract.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Plantes aromatiques.....	2
I.1.1. Récolte.....	2
I.2. Huiles essentielles.....	2
I.2.1. Localisation.....	2
I.2.2. Techniques d'extraction.....	3
I.2.2.1. Hydrodistillation.....	3
I.2.2.2. Entraînement à la vapeur sèche.....	3
I.2.2.3. Expression à froid.....	3
I.2.2.4. Extraction au CO ₂ supercritique.....	3
I.2.3. Composition chimique.....	4
I.2.3.1. Terpène.....	4
I.2.3.2. Les composés aromatiques.....	4
I.2.4. Principaux usages.....	4
I.2.4.1. Aromathérapie.....	5
I.2.4.2. Parfumerie et cosmétologie.....	5
I.2.4.3. Industrie alimentaire.....	5
I.2.5. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	5
I.2.5.1. Mode d'action des huiles essentielles.....	6
I.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	6
I.3.1. Nomenclature.....	6
I.3.2. Description botanique.....	7
I.3.3. Systématique.....	7
I.3.4. Composition chimique.....	8
I.3.5. Activité antimicrobienne.....	9
I.4. <i>Thymus vulgaris</i> L.....	9
I.4.1. Nomenclature.....	9
I.4.2. Description botanique.....	9
I.4.3. Systématique.....	10
I.4.4. Composition chimique.....	11
I.4.5. Activité antimicrobienne.....	12
I.5. <i>Laurus nobilis</i> L.....	12
I.5.1. Nomenclature.....	12

I.5.2. Description botanique	12
I.5.3. Systématique.....	13
I.5.4. Composition chimique.....	14
I.5.5. Activité antimicrobienne.....	15
I.6. Scombrotisme.....	15
I.6.1. Bactéries histaminogènes.....	15
I.6.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matériel.....	17
II.1.1. Matériel Végétal.....	17
II.1.2. Matériel microbien.....	18
II.2 Méthodes.....	18
II.2.1. Extraction des huiles essentielles.....	18
II.2.2. Etude phytochimique.....	19
II.2.2.1. Teneur en eau.....	19
II.2.2.2. Rendement en huiles essentielles.....	19
II.2.3. Étude analytique des huiles essentielles.....	19
II.2.3.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles.....	19
II.2.3.2. Indices physico-chimiques.....	20
II.2.4. Analyse des huiles essentielles par CG-MS.....	22
II.2.5. Activité antibactérienne.....	22
II.2.6. Détermination de la CMI.....	26
II.2.7. Application des huiles essentielles sur la chair de poisson.....	26

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Etude phytochimique.....	28
III.1.1. Teneur en eau.....	28
III.1.2. Rendement en huiles essentielles.....	29
III.1.3. Caractères organoleptiques.....	31
III.1.4. Caractères physico chimique des huiles essentielles.....	32
III.2. Analyse des HE Par CG-MS.....	33
III.3. Activité antibactérienne.....	37
III.4. Concentration minimale inhibitrice.....	40
III.5. Activité antibactérienne des solutions testées appliquées sur la chaire de poisson	42
Conclusion	47
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

Introduction

Pendant de nombreuses années, une variété des composés chimiques a été utilisée comme des agents antimicrobiens dans les aliments pour inhiber les microorganismes pathogènes (**Shukla et al.,2008**). Cependant, la généralisation d'utilisation des conservateurs chimiques a conduit à un certain nombre de problèmes écologiques et médicaux. De ce fait il est nécessaire d'adopter des stratégies simples dans leur application, et non toxiques pour l'Homme et l'environnement (**Shukla et al., 2008**).

Les herbes aromatiques ont été utilisées depuis l'antiquité pour leurs parfums et leurs saveurs. Et utilisées comme conservateurs dans une variété de produits à usages médicaux et cosmétiques (**Bakkali et al., 2008**). Cependant, de nos jours il y a un renouvellement d'intérêt scientifique à l'utilisation de ces antimicrobiens naturels pour la conservation des aliments. Cela est dû à la forte demande des consommateurs pour plus d'aliments naturels avec une longue durée de vie (**Tajkarimi et al., 2010**).

De nombreux auteurs (**Degnon et al., 2013 ;Bin Shana et al.,2007 ;Patrakar et al.,2012 ; Nguefacka et al., 2009**) ont rapporté que les huiles essentielles des plantes aromatique peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les travaux de **Degnon et al., (2013)** sur les huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Ocimum gratissimum* et *Pimenta racemosa*) dans la conservation de poisson ont prouvé que c'est deux huiles peuvent être utilisées comme des agents conservateurs. D'autres travaux (**Nguefacka et al., 2004** et **Nguefacka et al., 2009**) sur *Ocimum gratissimum*,*Thymus vulgaris* L et *Zingiber officinale* ont montré aussi que ces trois plantes ont un effet inhibiteur contre l'altération des aliments.

Dans cette optique, Notre choix s'est porté sur trois plantes répondue en Algérie (*Rosmarinus officinalis* L,*Thymus vulgaris* L et *Laurus nobilis* L), largement exploitées dans l'aromatization culinaire et dont les huiles essentielles possèdent une activité antibactérienne contre plusieurs agents pathogènes responsables d'intoxications alimentaires tel que *Klebsiella pneumoniae* (**Bennadja et al., 2013 ; Daglia et Nabav, 2015 ; Athamena et Laroui.,2014 et Collins et al.,2011**).

Notre étude a pour objectifs de:

- Extraire les huiles essentielles des plantes aromatiques poussant en Algérie: *Rosmarinus officinalis* L, *Thymus vulgaris* L et *Laurus nobilis* L.
- Mener une étude physico – chimique sur les huiles essentielles testées et leurs mélanges.
- Evaluer l'activité antibactérienne et la CMI des différentes huiles essentielles.
- Appliquer les huiles essentielles dans la bioconservation du sardine.

Synthèse

bibliographique

I.1. Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques peuvent servir à la fois autant que plantes médicinales et autant que matières premières industrielles d'origine végétale. Elles constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particuliers aux aliments. Les plantes aromatiques fraîches, séchées, ou conservées peuvent servir à l'assaisonnement des mets et également donner naissance à des formes galéniques particulières telles que les extraits végétaux et les huiles essentielles (**Belail et saidi, 2012**).

I.1.1. Récolte

La cueillette des plantes aromatiques doit toujours tenir compte des variations climatiques et saisonnières. Ainsi, elle ne doit jamais se faire par temps de pluie afin d'éviter les risques de moisissement. Donc, le meilleur moment pour la récolte est la fin de matinée d'une journée ensoleillée (**Endrais, 2006**). D'une façon générale, la récolte a lieu comme ci-dessous :

- Les fruits et les graines sont récoltés à pleine maturité.
- Les fleurs sont récoltées à pleine floraison.
- Les feuilles sont récoltées avant la floraison.
- Les racines sont récoltées en automne, avant les gelées (**Polese, 2006 ;Frély, 2006**).

I.2. Huiles essentielles

Le nom « huile essentielle » a été conçu empiriquement. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances. Cependant, le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Bernard et al., 1988 ; Anton et Lobstein., 2005**).

Les huiles essentielles sont des essences extraites de plantes, avec un arôme propre à chacune de ces dernières. Ce sont des mélanges de substances aromatiques volatiles et odoriférantes présentes en faibles quantités dans le végétal. Elles sont obtenues principalement des fleurs (rose, jasmin), des bourgeons (clous de girofle), des feuilles (lavande, menthe), des racines (iris, souchet), des fruits (orange) et des graines (fenouil, anis). Leur composition varie souvent selon les conditions climatiques et environnementales. (Wylock, 1972). Elles sont très volatiles et passent instantanément de l'état liquide à l'état gazeux (**Aboughe Angone ,2014**).

I.2.1. Localisation

Les huiles essentielles sont largement répandues dans différentes Familles du règne végétal à haute teneur en matières odorantes comme les Labiacées, les Géraniacées, les Rutacées, les Myrtacées et les conifères (**Bernard et Col., 1988**).

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules et se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**Trujano et al., 2007**).

Le stockage des huiles essentielles se fait dans les organes végétaux : fleurs, feuilles, fruits, tiges, bois, écorces, parties souterraines (racines, rhizomes) à proximité de la surface. Tels que les cellules sécrétrices des huiles essentielles chez les Lauracées, les poils sécréteurs chez les Labiacées (lavande, menthe, romarin, thym), les poches sécrétrices chez les Myrtacées et les Rutacées et enfin les canaux sécréteurs chez les Labiacées et les Astéracées (**Degryse et al., 2008**).

Bien que toutes les parties d'une plante puissent contenir des essences, généralement la plus importante concentration se trouve au niveau des fleurs et des feuilles (**Bellakhdar, J1997**).

I.2.2. Technique d'extraction

Il existe plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles :

I.2.2.1. Hydrodistillation

Le matériel végétal est chauffé jusqu'à l'ébullition. L'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées puis elle est condensée après refroidissement et enfin séparée de l'eau (**Sousa et al, 2002; Adio, 2005**).

I.2.2.2. Entraînement à la vapeur sèche

La masse végétale est déposée sur une grille à travers laquelle la vapeur passe. Les cellules se distendent et les particules d'huiles se libèrent. Puis, elles sont vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré et la suite est la même que la technique de distillation (**Sousa et al, 2002; Adio, 2005**).

I.2.2.3. Expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux et al., 2008**).

I.2.3.4. Extraction au CO₂ supercritique

Le CO₂ sous pression et à température supérieure à 31°C se trouve dans un état supercritique. La matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression. Le mélange est recueilli. Puis, la pression étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et donc complètement éliminé. L'huile essentielle est ensuite isolée (**Wenqiang et al., 2007**).

I.2.4. Composition chimique

Selon l'AFNOR, Une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives (**Mayer, 2012**).

Généralement les constituants des huiles essentielles appartiennent principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques comme les monoterpènes, les sesquiterpènes (**Svoboda., 1999**), les diterpènes (C₂₀) (**Santoyo, 2005 ; Kimbaris, 2006**) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Kaloustain et Hadj-Minaglou, 2012**).

I.2.4.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la combinaison de plusieurs unités isoprène (C₅H₈) (**Hyldgaard et al., 2012**). Ils sont volatils car leur poids moléculaire n'est pas trop élevé (**Messai, 2011**).

Selon le nombre de carbone, ce groupe est constitué de:

- Monoterpènes qui sont formés de l'union de deux unités isoprène (C₁₀). Leur formule chimique est (C₁₀H₁₆) (**Bakkali et al., 2008**). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (**Messai, 2011**).
- Sesquiterpènes dont la formule chimique est (C₁₅H₂₄). Ils sont généralement formés de l'assemblage de trois unités isoprènes (**Figuredo, 2007**).
- Diterpènes qui sont formés de quatre unités isoprènes (C₂₀H₃₂)

Il faut noter que les terpénoïdes sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide ...etc.) (**Bruneton, 1999 ; Hernandez-Ochoa, 2005**).

I.2.4.2. Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane sont moins fréquents dans les huiles essentielles que les terpènes (**Bakkali et al., 2008**). Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles (**Kunle et al., 2003**).

I.2.2. Principaux usages

Les huiles essentielles sont des produits naturels utilisés comme matière première dans de nombreux domaines, y compris la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie, la médecine et l'industrie alimentaire (**Rajendran et al., 2014**).

I.2.2.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques pour prévenir ou soigner certaines maladies (**Ichiro et al., 1974**) par voie interne ou externe (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

Les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis l'antiquité (**Hmiri et al., 2011**). Ces huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et d'origine fongique (**Billerbeck, 2007**). Elles présentent également des propriétés relaxantes, énergisantes, anti-inflammatoires, et antioxydantes (**Aboughe Angone et al., 2014**) ainsi que des propriétés anti cancéreuses (**El Oulilalami et al., 2013**).

I.2.2.2. Parfumerie et cosmétologie

L'utilisation des huiles essentielles comme un composant dans la fabrication des parfums, des savons, des détergents, des crèmes, des lotions et des gels parfumés permet de leur procurer un arôme agréable tout en préservant ces produits grâce aux propriétés antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles (**Khan et Abou-rashed, 2010 ; Aburjai et al., 2003**).

I.2.2.3. Industrie alimentaire

Au cours des dernières années les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par la sécurité des aliments qui contiennent des agents conservateurs synthétiques (**Bin Shan et al., 2007**). Ces derniers ont été utilisés dans les aliments pendant des décennies, ce qui peut conduire à des conséquences négatives sur la santé Humaine (**Nemet et Skrinjar, 2009**). Par conséquent, il y a eu un intérêt croissant pour le développement de nouveaux types de composés antimicrobiens efficaces et non toxiques et agents aromatisants naturels, tel que les extraits d'épices et fines herbes utilisées comme additifs alimentaires et agents de conservation des aliments (**Bin Shan et al., 2007**). Dans cet optique l'usage des huiles essentielles est conseillé du moment qu'elles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur toxicité réduite comparée à celle des additifs alimentaires synthétiques (**Bassole et al., 2001**).

I.2.5. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement étudiées pour mieux cerner leur efficacité comme agents antimicrobien naturels. Ces huiles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent la croissance des bactéries et celle des moisissures et des levures. Elles empêchent

aussi la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines des bactéries. Comme elles agissent sur la production de mycélium chez les levures (**Hulin et al., 1998**).

I.2.5.1. Mode d'action des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**El amri et al., 2014**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (**El amri et al., 2014**). Ce qui entraîne:

- L'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- L'acidification de l'intérieure de la bactérie, bloquant ainsi la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure (**Boutabia et al., 2014**).
- l'inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides (**El amri et al., 2014**).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié aussi à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries (**Boutabia et al., 2014**). En revanche, les bactéries à Gram- sont plus résistantes que les Gram+. Ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (**Burt, 2004**).

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique (**Zhiri, 2006 ; Fellah et al., 2006**).

I.3. *Rosmarinus officinalis* L

Le mot romarin dérive du latin « Rosmarinus » qui se compose de Ros : rose et Marinus : marin. Ce qui signifie « Rose de la mer » (**Monod, 1978**).

Le Romarin officinal est une herbe aromatique (**S. Athame-na1, 2015**) qui pousse spontanément dans les lieux pierreux de la région méditerranéenne. Mais aussi elle est cultivée dans les jardins (**Christo Hilan, 2006**).

1.3.1. Nomenclature

Nom Français : encensier, herbe aux couronnes, Romarin, Romarin officinal.

Nom Anglais : Rosemary.

Nom Arabe : اكليل.

Nom vernaculaire : Yazir, Eklil (Ghédira et Goetz, 2012).

I.3.2. Description botanique

C'est un arbuste toujours vert de 0,5 à 2 m (Cabras et Coroneo, 2004). La tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés (Naggar et Iharchine, 2015). Les feuilles sont étroites, linéaires, sessiles, opposées et persistantes. Elles sont enroulées sur les bords, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure (Naggar et Iharchine, 2015). Les fleurs sont d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet. Elles sont disposées en courtes grappes denses (Bekkara et al., 2007) (Doumandji et al., 2005). Il se forme quatre akènes simples par fleur (Khairi et Boussaid, 2011).



Figure 1: Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* L. (Köhler, 1897)

I.3.3. Systématique

Selon Quezel et Santa (1963), la classification taxonomique de *Rosmarinus officinalis* L. Est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.



Figure 2 : *Rosmarinus officinalis* L. (Ouibrahim, 2012).

I.3.4. Composition chimique de l'huile essentielle

Plusieurs travaux ont été réalisés sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. en Algérie, au Maroc, en Espagne, et en Afrique du Sud. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau I.1 : Principaux composés de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. de divers pays.

Composition chimique	Algérie (Djeddi et al., 2007)	Maroc (Derwich et al., 2011)	Espagne (Navaja et al., 2007)	Afrique du Sud (Okoh et al., 2010)
α Pinéne	5.4	18.25	36.42	11.47
1, 8-Cineole	12.2	5.25	12.02	11.91
Camphène	7.2	5.02	11.08	5.70
1-Octen-3-ol	0.6	0.03	-	-
Eucalyptol	-	-	-	5.74
Borneol	10.6	3.10	4.00	-
Verbenène	-	-	-	-

Bornyl acétate	5.3	4.35	2.13	9.19
Camphor	-	-	-	-
Verbenone	-	-	-	-
Verbenol	-	-	-	17.43
β -Pinène	8.5	-	3.67	1.12
Linalool	2.2	-	0.66	2.02
β -Caryophyllene	10.9	2.02	1.64	0.17
3-Octanone	-	-	-	-
β -Phellanderene	-	-	-	-
Limonène	-	-	-	-
Sabinene	-	-	-	-

I.3.5. Activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du romarin officinal sur des souches bactériennes et fongiques montre que ces dernières possèdent une activité antibactérienne surtout contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 76110) et *Escherichia coli* (ATCC 7625) (Ayadi et al., 2011) et aussi une bonne activité antifongique contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (Jianga et al., 2011).

I.4. *Thymus vulgaris* L.

Le genre *Thymus* (du nom grec : Thumos, venant du mot « Theo » signifiant : parfum ou plante odoriférante) (Hamideh, 2009 ; Bel-malha et al., 2015) est composé d'environ 300 espèces de plantes vivaces. Il est principalement trouvé dans la région méditerranéenne, l'Asie, l'Europe du Sud et en Afrique du Nord (Kuçuka, 2007).

1.4.1. Nomenclature

Nom Français : Thym vulgaire.

Nom Anglais : Thyme.

Nom arabe : زعتر.

Nom vernaculaire : azukenni, zaatar (Fadil et al., 2014).

1.4.2. Description botanique

Thymus vulgaris L est un sous-arbrisseau très aromatique (Imelouane et al., 2009). La tige est dressée, ligneuse, tortueuse à la base pouvant atteindre 40cm de hauteur. Les feuilles sont persistantes, de petite taille (3 à 12mm de longueur sur 0.5 à 3mm de largeur), opposées, lancéolés ou linéaires. Elles sont subsessiles et de couleur vert grisâtre. Les fleurs sont de petite taille rassemblées en glomérules ovoïdes. Les fruits sont des tétrakènes qui renferment à maturité 4 minuscules graines (1mm) de couleur brun clair à brun foncé (Goetz et Ghédira, 2012).



Figure 3 : aspect morphologique de *Thymus vulgaris* L. (wikipedia)

I.4.3. Systématique

La position systématique de *Thymus vulgaris* L. selon quezel et santa est la suivante :

Règne : plantae

Sous règne : Tacheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Sous embranchement : Magnoliophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris* L.

Figure 4: Photo de *Thymus vulgaris* L. (wikipedia)

I.4.4. Composition chimique de l'huile essentielle

La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. a fait l'objet de plusieurs travaux dans plusieurs régions (Ain defla, Maroc, Cameroun, et Brazil). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau I.2 : Principaux composés de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. de diverses régions

Composition chimique	Ain defla (Sidali et <i>al.</i> , 2014)	Maroc (El Oualilami et <i>al.</i> , 2013)	Cameroun (Tchoumboungang et <i>al.</i> , 2009)	Brazil (Porte et <i>al.</i> , 2007)
α -Thujéne	2.2	0.18	0.9	-
α -Pinène	2.9	0.85	1.2	0.8
β -Pinène	0.3	1.63	-	-
1-Octen-3-ol	0.3		-	-
Mycènes	2.0		0.4	2.4
α - Phellandréne	0.3	0.28	<0.1	0.3
α -Terpinéne	2.7	3.25	-	1.8
p-Cymene	9.2	15.59	-	18.6
Limonène	1.1		-	-
γ -Terpinene	12.6	22.25	15.1	16.5
Cis Sabinene hydrate	0.5		-	-
Linalol	3.8	1.79	<0.1	-
Menta-3,8-diène	-		-	0.4
α -terpinolène	-		1.7	0.2
Bornéol	-	0.65	4.5	0.5
Terpinén-4-ol	0.3		1.4	-
Trans Sabinéne hydrate	0.2		-	-
Carvacrolmethyl éther	1.4		-	-
Thymol	1.5	41.39	4.7	40.14
Carvacrol	55.1	2.06	2.4	2.4
α -Gurjunene	0.3		-	-
β -Caryophyllène	0.6		1.3	0.8

Leden	0.2		-	-
β - Bisabolene	0.2		-	-
Spathulenol	0.1		-	-

I.4.4. Activité antimicrobienne

Selon **Al-Bayati (2008)** l'étude de l'activité antibactérien de huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. Sur des bactéries Gram positif et Gram négatif, cette plante possède une forte activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* suivi de *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris*.

Selon **Sidali et al., (2014)** et **Nabavi et al., (2015)** L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* présente une activité antimicrobienne intéressante vis-à-vis des bactéries et des levures testées tels que *Staphylococcus aureus*, *Klebsciella sp*, *E. coli*, *Pseudomonas sp* et *Candida albicans*.

I.5. *Laurus nobilis* L.

Le nom *Laurus* est un mot latin qui veut dire « toujours vert » (**Pariente, 2001**).

1.5.1. Nomenclature

Nom Français : Laurier noble, Laurier sauce, Laurier d'Apollon, laurier commun (**Elharas et al., 2013**).

Nom Anglais : Laurel

Nom arabe : رند

Nom vernaculaire : Rand (**Gautriat, 2015**).

1.5.2. Description botanique

Laurus nobilis L est un arbuste de 2 à 6 m de hauteur (**Salhi et al., 2015**). La tige est droite, grise dans sa partie basse et verte en haut (**Beloued, 2005**). Les feuilles sont persistantes et aromatiques, alternées, coriaces, vert plus clair sur la face inférieure, brillantes sur la face supérieure (**Botineau, 2010**). Les fleurs sont petites à quatre lobes, unisexués avec une couleur jaune verdâtre (**Patrakar, 2012**). Les fruits sont de petites baies ovoïdes de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, de couleur noir vernissé à maturité (**Beloued, 2005**).



Figure 5: Aspect morphologique de *Laurus nobilis* L. (Beloued, 2005).

I.5.3. Systématique

La classification botanique de *Laurus nobilis* L. d'après Quezel et santa, (1962) est la suivante:

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Laurales

Famille : Lauracées

Genre : *Laurus*

Espèce : *Laurus nobilis* L.

Figure 6 : *Laurus nobilis* L. (Ouibrahim, 2011).

I.5.4. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats obtenus dans l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. en Algérie, en Tunisie, au Maroc et en Turquie sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau I.3 : Principaux composés de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. de divers pays.

Compositions chimiques	Algérie (Ouibrahim et al., 2015)	Tunisia (Merghni et al., 2016)	Maroc (Derwich et al., 2009)	Turquie (Antakya) (Kemal Sangun et al., 2007)
α -pinène	0.89	3.9	3.72	3.66
3-carene	5.39	-	-	-
α -limonène	3.04	-	-	-
Eucalyptol	-	-	-	-
β -linalol	22.52	-	-	-
4-terpineol	2.09	2.2	-	-
α -terpinéol	3.18	3.0	-	-
α -terpinéol acétate	0.29	10.9	-	-
Camphene	7.37	0.7	0.05	0.19
α -terpinène	-	-	2.12	-
γ -terpinène	1.03	-	-	0.37
terpinen-4-ol	-	-	2.56	-
Linalool	-	-	1.98	0.64
Isoeugenol	2.93	-	-	-
1,8-cineole	35.31	-	52.43	46.61
Eugénol méthyl éther	9.17	-	-	-
Delta cadinene	0.32	-	-	-
α -caryophyllène	0.22	-	1.28	-
Isopulegol acétate	0.60	-	-	-
Sabinene	-	-	6.13	14.05

bornyl acétate	-	-	1.89	-
α -spathulenol	1.4	2.2	-	-
Terpinolene	-	-	-	-
methyl-eugenol	-	0.6	-	-
α -cadinol	0.86	-	-	-
α -terpinyl acétate	-	-	-	11.94
Germacrène D	-	-	-	-

I.5.4. Activité antimicrobienne

Selon **Ben Abdellah et al., (2009)** ; **Bennadja et al., (2013)**; **Derwich et al., (2009)**, les huiles essentielles de *Laurus nobilis* L. présentent des effets antibactériens contre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia sp* et *Staphylococcus intermedius*.

Selon **Simiç et al., (2004)** *Laurus nobilis* L. possède une activité antifongique contre *Aspergillus sp* et *Penicillium sp*.

I.6. Scombrotisme

Le scombrotisme ou intoxication histaminique est la première cause de toxi-infection alimentaire associée à la consommation de poissons.

Cette intoxication est dans la plupart des cas liée à l'ingestion de poissons de la famille des Scombridés (**Maarof, 2016**) tel que : le thon, la bonite, les maquereaux, les anchois et les sardines. La masse musculaire de ces poissons est caractérisée par un aspect rouge évoquant la viande (poissons bleus) et par la présence de grandes quantités d'histidine dans leurs tissus (**Aubry, 2014**) ces poissons peuvent, lors d'une mauvaise conservation, subir des décarboxylations bactériennes, post mortem, entraînant l'apparition d'histamine dans la chair des poissons (**Maarof, 2016**).

I.6.1. Bactéries histaminogènes

La capacité de produire de l'histamine a été approuvée chez les bactéries Gram-négatives et chez les bactéries Gram-positives (**Collins et al., 2011**).

De nombreuses bactéries à Gram négatif qui contaminent couramment l'alimentation sont en mesure de produire de l'histamine. Les producteurs les plus redoutables d'histamine sont : *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae* et plus récemment, *Morganella psychrotolerans* (**Collins et al., 2011**).

I.6.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est un germe de la famille des Entérobactériaceae. C'est un bacille Gram négatif, aéro-anaérobie, immobile et capsulé. Les colonies bactériennes sont volumineuses, bombées, brillantes et visqueuses (**Kouch, 2015**).

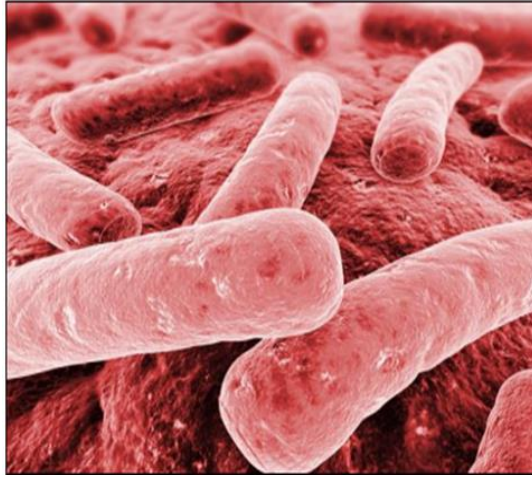


Figure7 : *Klebsiella pneumoniae* (Kouch, 2015)

Matériel
et
méthodes

Notre travail a été réalisé en trois parties successives :

D'une part, l'extraction des huiles essentielles des trois plantes étudiées (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L.) et détermination de certains paramètres phytochimiques (Teneur en eau et rendement en huiles essentielles).

D'autre part, une évaluation de certains caractères physico-chimiques tels que la densité, l'indice de réfraction, le pH, l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice d'ester et la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. par CG/MS.

En troisième partie, nous nous sommes intéressées à l'étude du pouvoir antibactérien de chaque huile essentielle séparée puis des mélanges de ces dernières afin de mettre en évidence un éventuel effet synergique contre *Klebsiella pneumoniae* considérée comme un des agents causaux du scombrotisme et enfin la détermination des concentrations minimales inhibitrices de ces huiles étudiées.

Notre étude expérimentale qui s'est étalée de Février à Aout 2017 a été réalisée au sein des laboratoires suivants :

- Laboratoire de chimie du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la terre de l'université de Khemis Miliana où l'extraction des huiles essentielles a été effectuée.
- Laboratoire de Génie des procédés du département de Technologie, Faculté des Sciences et de la Technologie de l'université de Khemis Milana où l'analyse des huiles essentielles par CG/MS a été effectuée.
- Laboratoire de Microbiologie du département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la terre de l'université de Khemis Miliana et le laboratoire d'analyse médicale « Zibouche » de Ain Defla où l'activité antibactérienne a été accomplie.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel Végétal

La récolte des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. a été effectuée dans la région de khemis Miliana au niveau de la wilaya d'Ain Defla de Février 2017 à Juin 2017. Au cours de la même période, la récolte des feuilles de *Laurus nobilis* L. a été faite au niveau de la région d'Arib dans la wilaya d'Ain Defla. Ces deux récoltes ont été suivies par celle des feuilles de *Thymus vulgaris* L. du mois de Mars 2017 au mois de Juin 2017, dans la région de Mekhatria au niveau de la wilaya d'Ain Defla.

L'identification des plantes étudiées a été faite selon la clé de détermination de **Quszel et Santa [1963]**. Cette identification a été confirmée au niveau du département d'Agronomie de l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

II.1.2 Matériel microbien

Le teste antimicrobienne est effectué sur *klebsiella pneumoniae* qui l'une des bactéries responsable de l'intoxication histaminique. La souche bactérienne est une souche ATCC 4352 (American Type Culture Collection).

II.2 Méthodes

II.2.1 Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Chaque matériel végétal frais des espèces étudiées (*Rosmarinus officinalis* L (150 g.), *Thymus vulgaris* L (70 g.), *Laurus nobilis* L (150 g.)) a été introduit avec de l'eau(300ml) dans le ballon de ce dispositif d'hydrodistillation. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 à 4 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent un réfrigérant puis se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. L'eau et huile se séparent par différence de densité.

Les huiles essentielles ont été récupérées dans de petits flacons opaques fermés hermétiquement puis stockée à 4°C.

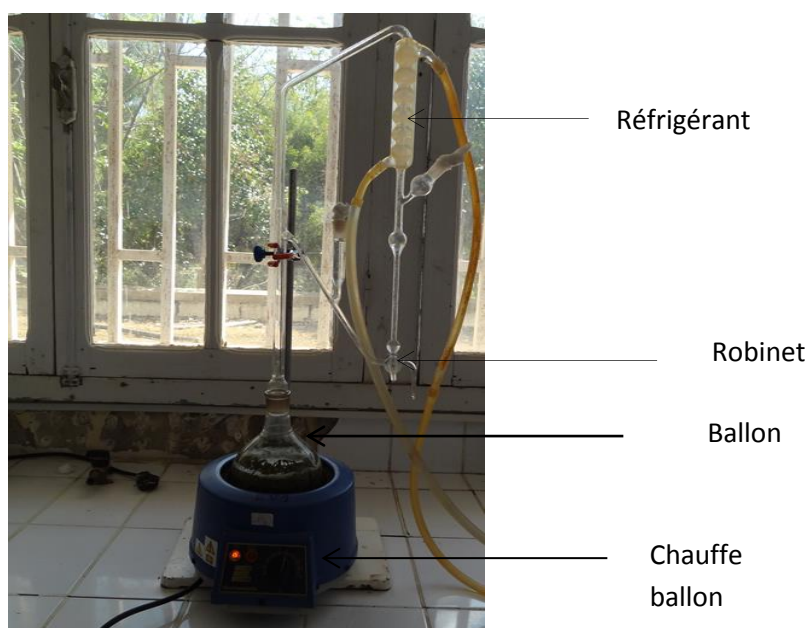


Figure 8 : Dispositif d'hydrodistillation

II.2.2. Etude phytochimique

II.2.2.1. Teneur en eau

Afin de déterminer la teneur en eau, nous avons placé trois échantillons à poids connue des feuilles fraîches de chaque espèce dans une étuve à 70°C. Les échantillons ont été pesés chaque 24h jusqu'à la stabilisation du poids sec de la matière végétale.

Selon **Bourkhiss et al (2009)**, La teneur en eau est calculée selon la formule suivante :

$$T\% = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

T : Teneur en eau exprimée en pourcentage.

M_f: Masse de l'échantillon avant séchage en étuve (g).

M_s : Masse de l'échantillon après séchage en étuve (g).

II.2.2.2. Rendement en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles ont été calculés sur la base de la matière sèche selon la formule suivante (**Sangun et al., 2007**).

$$R_{HE}(\%) = \frac{m_{HE}}{m_S} \times 100$$

R_{HE}: Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

m_{HE} : Masse de l'huile essentielle en gramme.

m_S: Masse de la matière végétale sèche en gramme.

III.2.3. Étude analytique des huiles essentielles

II.2.3.1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des huiles essentielles des feuilles de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. ont été notées.

III.2.3.2. Indices physico-chimiques

- **Densité relative à 20°C**

C'est le rapport entre la masse d'un certain volume d'huile essentielle et la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Elle est déterminée à l'aide d'un pycnomètre.

➤ **Mode opératoire**

Le pycnomètre est rempli successivement avec des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau distillée puis pesé (Noudogbessi et al, 2008).

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

m_0 : Masse du pycnomètre vide en g.

m_1 : Masse du pycnomètre rempli d'eau en g.

m_2 : Masse du pycnomètre rempli d'huile essentielle en g.

Selon Yerou et al., (2016). Un produit est classé comme suit selon sa densité :

$d < 0.9$: le produit est riche en terpènes.

$0.9 > d < 1$: le produit a une composition complexe.

$d > 1$: Le produit contient des séries aromatiques, des sulfures et des nitrites.

- **Indice de réfraction**

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air à l'huile essentielle maintenue à une température constante (AFNOR NF ISO 280 : 1999 (75-112)).

➤ **Mode opératoire**

L'indice de réfraction a été mesuré à 20°C avec le réfractomètre (Noudogbessi et al., 2008).

Potentiel d'Hydrogène (pH)

Le pH exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse (Bentchicou, 1999). La détermination du pH a été effectuée à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH-mètre.

- **Indice d'acide**

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titré (NF ISO 1242 : 1999 (T 75-103)).

➤ **Mode opératoire**

Un gramme de chaque huile essentielle et deux gouttes de phénolphtaléine sont introduits dans cinq millilitres d'alcool éthanolique neutralisé. Après homogénéisation, le mélange est titré avec une solution d'hydroxyde de potassium (0,05N) (Noudogbessi *et al.*, 2008).

$$I_a = \frac{N_{(OH^-)} \times V \times 56.11}{m}$$

N_{OH^-} : Normalité d'hydroxyde de potassium.

m : Masse d'huile essentielle prélevée en g.

V : Volume de la solution d'hydroxyde de potassium versée en ml.

56,11g / mol : Masse moléculaire du KOH.

- **Indice de saponification**

L'indice de saponification (I_s), est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans un gramme d'huile essentielle.

➤ **Mode opératoire**

La solution provenant de la détermination de l'indice d'acide et 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (0.5 mol/L) ont été introduites dans un ballon puis chauffées durant 1 heure à l'aide d'une plaque chauffante. Après refroidissement, cette solution et 5 gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées à 20 millilitres d'eau distillée. Après homogénéisation, le mélange est titré avec la solution d'acide chlorhydrique.

L'indice de saponification I_s est donné par la formule suivante :

$$I_s = 28.05 \times (V_0 - V_1) / m$$

V_0 : Volume (ml) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume (ml) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé.

m : Masse (g) de la prise d'essai.

- **Indice d'ester** : (AFNOR NF T 75- 104 : 1994)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle (**Ould Yerou et al ., 2016**).

L'indice d'ester est calculé selon la formule suivant. :

$$I_e = I_s - I_a$$

I_s : Indice de saponification

I_a : Indice d'acide

II.2.3.3. Analyse des huiles essentielles par CG-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS) est une technique qui permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe (**Sameza et al., 2004 ; Lucchesi et al., 2009**).

L'analyse a été effectuée dans les conditions suivantes :

- La température de l'injecteur splitless est de 280°C.
- La programmation de température : de 50 °C à 280 °C à raison de 5 °C/min.
- Le gaz vecteur : He à 1 ml/min (vitesse linéaire moyenne = 36.3 cm/sec).
- Les températures de la source et du quadripôle sont fixées à 200 °C et 280 °C respectivement.
- L'énergie d'ionisation : 70 eV.

L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisées (Wiley 275.L) (**Sidali et al., 2014**).

II.2.2.3. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (**Benkherara et al., 2011**). Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle (**Kheyar et al ., 2014**).

Dans cette partie, nous avons testés l'effet antibactérien des

Dans cette partie, nous avons testé l'effet antimicrobien des huiles essentielles des feuilles fraîches des trois espèces de plantes aromatiques : *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. et *Thymus vulgaris* L. et les mélanges des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* / *Thymus vulgaris* L. (V/V) , de *Rosmarinus officinalis* L. / *Laurus nobilis* L. (V/V) , de *Thymus vulgaris* / *Laurus nobilis* L. (V/V) et de *Rosmarinus officinalis* L. / *Thymus vulgaris* L. / *Laurus nobilis* L. (V/V/V) en le comparant avec celui de l'antibiotique Ciprofloxacine à 5µg/disque. La technique choisie est celle de diffusion sur gélose.

Le tableau suivant résume les différentes solutions testées:

Tableau II.1 : Solutions testées

Abréviations	Huiles essentielles utilisées avec proportions
HE.R	Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> pure
HE.T	Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> pure
HE.L	Huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i> pure
HE.R.T	Huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> + <i>Thymus vulgaris</i> (V/V)
HE.T.L	Huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> + <i>Laurus nobilis</i> (V/V)
HE.R.L	Huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> + <i>Laurus nobilis</i> (V/V)
HE.R.T.L	Huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> + <i>Thymus vulgaris</i> + <i>Laurus nobilis</i> (V/V/V)

La diffusion sur gélose est une technique qualitative permettant de tester l'existence du pouvoir antimicrobien. Elle se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour de la substance à caractère antimicrobien (**Amatiste et al., 2014**).

• Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 24 heures sur milieu gélose nutritive, une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement de 2 à 3 colonies bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur. Ces colonies ont été mises dans un tube de solution physiologique stérile avec agitation de façon à obtenir une densité optique de 0,5 à 570 nm.

Ensemencement et application des disques

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage et, en procédant comme suit :

- Le milieu MH (Mueller Hinton) a été coulé dans des boîtes de pétrie et laissé solidifier.
- Ensuite, un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne puis légèrement essoré.

- L'ensemencement a été fait à l'aide de cet écouvillon sur la surface de la gélose en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Dans chaque boîte de pétrie, nous avons déposé trois disques de 6 mm imbibés de 10µl de chaque solution à tester.

Incubation et lecture

- L'incubation des boîtes a été faite à l'étuve à 37°C durant 24 heures.
- Le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré avec précision (à l'aide d'un pied à coulisse) pour chaque produit testé (diamètre du disque intégré dans la zone d'inhibition).
- L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **Mutai et al.,(2009)** a été suivie. Ces derniers ont classé la substance testée selon le diamètre de la zone d'inhibition (D) de la croissance microbienne en cinq classes :
 - • Très fortement inhibitrice: $D \geq 30$ mm
 - • Fortement inhibitrice: $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
 - • Modérément inhibitrice: $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
 - • Légèrement inhibitrice: $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm
 - • Non inhibitrice: $D < 10$ mm

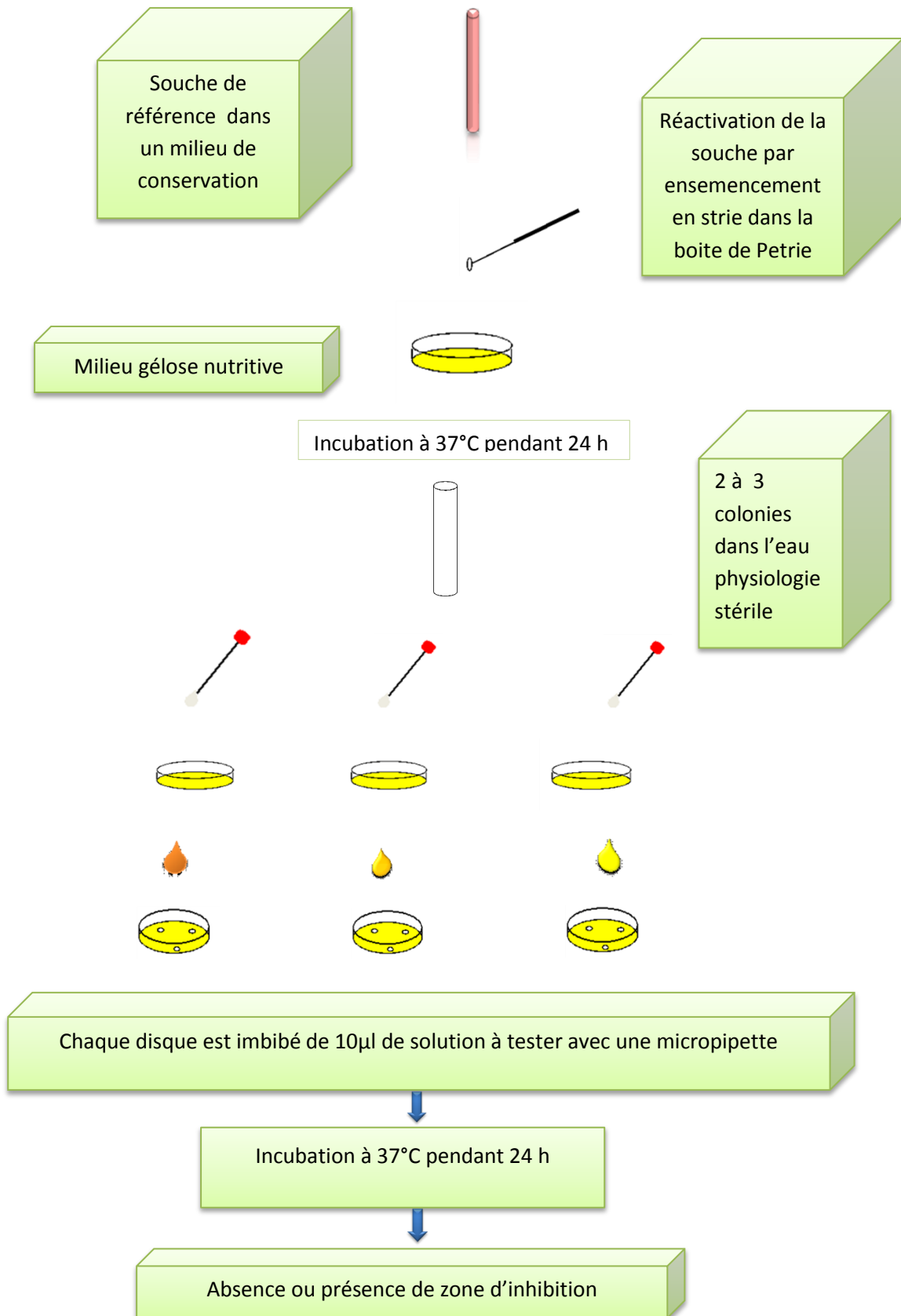


Figure 9 : Activité antibactérienne

II.2.2.4 Détermination de la CMI

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est la plus faible concentration d'antibiotique ou de substance antimicrobienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de dix-huit à vingt-quatre heures. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux substances antimicrobiennes (**Kablan et al., 2008**).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et de leurs mélanges ont été déterminées selon la méthode rapportée par **Satrani et al., (2007)**. Du fait de la non miscibilité de l'huile essentielle à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au $1/10^{\text{ème}}$, $1/25^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$, $1/200^{\text{ème}}$, et $1/1000^{\text{ème}}$ de cette solution d'agar. Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu solide TSA (Tryptic Soja Agar), stérilisés à l'autoclave (20 minutes à 121°C) et refroidis à 45°C, on a ajouté 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/5000 et 1/10000 (v/v). Puis on a agité convenablement les tubes avant de les verser dans des boîtes de Pétri. Un témoin, contenant le milieu de culture plus la solution d'agar à 0,2 % seule, a été également préparé.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine, à partir d'un bouillon de culture de 24 heures. L'incubation se fait à 37 pendant 24 heures.

Lecture

La concentration minimale inhibitrice est la concentration qui correspond à la boîte où il y a absence de croissance bactérienne.

Aligianis et al., (2001) ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/ml.
- Inhibition modérée : CMI varie de 0. 6 mg/ml à 1.5 mg/ml.
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/ml.

II.2.2.5. Application des huiles essentielles sur la chair de poisson

- **Préparation de la chair de poisson**

La chair de poisson (Sardine) a été achetée chez un vendeur de poissons local dans la ville de Ain defla (Algérie), puis transportée dans une enceinte réfrigérée ($3\pm 1^{\circ}\text{C}$) au laboratoire médicale de Zibouche (Ain Defla) dans les 15 mn qui ont suivi l'achat (**Djenane et al.,2012**) .

- **Inoculation de la chair de poisson par *klebsiella pnumoniae***

Avant inoculation avec la souche bactérienne (*Klebsiella pneumoniae*) et l'addition des différentes solutions testées (Eau distillée stérile (témoins) , HE.R, HE.T, HE.L, HE.R.T, HE.T.L, HE.R.L, HE.R.T.L), la chair de poisson a été coupée en 8 tranches de $50 \text{ g} \pm 5$.

Pour évaluer l'effet antibactérien des différentes solutions testées, les tranches de chair de poisson sont préparées selon les bonnes pratiques de manipulation. Les tranches étaient placées dans des sachets stériles individuels Stomacher, puis inoculées avec *Klebsiella pneumoniae* (5×10^3 ufc/g). Tous les échantillons inoculés étaient soigneusement homogénéisés pour assurer une bonne distribution de la charge bactérienne à travers toute la surface. Chaque solution testée a été additionnée à six (6) tranches de chair de poisson. Les échantillons ayant reçus ces différents traitements étaient placés dans des barquettes en polystyrène puis recouverts avec des sachets en plastique. Les échantillons de chair de poisson étaient stockés pendant 7 jours à 4°C.

Les analyses bactériologiques ont été réalisées à des intervalles de 3 jours (après 24h, 4 jours et 7 jours) sur une durée de stockage de 7 jours (**Djenane et al.,2012**) .

- **Analyse bactériologique**

À chaque intervalle d'analyse, des échantillons de 15 g sont placés individuellement dans des sachets stériles contenant 135 ml d'eau peptonée tamponnée. L'ensemble est homogénéisé à température ambiante pendant 1 minute dans un Stomacher (Stomacher 400-Circulator. Seward. Worthing, U.K.). Des dilutions décimales sont préparées dans de l'eau peptonée stérile (0,1 %). 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé dans le milieu approprié pour *klebsiella pneumoniae* . Toutes les boîtes de Pétri étaient incubées en aérobiose à 37°C/24-48h. Le milieu sélectif utilisé pour le dénombrement de *klebsiella pneumoniae* est MacConkey .Les résultats sont exprimés en \log_{10} ufc/g (**Djenane et al.,2012**) .

**Résultats
et
discussion**

III.1. Etude phytochimique

III.1.1. Teneur en eau

La détermination de la teneur en eau de la matière végétale a été obtenue par le séchage des feuilles des trois espèces étudiées (*Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L.) dans l'étuve à 70 C° jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Nos résultats ont révélé que la teneur en eau de *Rosmarinus officinalis* L. (65.33% \pm 0.2) est la plus importante, suivi par *Laurus nobilis* L. (48% \pm 0.37) et enfin *Thymus vulgaris* L. (21.70% \pm 0.1) (Figure III.1).

La teneur en eau des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. est proche de celle obtenu par **Athmena (2008)** dans son travail effectué sur la partie aérien (tige, feuilles et fleurs)(67.00 % \pm 0.89). Par contre, les teneurs en eau de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. sont différentes de façon remarquable à celle trouvé par **Yakhlef (2009)**, qui a travaillé sur les feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. de la même région(Batna), les proportions sont respectivement de 9.40 \pm 0.03% et de 6.79 \pm 0.18%.

Selon **Hamoudi et al., (2012)**, la différence marquée entre les teneurs en eau peut être expliquée par l'âge de la plante, la saison et la région de récolte. Les plantes cultivées dans les régions tempérées comme le sud Algérien ont une teneur en eau plus faible par rapport aux plantes cultivées dans le nord.

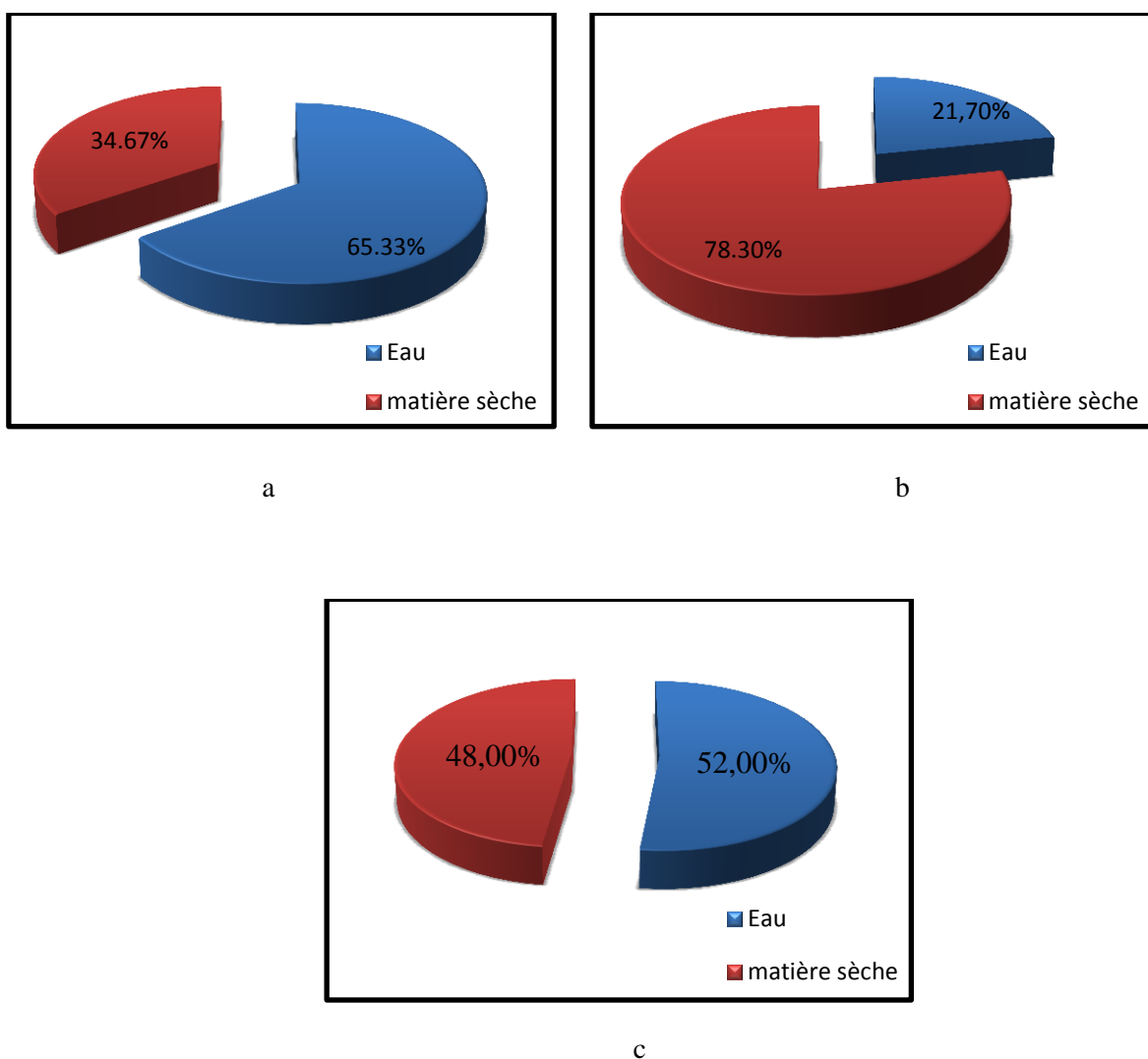


Figure 10: Teneurs en eau: (a) *Rosmarinus officinalis* L., (b) *Thymus vulgaris* L., (c) *Laurus nobilis* L.

III.1.2. Rendements en huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites de la matière végétale fraîche. Le rendement en huile essentielle varie beaucoup selon la plante utilisée. Nous remarquons que *Thymus vulgaris* L. présente le meilleur rendement en huile essentielle ($0.69\% \pm 0.01$) par rapport à *Laurus nobilis* L. ($0.34\% \pm 0.01$) et *Rosmarinus officinalis* L. ($0.3\% \pm 0.02$) (Figure III.2).

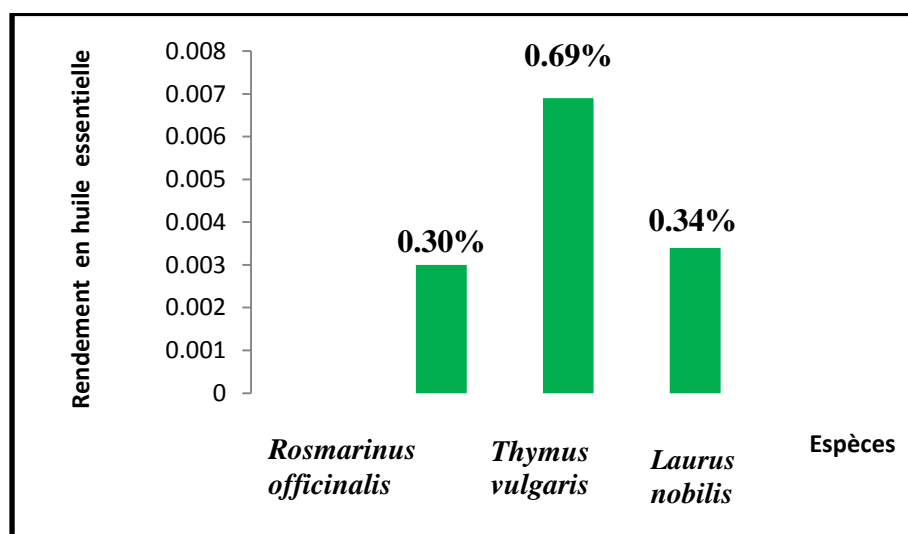


Figure 11 : Rendements en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L.,
Thymus vulgaris L. et *Laurus nobilis* L.

Rosmarinus officinalis L. présente un rendement inférieur à ceux signalés par d'autres travaux menés sur la même espèce de régions différentes. Ceux de Tlemcen (**Atik Bekkara et al., 2007**) ,d'Alger (**Djeddi et al., 2007 ; Boutekedjiret et al., 2003**) et Mascara (**Belkhodja et al., 2016**), présentent des taux relativement élevés : 0,6 % , 0,82% ,1,2% ,1,29%. Globalement ces travaux ont été effectués sur les feuilles et les fleurs du Romarin.

Le rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. de notre étude a été plus élevé que celui trouvé par **El Oualilalami et al., (2013)** qui ont travaillé sur les feuilles de la même espèce du Maroc (0.5%).

Les feuilles de laurier ont donné un rendement inférieur aux pourcentages rapportés dans d'autres travaux tels que **Ouibrahim et al., (2015)** et **Haddouchi et al., (2009)** où les rendements des feuilles étaient respectivement de 0.71% et de 1,2%.

Ces différences sont justifiées selon **Kelen et Tepe (2008)**, Par la période de récolte, le climat, la zone géographique, l'organe de la plante utilisé, la période de séchage, l'âge du matériel végétal et la technique d'extraction.

III.1.3. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III.1 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles étudiées

	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Liquide	Jaune pâle	Caractéristique, légèrement camphrée
AFNOR, 1999	Liquide mobile, limpide	presque incolore jaune pâle	Caractéristique, fraîche, Camphrée
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Liquide	Jaune	Forte odeur, caractéristique
Haddouchi et al., 2009	Liquide	Jaune	Forte odeur
<i>Laurus nobilis</i> L.	Liquide	Incolore	Aromatique
Ould Yerou Et al., 2016	Liquide	Incolore	Aromatique et piquante

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (1999). Aussi, celles de *Thymus vulgaris* L. sont en accord avec celles rapportées par Haddouchi et al., (2009). Il est de même pour *Laurus nobilis* L. où nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Ould Yerou et al., (2016) sauf pour l'odeur.

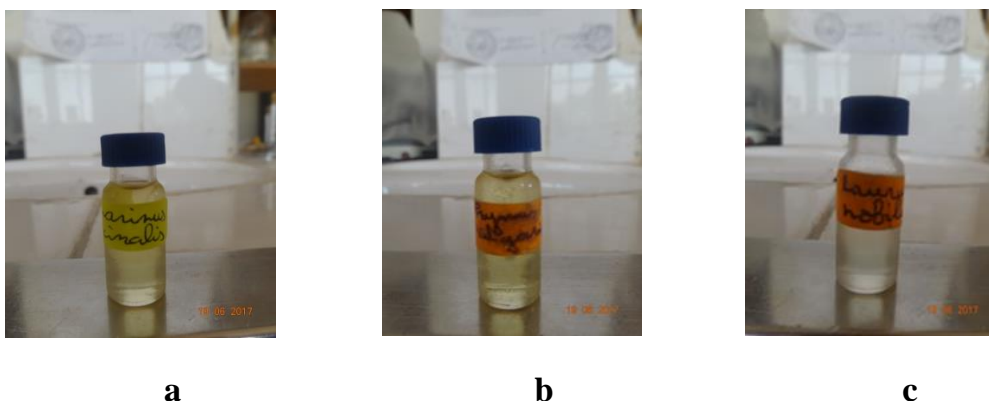


Figure 12 : Huiles essentielles : (a) *Rosmarinus officinalis* L. (b) *Thymus vulgaris* L. ,(c) *Laurus nobilis* L.

III.1.4. Caractères physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques telles que la densité, le pH, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester et l'indice de saponification constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles (Afssaps, 2008). Les résultats de notre caractérisation physico-chimiques sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau III.2: Caractères physico-chimiques des solutions testées

	Densité	pH	Indice de réfraction	Indice d'acide	Indice d'ester	Indice de saponification
HE.R	0.90	5.5	1.477	1.4	70.12	68.72
Afnor (1999)	-	6-7	1.356-1.500	0.5-2	-	-
HE.T	1.05	6	1.5030	9.25	28.05	18.8
Hadouchi et al., (2009)	0.9-0.95		1.491-1.510	8.4	18.2	-
HE.L	0.91	5	1.477	2.24	22.44	20.2
Ould Yerou et al., 2016	0,91-0,944	5à 6	0.46-1.477	2,25	22,44	-
HE.R.L	0.13	5	1.479	1.96	42.07	40.11
HE.R.T	0.22	5	1.500	1.68	56.1	54.42
HE.L.T	0.35	5	1.476	1.4	70.12	68.72
HE.R.T.L	0.39	5	1.501	1.96	36.46	34.5

Nos résultats concordent avec ceux données par AFNOR (1999) pour *Rosmarinus officinalis* L., et plus ou moins proche à ceux trouvés par **Ould Yerou et al., (2016)** pour *Laurus nobilis* L. et ceux dévoilés par **Hadouchi et al., (2009)** pour *Thymus vulgaris* L.

Les paramètres physico-chimiques différents suivant l'origine de l'huile essentielle. Ainsi, une huile de France n'aura pas les mêmes valeurs de paramètres qu'une huile d'Algérie, de la Tunisie ou de Madagascar. Tous ces paramètres sont influencés par les conditions édaphiques, climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes. Il est logique que leurs valeurs soient différentes d'un endroit à un autre dans le globe (**Kulkarni et al., 1996 ; Juliani et al., 2006**).

Selon **Yerou et al., (2016)**, la densité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinallis* L. et *Laurus nobilis* L. est de 0.90, 0.91. Ce qui indique une composition chimique complexe. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a une densité égale à 1.05. Ce qui indique que cette huile contient encore des séries aromatiques, les sulfures et nitrites. La densité des différents mélanges HE.RT, HE.RL, HE TL et HE.RTL est inférieur à 0.9 donc ce sont des mélanges riches en terpènes.

L'indice de réfraction est une grandeur qui nous permet d'identifier l'huile essentielle, aussi de contrôler sa pureté. En effet, un indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Boukhatem et al., 2010**).

L'indice d'acide peut nous aider à déterminer la qualité de notre produit, un produit à indice d'acidité faible est un produit de forte qualité. Car l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (**Lazouni et al., (2007)**).

Les valeurs des indices d'ester indiquent que l'ensemble des huiles contiennent d'importantes quantités d'acide libres, et il est admis que plus l'indice d'ester est élevé mieux est la qualité de l'huile plus la valeur de l'indice de saponification de l'huile essentielle est élevée ; plus le poids moléculaire est faible (**Hilan et al., 2006**).

III.2. Analyse par CG-MS

Seule l'huile essentielle de *Rosmarinus officinallis* L.a été analysée par CG-MS. Cette analyse a permis de dénombrer 42 substances représentant 79.86 % de l'ensemble des pics identifiés. L'ensemble est dominé par la présence du borneol (9.34%), du α pinène (8.22%), du 2-oxabicyclo (2.2.2) octane,1,3-Trimethyl-octane (7,64%), du camphore (6,94%) et du bornyl acétate (5.64%). Les monoterpènes constituent le groupe chimique majoritaire. (Figure III.4 et Tableau III.3).

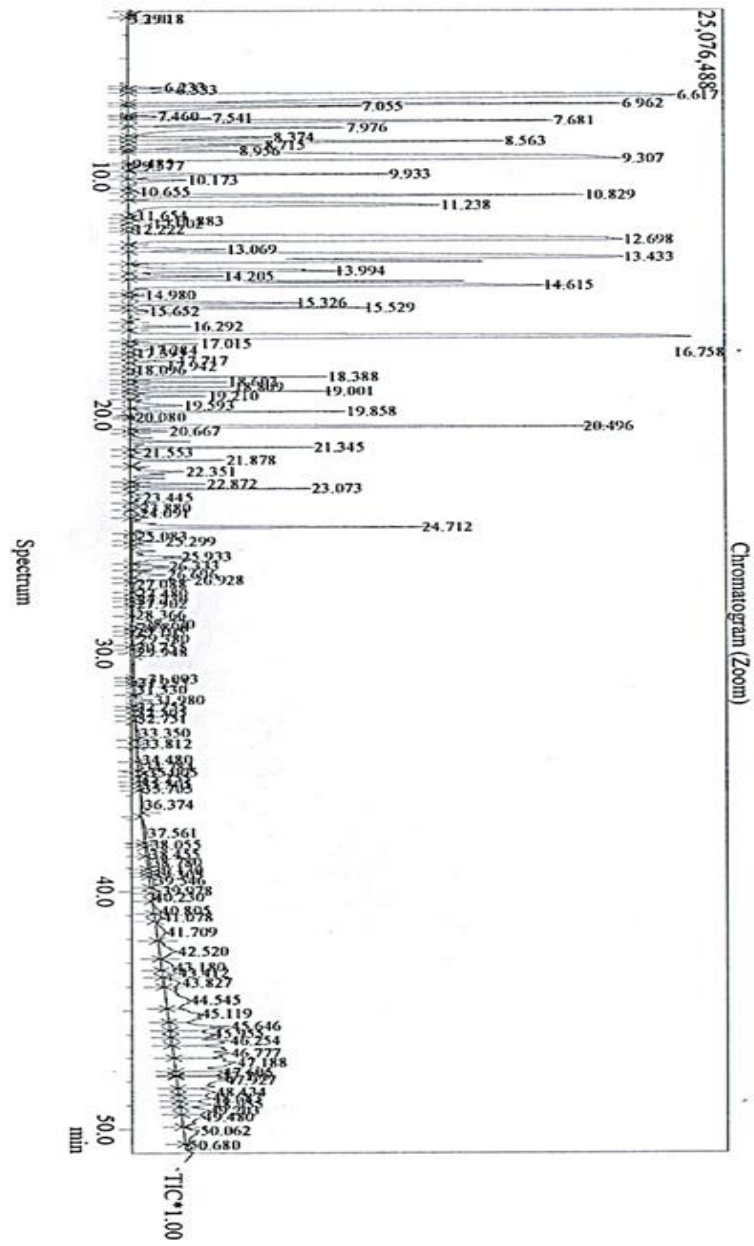


Figure 13 : Chromatogramme de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L.

N°	Temps de rétention (min)	Composants	Teneur (%)
1	6.333	α Thujen	0.36
2	6.617	α pinène	8.22
3	6.962	Camphène	2.78
4	7.055	γ Terpinène	1.53
5	7.541	Sabinène	0.38
6	7.681	β pinène	3.05
7	7.976	β -Myrcène	1.52
8	8.374	α -phellandrène	0.87
9	8.563	3-Carène	2.27
10	8.715	α Terpinène	0.91
11	8.956	α -Terpinyl acétate	0.57
12	9.577	β Ocimène	0.09
13	9.933	1,4Cyclohexadiene, 1-Methyl-4(1-Methylethyl	1.08
14	10.173	Sabinène hydrate	0.33
15	10.829	Terpinolène	2.27
16	11.238	Linalol	3.44
17	11.883	2-pinen-7-One	0.25
18	12.002	Nealloocimène	0.18
19	12.698	Camphor	6.94
20	13.069	Pinocarvone	0.58
21	13.433	Borneol	9.34
22	13.994	(+)- α -Terpinol (P-Menth-1-En-8-ol)	1.75
23	14.205	Myrtenol	0.50
24	14.610	Verbinone	5.03
25	14.980	Citronellol	0.07
26	15.326	3-Cyclihexane	0.91

N°	Temps de rétention (min)	Composants	Teneur (%)
27	15.52	Terpinyl acétate	1.25
28	16.758	Bornyl acétate	5.65
29	17.015	Carvacrol	0.27
30	17.717	Myrtenyl acétate	0.16
31	17.284	Limonen-6-ol, pivolate	0.07
32	18.388	γ Terpeneol	0.73
33	18.809	Camphène	0.33
34	19.001	Dihydrocabyll	0.70
35	19.858	Méthyl iso-eugenol 2	0.77
36	20.496	Caryophyllène	2.70
37	22.351	D Germacrène	0.63
38	22.872	γ Cadinène	0.33
39	23.073	Δ Cadinène	0.64
40	24.712	Caryophyllène oxide	1.74
41	25.299	Humulène oxide	0.15
42	26.696	Alloaromadendrène oxide-(1)	0.26
Totale			71.6

Les études réalisées par **Ayadi et al.,2011** sur *Rosmarinus Officinalis* L. cueillie en Italie, Turquie et Iran, montrent une importante variation dans la composition chimique de l'huile essentielle comparée à nos résultats. En effet l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. cueillie en Italie est constituée essentiellement de l' α -pinène (13,7%) ; de 1,8-cinéole (3,4%) ; de camphre (2,9%) et de verbanone (20,3%) alors que celle de cueillie en Turquie est composée principalement de l' α -pinène (7,8%) ; du 1,8-cinéole (60,9%) et du camphre (7,1%). Par contre l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. cueillie à Khmis Miliana est constituée essentiellement de borneol (9.34%), du α pinène (8.22%),du camphre (6,94%) et du bornyl acétate (5.64%).

La variation détectée dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. issue des différents pays est liée à plusieurs paramètres tels que : le facteur environnemental (Bernath et al., 1991), les conditions climatiques et géographiques qui changent d'un pays à un autre, et à la période de la cueillette (Fellah et al., 2006). La méthode d'extraction influe, également, considérablement sur la composition de l'huile essentielle (Bruneton, 1993)

III.3. Activité antibactérienne

Après le test d'antibiogramme, nous avons obtenu les résultats qui sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.4 : Diamètre des zones d'inhibition en mm des solutions testées

	HE.R	HE.T	HE.L	HE.RT	HE.TL	HE.RL	HE. RTL	Cip
Zone	13	37	10.66	21.66	14.66	12.66	24.66	27.66
d'inhibition	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.66	1.33	0.44	0.88	0.44	0.44	0.44	0.44

D'après nos résultats, nous avons remarqué que l'inhibition de la croissance microbienne varie selon l'espèce végétale utilisée.

L'antibiogramme avait pour but de rechercher la sensibilité de la souche vis-à-vis à l'antibiotique et de comparer son pouvoir inhibiteur à ceux des huiles essentielles étudiées. Nous avons testé l'activité de Ciprofloxacine qui est un antibiotique spécifique à *Klebsiella pneumoniae* par la même méthode de diffusion sur gélose.

La croissance de *K. pneumoniae* a été inhibée par tous les produits testés avec des proportions variables (Tableau III.4).

K. pneumoniae est plus sensible à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et moins sensible à l'huile de *Laurus nobilis* avec des diamètres d'inhibition de (37 mm±1.33 et 10.66 mm±0.44).

Il est important de noter que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. sur la souche testée est plus importante comparativement à l'antibiotique Ciprofloxacine ((27.66 mm±0.44).

L'effet antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Laurus nobilis* L. devient plus important lorsqu'elles sont mélangées entre elles ou avec l'huile de *Thymus vulgaris* L. Mais, cette dernière perd son pouvoir inhibiteur important quand elle est combinée avec les autres huiles essentielles.

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. à une activité antibactérienne faible par rapport à celle trouvée par **Djeddi et al., (2007)**. Ils ont trouvé que la zone d'inhibition de *Rosmarinus officinalis* sur la même souche *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) est de 25.1±0.02 mm alors que nous avons trouvé une zone de 13±0.66 mm.

L'importante bioactivité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. est liée avec les composés majoritaires ou bien minoritaires. En effet, **Okoh et al., (2010)** ont attribué l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* L. à la présence de bornéol, du l-Verbenone, du β-linalol et du camphor. Autre auteurs attribuent l'activité antibactérienne du romarin au 1,8 cinéole (**Miladi et al., 2013**) qui est l'un des composants minoritaires.

Nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par **Sidalli et al., (2014)** sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* L. Ils ont trouvé une zone d'inhibition égale à 10 mm alors que nous avons trouvé que *Klebsiella pneumoniae* est très fortement sensible à l'huile de *Thymus vulgaris* L. avec une zone d'inhibition de 37mm.

Cette grande activité peut être reliée à la présence du carvacrol et du thymol qui sont deux composés phénoliques, connus par leurs propriétés antimicrobiennes (**Bouhdid et al., 2006**). En effet, les huiles essentielles possédant ces composés phénoliques, sont hautement actifs contre les bactéries en raison de leur hydrophobicité (**Oussou et al., 2004 ; Abderrahim et al., 2010 ; Belhamel et al., 2008**).

Dorman et al., (2000) ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées.

Lambert et al., (2001) et **Juven et al., (1994)** ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne.

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

La sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* à l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. observée dans notre étude a été plus grande que celle trouvée par **Derwich et al., (2009)** et moins importante par rapport à celle de **Ouibrahim (2015)**.

L'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. est due à la présence de certains composés agissant probablement en synergie (**Derwich et al., 2009**).

Les α - et β -pinènes agissent en provoquant des effets toxiques sur la structure et les fonctions des membranes cellulaires des levures et des bactéries pathogènes. ils inhibent à la fois leur respiration et le processus de transport ionique, tout en modifiant la perméabilité cellulaire (**Mercier et al., 2009**).

L'action des terpènes sur les membranes semble être reliée à leur caractère lipophile, provoquant une expansion membranaire, une augmentation de sa fluidité et l'inhibition des enzymes membranaires (**Sikkema et al., 1994**).

Selon **Katryna et al., (2012)**, L'étude de l'effet de la combinaison de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. avec d'autres huiles essentielles montre que :

Le meilleur effet synergique a été constaté dans la combinaison avec l'huile de cannelle, de lavande et de mélisse. Cela a été traduit par l'augmentation de zone d'inhibition. Par contre, l'effet antagoniste a été observé par l'interaction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. et l'huile de laurier, d'orange amère, de menthe, de camphre, de myrte, et du romarin. Cela s'est traduit par une diminution de la zone d'inhibition. Donc l'effet des interactions entre les huiles essentielles dépend de l'interaction de leurs composants.

D'après l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par **Mutai et al., (2009)**, on a classé les huiles essentielles étudiées selon le diamètre d'inhibition par ordre croissant (Tableau III.5) :

Tableau III.5 : Classification des solutions testées selon le diamètre d'inhibition

Huile essentielle	Classement selon Mutai et al., (2009)	Diamètre(mm)
HE.L	Légèrement inhibitrice	$11 \leq D \leq 16$
HE.R	Légèrement inhibitrice	$11 \leq D \leq 16$
HE.RL	Légèrement inhibitrice	$11 \leq D \leq 16$
HE.TL	Légèrement inhibitrice	$11 \leq D \leq 16$
HE.RT	Fortement inhibitrice	$21 \leq D \leq 29$
HE.RTL	Fortement inhibitrice	$21 \leq D \leq 29$
Ciprofloxacine	Fortement inhibitrice	$21 \leq D \leq 29$
HE.T	Très fortement inhibitrice	$D \geq 30$

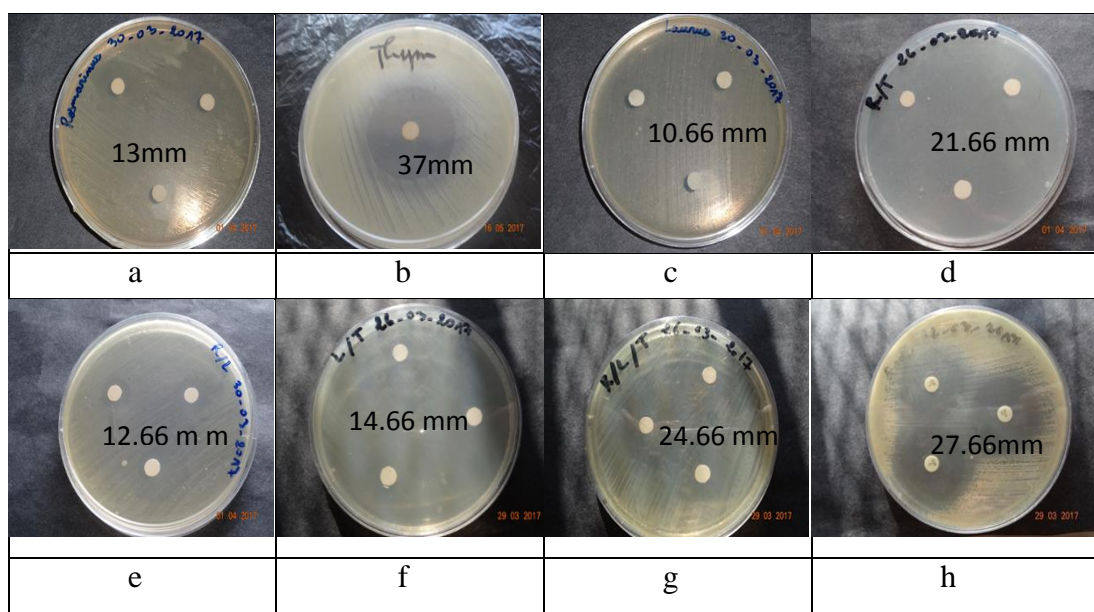


Figure III.5 : Effet inhibiteur des solutions testées vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* (a) : HE.R (b) : HE.T (c) : HE.L(d) : HE.RT (e) : HE.RL (f) : HE.RL (g) : HE.RTL (h) : l’antibiotique Ciprofloxacine

III.4. Concentration minimale inhibitrice

Le test antibactérien préliminaire montre que toutes les solutions testées présentent un effet antibactérien . Donc , le test suivant a pour objectif de déterminer la concentration minimale inhibitrice . Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau III.6 : Concentrations minimales inhibitrices

Dilutions Solutions testés	1/10 ^{ème} (100mg/ml)	1/25 ^{ème} 10mg/ml	1/50 ^{ème} 5mg/ml	1/100 ^{ème} 2.5mg/ml	1/200 ^{ème} 1.25mg/ml	1/500 ^{ème} 0.5mg/ml	1/1000 ^{ème} 0.25mg/ml	Témoin
HE.R	-	+	+	+	+	+	+	+
HE.T	-	-	-	-	-	-	+	+
HE.L	-	+	+	+	+	+	+	+
HE.R.T	-	-	-	-	-	+	+	+
HE.R.L	-	-	-	-	+	+	+	+
HE.T.L	-	-	-	-	-	+	+	+
HE.RTL	-	-	-	-	-	+	+	+

+ : présence de croissance

- : absence de croissance

Le tableau III.6 montre que la plus faible concentration minimale inhibitrice est celle de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. avec une concentration de 0.5mg/ml suivi de suivi de HE.RT , HE.TL et le mélange des trois huiles avec une valeur égale à 1.25mg/ml puis HE.RL avec une CMI égale à 2.5mg/ml . La CMI la plus élevée signalée est celle de *Rosmarinus officinalis* L. et *Laurus nobilis* L. (100mg/ml).

Nous avons remarqués que *Thymus vulgaris* L. présente la plus faible CMI par rapport à *Rosmarinus officinalis* L. et *Laurus nobilis* L. Mais pour les différents mélanges, une concentration de 1.25 mg/ml est nécessaire pour inhiber la croissance de la bactérie.

Notre résultat concernant la concentration minimale inhibitrice de l'huile de *Thymus vulgaris* L. contre *Klebsiella pneumoniae* concorde avec celui trouvé par **Al-Bayati et al., (2008)** qui a fait état d'une valeur de 0,5 mg/ ml. Par contre, la CMI de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est différente à celle trouvés par **Zaouali et al.,(2010)** , ou l'huile a signalé une valeur de CMI de 5mg/ml. Aussi, notre résultat en rapport avec *Laurus nobilis* L. est différent de celui trouvé par **Derwich et al., (2009)**, ou l'huile a enregistré une valeur de CMI de 0.70 mg/m.

Tableau III.7 : Classification des concentrations minimales inhibitrice des huiles essentielles selon **Aligiannis et al., (2001)**

Huile essentielle	Classement selon Aligiannis et al., (2001)	CMI
HE.T	forte inhibition	inférieure à 0.5 mg/ml
HE.RT	inhibition modérée	varie de 0.6 mg/ml à 1.5mg/ml
HE.RTL	inhibition modérée	varie de 0.6 mg/ml à 1.5mg/ml
HE.RL	faible inhibition	supérieure à 1.6 mg/ml
HE.TL	faible inhibition	supérieure à 1.6 mg/ml
HE.R	faible inhibition	supérieure à 1.6 mg/ml.
HE.L	faible inhibition	supérieure à 1.6 mg/ml.

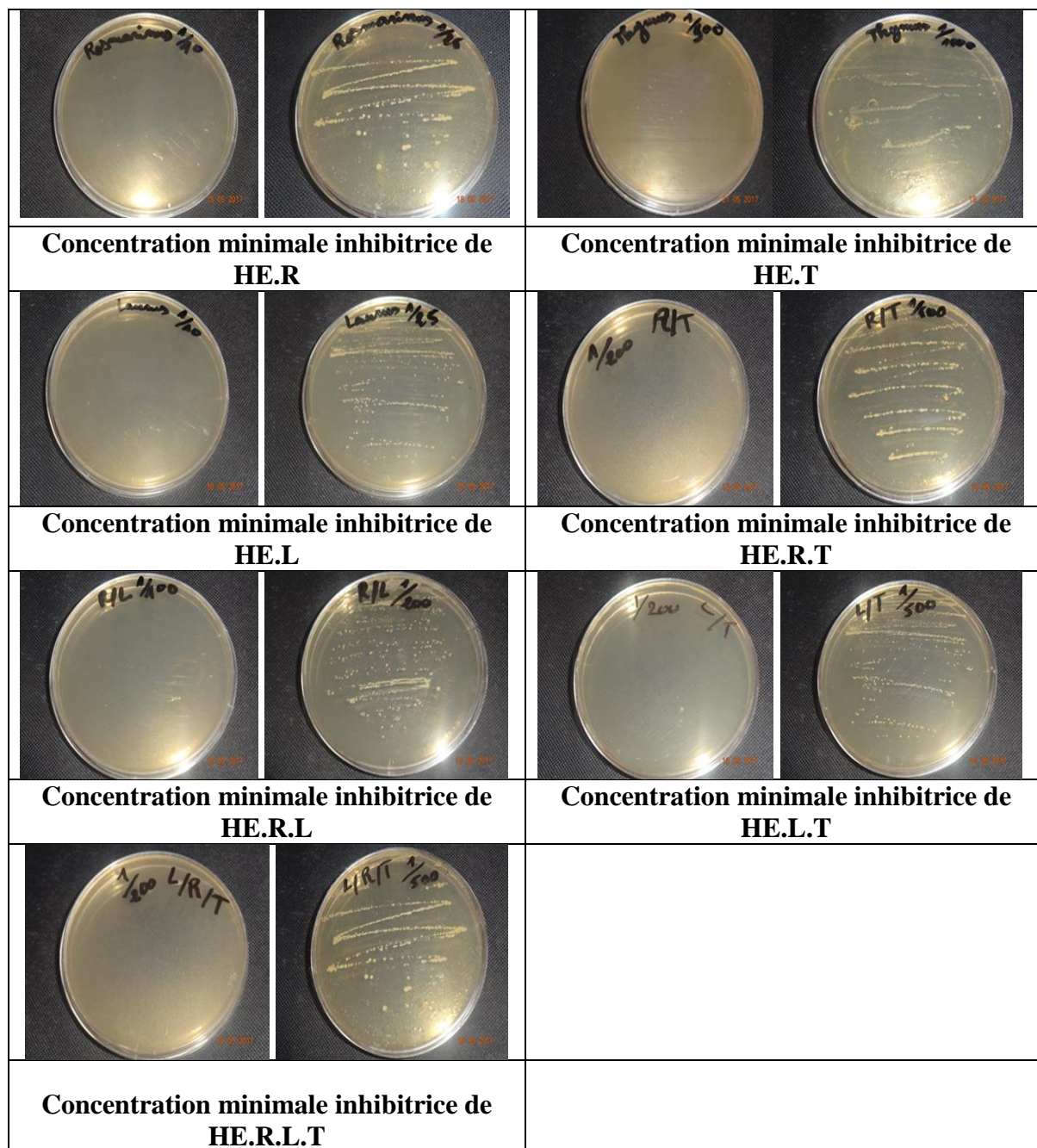
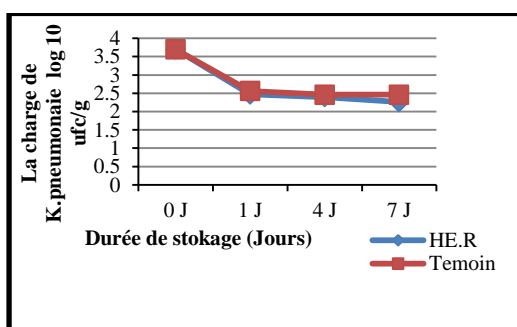


Figure III.6 : Concentrations minimales inhibitrices des solutions testées

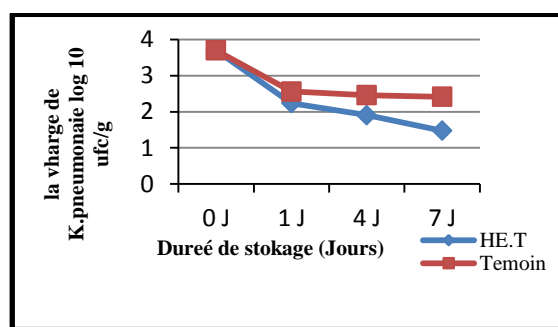
III.5. Activité antibactérienne des solutions testées appliquées sur la sardine

L'utilisation des huiles essentielles testées en bioconservation alimentaire visait en premier lieu à déterminer l'efficacité antibactérienne «in vitro» des huiles essentielles obtenues à partir des espèces végétales étudiées et en deuxième lieu à évaluer leur application comme bioconservateurs sur un produit largement consommé en Algérie « Sardine ». En se basant sur les résultats obtenus «in vitro», nous avons pu suivre la cinétique

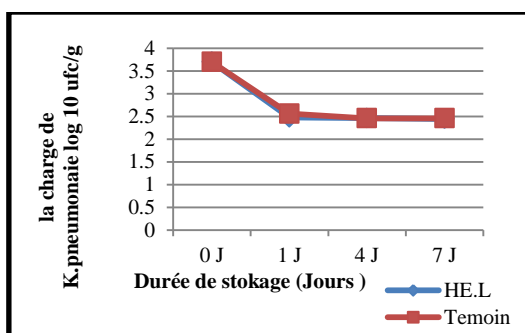
de développement de *K. pneumoniae* inoculée dans la sardine en présence des différentes solutions testées.



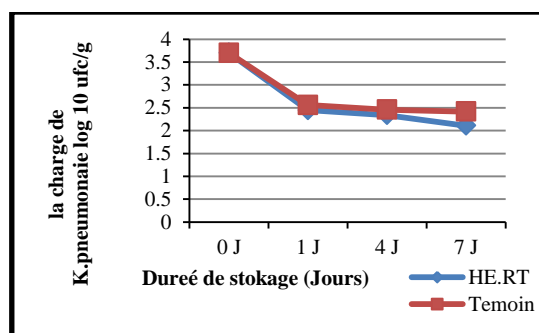
(a)



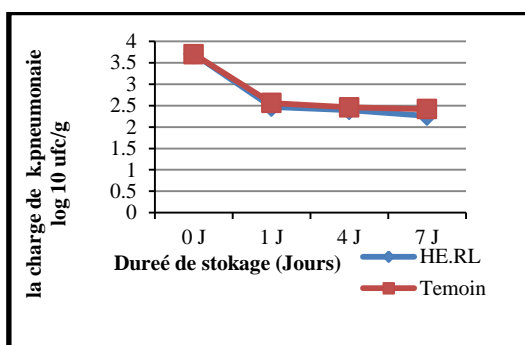
(b)



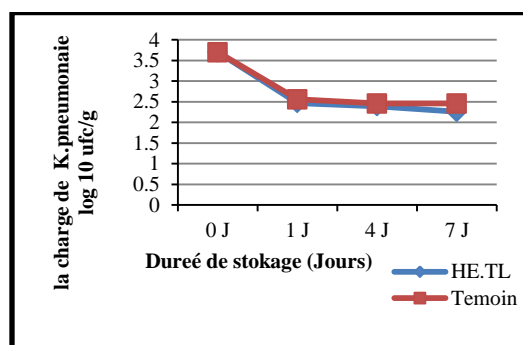
(d)



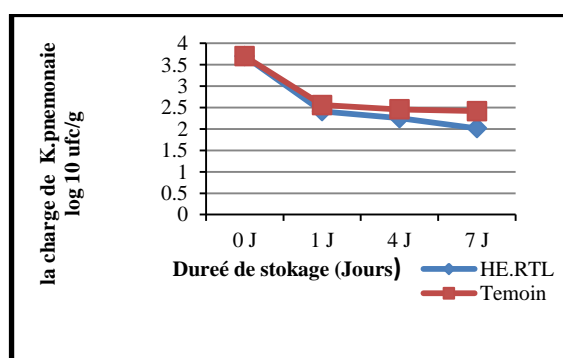
(c)



(e)



(f)



(g)

Figure III.7 : Effet inhibiteur des solutions testées : (a) HE.R, (b) HE.T, (c) HE.L, (d) HE.RT, (e) HE.RL, (f) HE.TL, (g) HE.RTL, vis-à-vis *k. pneumoniae* inoculée à la sardine

La Figure III.7 montre les résultats du développement de *K. pneumoniae* sur la chair du poisson conservé à $3\pm 1^{\circ}$ C en présence des différentes solutions testées. D'après ces résultats, il ressort que l'effet antibactérien exercé varie selon l'huile essentielle utilisée. Ainsi, toutes les solutions testées appliquées sur le produit exercent un effet antibactérien par rapport à échantillon non traité (Témoin). Cet effet est évident dès le 1er jour du stockage.

Le plus fort effet est présenté par *Thymus vulgaris* avec une charge bactérienne de $1.48 \log_{10}$ ufc/g enregistrée en dernier jour de stockage (7eme jour). Suivi par le mélange HE.RTL avec une charge égale à $2.02 \log_{10}$ ufc /g, puis HE.RT avec une charge bactérienne finale de $2.11 \log_{10}$ ufc/g ensuite HE.R, HE.TL et HE.RL avec des charges de 2,26 , 2.25, 2.26 \log_{10} ufc /g et enfin le plus faible effet a été signalé par *Laurus nobilis* dont la charge bactérienne est égale à $2.44 \log_{10}$ ufc/g.

Il faut souligner qu'une huile essentielle testée expérimentalement « in vitro » peut ne pas présenter le même effet dans un produit alimentaire. En général, selon **Burt, (2004)** pour obtenir un effet antibactérien significatif dans une matrice alimentaire, il faut des concentrations élevées de l'ordre de (5 – 20 μ l/g). En général, les huiles essentielles possèdent des odeurs assez forte et puissante ce qui peut être un facteur limitant pour leurs applications dans des denrées alimentaires. Cependant, selon **Caillet et Lacroix, (2007)**, les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré.

Oussalah et al., (2007), ont rapporté que la différence dans les activités antibactériennes des huiles essentielles peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et leurs interactions synergiques possibles.

La disponibilité d'éléments nutritifs dans les aliments comme les graisses, les protéines, les substances antioxydantes, le sel, et d'autres substances, ainsi que , le pH, la température, le type de conditionnement, et les caractéristiques du microorganisme, sans nul doute peuvent influencer l'activité des huiles essentielles. Ainsi, selon **Holley et Patel, (2005)**, à pH bas, l'hydrophobicité de certaines huiles essentielles augmente ce qui leur permet de se dissoudre facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne.

Burt, (2004) a suggéré qu'une faible teneur en eau dans les aliments peut entraver l'action des agents antimicrobiens envers les sites cibles dans la cellule bactérienne. Ainsi, un niveau élevé d'eau et de sel faciliterait l'action des huiles essentielles. Le même auteur a constaté aussi, qu'une teneur élevée en graisses peut réduire sensiblement l'action des huiles essentielles dans les produits carnés. Par formation d'une couche protectrice de graisse autour des bactéries ou bien la fraction lipidique dans l'aliment peut absorber l'agent antimicrobien en diminuant sa concentration et son efficacité dans la phase aqueuse.

Des analyses identiques ont été menées par **Foued Mestiri et al ., (2006)** sur l'anguille fumée , en étudiant l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* , *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* contre la flore mésophile aérobie totale. Ils ont trouvés que l'addition du thym, a permis une réduction de la flore aérobie mésophyte totale (FAMT) avec un effet améliorateur sur le goût et l'odeur de l'anguille fumée. Alors que l'addition du laurier, n'a pas eu d'effet sur les paramètres microbiologiques de l'anguille fumée. Cependant ce laurier a permis une amélioration très prononcée des qualités organoleptiques. Par contre, le romarin ayant été un peu moins apprécié par les dégustateurs.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressées à l'extraction et à la récupération des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis* par la technique d'hydrodistillation, à leur caractérisation physico-chimique, à l'étude de l'activité antibactérienne et enfin à l'application de ces huiles pour la bioconservation des poissons.

L'obtention des huiles essentielles par hydrodistillation reste une méthode simple et efficace, et donne des rendements intéressants. Le calcul des rendements moyens en huiles essentielles des plantes nous a révélé des valeurs importantes de 0.30 % \pm 0.02 pour *Rosmarinus officinalis*, de 0.34 % \pm 0.01 pour *Laurus nobilis* et de 0.69 % \pm 0.01 pour *Thymus vulgaris*.

Les analyses physico chimiques telles que la densité, le pH, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester et l'indice de saponification des huiles essentielles ont montrées que généralement les résultats sont conformes aux normes.

L'analyse par GC-MS a permis d'identifier 64 composés de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dont les principaux constituants sont : le Borneol (9.34%), le α Pinène (8.22%), le 2- (2.2.2) octane, 1,3-Triméthyl-ocimène (7.64%), le Camphre (6.94%) et le Bornyl acétate (5.64%).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles ainsi que leurs mélanges sur *klebsiella pneumoniae* a été déterminée selon la méthode d'aromatogramme. Cette technique a montré que toutes les huiles étudiées possèdent une activité antibactérienne contre la souche testée. Nous avons constaté que cette dernière est plus sensible à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (37 mm \pm 1.33) et moins sensible à l'huile de *Laurus nobilis* (10.66 mm \pm 0.44). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues varient d'une huile essentielle à l'autre, *Thymus vulgaris* possède la plus faible CMI 0.5mg/ml et la plus grande CMI est celle des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Laurus nobilis* (100mg/ml).

Quant aux résultats des tests de bioconservation de la chair de poisson, l'HE.T, HE.RTL, HE.RT se sont révélées très intéressantes par leur pouvoir antibactérien et semblent être appropriées comme agents naturels dans la préservation de chair de poisson.

Il sera intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries responsables de scombrotisme, telles que : *Enterobacter spp*, *Morganella psychrotolerans*, *Hafnia alvei*. Il sera aussi important d'évaluer l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante d'autres plantes aromatiques culinaires tels que la coriandre, le persil, le basilic et la menthe. Et enfin élargir l'usage de ces huiles essentielles pour la bioconservation des autres denrées alimentaires telles que les différents types de viande et autres.....

Références

Bibliographiques

Abderrahim, K., Belhamel, K., Chalchat, J.C., Figuérédo, G., (2010). « Chemical Composition of the essential Oil from *Artemisia arborescens* L. Growing Wild in Algeria., Records of Natural Product 4(1) 87-90 ».

Aboughe Angone, S. (2014). « Some properties of the medicinal plants essential oils of Gabon. 13, 5 pp. 283-287».

Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003). « Plants used in cosmetics. Phytotherapy research, 17, pp. 987-1000 ».

Adio A.M. (2005). « Isolation and structure Elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (Hepaticae).Thèse pour le degré du Dr. National à l'institut de la chimie organique, université de Hambourg 280p ».

Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS), (2008). « Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles; bd Anatole France - F-93285 Saint-Denis cedex ; 143/147 ».

AL-Bayati, F. (2008). « Synergistic Antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. Journal of Ethno-Pharmacology, 116, 403-406 ».

Amatiste, S., Sagrafoli, D., Giacinti, G., Rosa, G., Carfora, V., Marri, N., & Rosati, R. (2014). « Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. Italian Journal of Food Safety, 3(3) ».

Atailia, I., & Djahoudi, A. (2015). « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L'Hér.) cultivé en Algérie. Phytothérapie, 13(3), 156-162.».

Athamena, S., Laroui, S., & Athamena, M. (2015). « Phenolic Composition, Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*. Sciences et Technologie, 21-30 ».

Atik bakkara.F ., Bousmaha.L., Bendiab.T.,Boti.J.,Casanova.(2007). « Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie Santé, 7(1) ».

Aubry, P., & Gaüzère, D. B. A. (2014). « Intoxications par les animaux marins ».

Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., & Idaomar, M. (2008). « Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology, 46(2), 446-475 ».

Bassole , H., Kabore , Z., & Traore , A. (2001). « Etude des profils bactériostatiques et bactericides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. Pharm.Méd.Trad., 11, 113-122 ».

Belhamel, K., Abderrahim, A., Ludwig, R. (2008). « Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria, International Journal of Essential Oil Therapeutics 2 (4), 175-177» .

Belkhodja, H., Meddah, B., Touil, A. T., Şekeroğlu, N., & Sonnet, P. (2016). « Chemical composition and properties of essential oil of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba*. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences.5, 108-119».

Belmalha, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., & Echchgadda, G. (2015). « Chemical characterisation of some species of Moroccan middle atlas Thyme (Region of Midelt). Global Journal of pure and applied chemistry research, 3(2), 43-52 ».

Benkherara, S., Bordjiba, O., & Djahra, A. B. (2011). « Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Sauge officinalis: *Salvia officinalis* L.Sur quelques entérobactéries pathogènes. Revue Synthèse, 72(23) ».

Bennadja, S., Kaki, Y. T. A., Djahoudi, A., Hadeif, Y., & Chefrou, A. (2013). « Activity of the essential oil of Laurel (*Laurus nobilis* L.) On eight bacterial strains. Journal of life sciences, 7(8), 814-819 ».

Bentchicou.A. (1999). « Extraction caractérisation et analyse de l'huile essentielle de Thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Mémoire d'ingénieur université de Médéa ».

Bernard, T., Perineau, F., Bravo, R., Delmas, M., & Gaset, A. (1988). « Extraction des huiles essentielles : chimie et technologie. Information chimie, pp. 179-184 ».

Bernath, B., (1991). « Hethelyi, Herba Hung ».

Blaib.N, S. (2012). « Etude physico chimique et microbiologique des huiles essentielles de Fenouil. Mémoire de mastère université de Khemis Miliana ».

Bonou, J., Baba-Moussa, F., Noumavo, P. A., Ahouandjinou, H., Adéoti, K., Métognon, I., & Baba-Moussa, L. (2016). « Composition chimique et influence de différents tweens sur le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Ocimum Gratissimum*, *Ocimum Basilicum*, *Laurus nobilis* et *Melaleuca quinquenervia*. European Scientific Journal, 12 ».

Botineau, M. (2010). «Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc ».

Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N. S., & Abrini, J. (2006). « Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et Environnement Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 9-12».

Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., Saidi, F., & Hakim, Y. (2010). «Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) Cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie).Nature et Technologie, 37-45».

Bourkhiss, M., Hnach, M., Bourkhiss, B., Ouhssine, M., Chaouch, A., & Satrani, B. (2009). « Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vhl) Masters. Agro solution, 20(1) ».

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

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessiere, J. M. (2003). « Extraction of Rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour and Fragrance Journal, 18(6), 481-484».

Bruneton, J. (1999). « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Technique et documentation (éd. 2^{ème}). Paris: Lavoisier ».

Brunton, J. (1993). « Pharmacognosie photochimie, plantes médicinales. Paris: Lavoisier ».

Burt, S. (2004). « Essential oils: their Antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiologie, 94 (3), 223-253 ».

Cahuzac-Picaud, M. (2012). « Épices, herbes et aromates: usages culinaires et recettes. Diététique ,10, 109-116 ».

Caillet, S., & Lacroix, M. (2007). « Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Ed.Laboratoire de recherche en sciences Appliquées à l'alimentation (RESALA) de l'INRS-Institut Armand Frappier, Univ. Laval (Québec) ».

Collins, J. D., Noerrung, B., Budka, H., Andreoletti, O., Buncic, S., Griffin, J., ... & Klein, G. (2011). « Scientifique opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. Scientific opinion. Parma, Italy ».

Damerdji, A., Ladjmi, L., & Doumandji, S. (2005). « Malacofaune associée à *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae): Inventaire et aperçu biologique près de Mansourah (Tlemcen, Algérie. Sciences et Technologie(23), 11-20 ».

Degnon , R. G., Faton , A. N., Adjou, E. S., Tchobo, F. P., Dahouenon-Ahoussi, E., Soumanou, M. M., & Sohounhloue, D. C. (2013). « Efficacité comparée des huiles essentielles de deux plantes aromatiques dans la conservation post-fumage du Chinchard (Trachurus. Journal of Animal & Plant Sciences, 19(1), 2831-2839 ».

Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009). « Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(4), 3818-3824».

Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., & Skaltsa, H. D. (2007). « Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Rosmarinus officinalis* From Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 43 ».

Djenane, D., Yangüela, J., Derriche, F., Bouarab, L., & Roncales, P. (2012). « Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Nature & Technology, (7), 53 ».

Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology, 88(2), 308-316».

El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I. (2014). « Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L. et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées. Journal of Applied Biosciences, 82, 7481-7492 ».

Elharas, K., Daagare, A., Mesifioui, A., & Ouhssine, M. (2013). « Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus nobilis* et *Lavandula Angustifolia*. Afrique science, 9(2), 134-141 ».

Endrias, A. (2006). « Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'*Hibiscus sabdariffa* L. et à l'*Artemisia annua* (Doctoral dissertation) , Institut national polytechnique de Toulouse ».

Fadil.A.Farah.T.H.S.R (2014). « Ethnobotanical Survey of plants operated by cooperatives and associations of the Meknes-Tafilate aera in Morocco. Phytothérapie ».

Farah, A., Fechtal, M., & Chaouch, A. (2002). « Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles d'eucalyptus cultivés au Maroc. Biotechnol.Agron.Soc.Environ., 6(3), 163-169 ».

Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006). « Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Journal-Société Algérienne De Chimie, 16(2), 193».

Figuredo, G. (2007, Février). « Etude et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issue de graines d'origine méditerranéenne. (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II) ».

Frély, R. (2006). « Votre beauté par les plantes (Vol. 15). Borée Ameroun. Biotechnol.Agron. Soc. Environ, 13(1), 77-84 ».

Gauriat, E. (2015). « Accompagnement d'une rééducation physique post-traumatique par l'aromathérapie. Thèse de doctorat en pharmacie ».

Ghourri, M., Zidane, L., & Douira, A. (2013). « Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 7(4) ».

Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). « Phytothérapie anti-infectieuse. Paris : Springer-Verlag France ».

Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). « Phytothérapie anti-infectieuse. Springer Science & Business Media ».

Haddouchi, F., Lazouni, H. A., Meziane, A., & Benmansour, A. (2009). « Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie, 5(2) ».

Hamideh, J., Hesamzadeh Hejazi, S. M., & Babayev, M. S. (2009). « Karyotypic Studies of three *Thymus* (Lamiaceae) species and populations in Iran. 62(4), 316-325 ».

Hamoudi N. (2012). « Caractéristiques des huiles essentielles et son application antimicrobienne de la plante *Ocimum basilicum* ; mémoire DEUA ; Univ. Khemis Miliana ».

Hernandezchoa.L.R. (2005). « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif d'origine végétale ». Thèse de Doctorat de L'Institut National Polytechniques de Toulouse, France ».

Hilan, C., Sfeir, R., Jawish, D., & Aitour, S. (2006). « Huiles essentielles de certaines plantes médicinales Libanaises de la famille des Lamiaceae. Lebanese Science Journal, 7(2), 13-22 ».

Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011). « Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bultin de la Société Royale des Sciences de liège, 80, 824-836 ».

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

Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., & Dufosse, L. (1998). « Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. Sciences des Aliments (France) ».

Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). « Essential oils in Food preservation: mode of action, synergies, and interactions with Food matrix components. Front.Microbiol ».

Ichiro, A., E., R. E., Thomas., M., & Berton, Z. (1974). « Biologically Active Components from Mycobacterial Cell Walls.I.Isolation and Composition of Cell Wall Skelton and Component P3. Jurnal of the National Cancer Institute ».

Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). « Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. Int. J. Agric. Biol, 11(2), 205-208 ».

Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y. J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C. J., ... & Liu, X. L. (2011). « Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Rosemary. Cover image, 32, 63-68 ».

Juliani, H. R., Koroch, A., Simon, J. E., Hitimana, N., Daka, A., Ranarivelo, L., & Langenhoven, P. (2006). « Quality of geranium (*Pelargonium* sp) : Case studies in southern and eastern Africa. Journal of essential oil Research, 18-116 ».

Juven B.J., Kanner J., Schved F. & Weisslowiez H., 1994 « Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacteriol., 76, 626-631 ».

Kablan, B. J., Adiko, M., & Abrogoua, D. P. (2008). « Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. Phytothérapie, 6(5), 282-288 ».

Kelen. M. Tepe. B., (2008). «Chemical cmposition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora; Bioresource Technology; 99,4096-4104».

Khan, I.A, E. A. (2010). « Used in Food, Drugs, And Cosmetics (éd. 3 éme). Wiley ».

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. Algerian Journal of Natural Products, 2(1), 18-26».

Khia M, Ghanmi B, Satrani A, Aafi M, Aberchane B, Quaboul A, Chaouch N Amusant Z , Charrouf.2014). « Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc. Culture de plantes médicinales, 12, 341-347».

Khiari, D., & Boussaid, M. (2000). « Diversité phénotypique de quelques populations de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) en Tunisie. Tropicultura, 18(4), 203-207».

Kon, K., & Rai, M. (2012). « Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with other essential oils. Biosciences, 4, 50-56».

Kouche.M (2015). « Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale endémique algérienne "*Thymus numidicus* Poiret". Thèse de doctorat université de Annaba ».

Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). « Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry, 100, 526-534 ».

Kulkarni, R. N., Baskaran, K., Ramesh, S., & Kumar, S.1996). «Variation for essential oil content and composition in plants derived from leaf cutting of Rose cented geranium. Industrial crops and products(6), 107-112 ».

Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E., & Shok, M. (2003). « Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. Phytomedicine, 10, 59-61 ».

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E., 2001. « A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol., 91, 453-462 ».

Lazouni, H.A., Benmansour A., Taleb-Bendiab S.A., Chabane Sarid., (2007). « Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. Sciences & Technologie, 25: 7-12 ».

Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). « Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography A, 1043, 323-327 ».

Maarof, G. (2016, April). « Scombrotisme en Syrie (cote syrienne) (A large outbreak of allergy-like food poisoning [scombroid poisoning] associated with eating fish in Lattakia). *Revue Française d'allergologie*, 56, 277-278. Paris ».

Mayer, F. (2012). « Utilisations thérapeutiques des Huiles Essentielles : Etude de cas en maison de retraite. 7-10 ».

Mayer, F. (2012). « Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite. 7-10 ».

Mercier, B., Prost, J., & Prost, M. (2009). « L'huile essentielle de terebenthine et sa partie la plus volatile (α -et β -pinène) : Une revue bibliographique. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 22(4), 331-342. ».

Messai, L. (s.d.). « Etude phytochimique d'une plante médicinale de l'Est Algérien. Thèse de doctorat en chimie organique, université de Constantine ».

Mestiri, F., Zerai, T., Romdhane, M., & Mejri, S. (2006). « Effet de l'addition du thym, du laurier et du romarin sur la conservation de l'anguille fumée. *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, 33 ».

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

Monod, T. (1978). « Les rosas de sancta marya de gileanes (1434). Coimbra, XXVI ».

Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., & Roussis, V. (2009). « Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of ethnopharmacology*, 123(1), 143-148 ».

Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). « Plantes belonging to the genus *Thymus* as Antibacterial agents : From farm to pharmacy. *Food Chemistry* 173, 339-347. »

Naggar, M., & Iharchine, K. (2015, September). « Pour une valorisation durable des produits forestiers non ligneux cas des faciès à romarin de l'Orient du Maroc. *Ressources Médicinales de la flore Française, Tome II Vignot Freres*. Paris ». *Journal of Environmental Biology*, 28(4), 731-733 ».

Nemet, Skrinjar M. M. (2009). « Caractérisation et variabilité des plantes à parfum aromatiques et médicinales de Corse et de l'Ouest algériens. *Apteff*, 40, pp. 1-220 ».

Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., & Afolayan, A. J. (2010). « Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Journal homepage, 120, 308-312 ».

Ouibrahim A 2014 « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Thèse de doctorat ».

Ouibrahim A, Tlili-Ait Kaki Y, Bennadja S, Mansouri R, Ait Kaki S, Khbizi S, Djebbar M-R. (2015). « Activité antioxydant et anti -candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* Provenant de la région d'El Kala (Nord-Est Algérien). Algerian Journal of Natural Products, 3(3), 209 ».

Ould Yerou, K., Boumediene, M., & touil Aicha, T. (2015). « Propriétés of *Laurus nobilis* from Mascara (Algeria). International Journal of Multi disciplinary, 4 ».

Oussalah, M., Caillet, S., & Lacroix, M. (2006). « Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157 :H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food protection, 96(5), 1046-1055 ».

Oussou, K.R., Kanko, C., G. N., Yolou, S., K, G., Dosso, M., Guessan (2004). « Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. C. R. Chimie. 7 1081 -1086 ».

Patrakar, R., Mansuriya, M., & Patil, P. (2012). « Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus Nobilis*. International journal of pharmaceutical and chemical sciences, 1(2) ».

Polese, J. -M. (2006). « La culture des plantes aromatiques. Artemis ».

Porte, A., & Godoy, R. L. (2008). « Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (Thyme) essential oil from the Rio de Janeiro state (Brazil). Journal of the serbian, 73(3), 307-312 ».

Proprieties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora; Bioresource

Quezel , P., Santa, S. (1963). « La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Tome II.CNRS ».

Roux, D. (2008). « Conseil en aromathérapie. (W. Kluwer, Éd.) France ».

Sangun, M. K., Aydin, E., Timur, M., Karadeniz, H., Caliskan, M., & Ozkan, A. (2007). « Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different régions of Hatay, Turkey ».

Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Fougrach, H., Bourkhiss, B., & Talbi, M. (2007). « Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. Bull Soc Pharm Bordeaux, 146, 85-96 ».

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). « The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of food microbiology, 117(1), 112-119 ».

Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C. S., Srivastava, B., & Dubey, N. K. (2008). « Antimycotic and antifungal toxicity of *Adeno calymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. International Biodeterioration et Biodégradation, 62, 348-351 ».

Sidali, L., Brada, M., Fauconnier, M-L., Lognay, G. (2014). « Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. phytochem et Biosub journal, 8(3) ».

Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., & Marin, P. D. (2004). « The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. Phytotherapy Research, 18(9), 713-717 ».

Sousa, E. M., Chiavone-Filho, O., Moreno, M. T., Silva, D. N., Marques, M. O. M., & Meireles, M. A. A. (2002). « Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippa siddoides* cham. Using pressurized carbon dioxide. Brazilian Journal of chemical Engineering, 19(2), 229-241 ».

Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999). « Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW, 1-17 ».

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010) « Antimicrobial herb and spice compound in food. Food Control, 21, 1199-1218 ».

Tchoumboungang, F., Dongmo, P. M. J., Sameza, M. L., Mbanjo, E. G. N., Fotso, G. B. T., Zollo, P. H. A., & Menut, C. (2009). « Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun/Larvicidal activity against *Anopheles gambiae* Giles and chemical composition of essential oils from four plants cultivated in Cameroon. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 13(1), 77 ».

Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). (2005). « Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris: Tec & DOC ».

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., & Bisignano, G. (2005). « Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(6), 2474-2478 ».

Wenqiang , G, Li, S., Yan, R., Tang, S., & Quan, C. (2007). « Comparaison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction méthodes. *Food Chemistry*, 101, 1558-1564 ».

Wink, M. (2003). « Evaluation of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19 ».

Wylock, M. (1972). « Les aromates dans les tablettes Ge de Mycénes. *Studi micenei edegeo-anatolici* (Vol. 15) ».

Yakhlef.G. (2010). « Etude de l'activite biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. mémoire de magister en biochimie Appliquée , Batna ».

Zhiri, A. (2006). « Aromathérapie: un peu d'histoire. *Science , Nutrition ,Prévention et santé*, 6 ».

Annexe 01

Matériel utilisé

Appareillage	Verrerie	Matériel consommable	Solutions, milieux de culture et produits
-Balance de précision	-Béchers	-Micropipette	-Gélose nutritif
-Bain marie	-Tubes à essai	-Pince	-Gélose Muller Hinton
-Etuve	-Pipette pasteur	-Anse de platine	-Gélose TSA
-Hot ventilée	-Ballon à fond plat à col rond	-Portoir	-Gélose Mac Conky
-Spectrophotomètre	-Erlenmeyer	-Ecouvillons	-Bouillon nutritif
-Bec Bunsen	-Burette	-Boite pétrie	-Solution d'agar à 0.2%
-Agitateur	-Verres de montre	-Disque d'antibiotique	-Phénolphtaléine
-Vortex	-Flacon en verre	-Pipettes pasteurs	-Ethanol
-Autoclave		-Disques vierges	-KOH (Hydroxyde de potassium) a 0.1 N et 0.5 N
-Cleevenger		-Epindorffs	-HCL (Acide chlorhydrique) à 0.5N
		-Spatule	-Eau peptonée
			-Eau physiologie

Annexe 02

Appareillages



Figure 1 : Bain marie



Figure 2 : vortex



Figure 3 : Etuve d'incubation



Figure 4 : Autoclave



Figure 5 : Balance



Figure 6 : Spectrophotomètre



Figure 7 : Bec bunsen



Figure 8 : Hôte ventilée bactériologique

Annexe 3

1. Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis* L

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids frais(g)	10	10	10	10	0
Poids sec après 24h (g)	3.58	3.63	3.66	3.62	0.02
Poids sec après 48h (g)	3.56	3.61	3.63	3.6	0.02
Poids sec après 48h	3.46	3.45	3.5	3.47	0.02
Teneur en Eau (%)	65.4	65.3	65	65.33	0.2

2. Teneur en eau de *Thymus vulgaris* L

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids frais(g)	10	10	10	10	0
Poids sec après 24h (g)	7.82	7.83	7.85	7.83	0.01
Teneur en Eau (%°)	21.8	21.7	21.5	21.7	0.1

3. Teneur en eau de *Laurus nobilis* L

	1^{er} essai	2^{ème} essai	3^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids frais(g)	10	10	10	10	0
Poids sec après 24h (g)	5.2	5.17	5.27	5.21	0.03
Poids sec après 48h (g)	5.19	5.16	5.26	5.2	0.03
Teneur en Eau (%)	48.1	48.4	47.4	48	0.37

Annexe 4

1. Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids des feuilles sèches (g)	52	52	52	52	0
Poids de l'huile essentielle (g)	0.18	0.14	0.17	0.16	0.01
Rendement (%)	0.34	0.27	0.32	0.3	0.02

2. Rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris* L

	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids des feuilles sèches (g)	117.37	117.37	117.37	117.37	0
Poids de l'huile essentielle (g)	0.8	0.84	0.84	0.82	0.01
Rendement (%)	0.86	0.71	0.69	0.69	0.01

3.Rendement en huile essentielle de *Laurus nobilis* L

	1^{er} essai	2^{ème} essai	3^{ème} essai	Moyenne	Ecartype
Poids des feuilles sèches (g)	78	78	78	78	0
Poids de l'huile essentielle (g)	0.26	0.27	0.28	0.27	0.01
Rendement (%)	0.33	0.34	0.35	0.34	0.01

Annexe 5

La charge bactérienne de *klebsiella pneumoniae* exprimé en log décimale pendant les 7 jours de stockage

Log 10 ufc/g															
	1 ^{er} jour				M	4 ^{ème} Jours				M	7 ^{ème} Jours				M
	10-1	10-2	10-3	10-4		10-1	10-2	10-3	10-4		10-1	10-2	10-3	10-4	
HE.R	> 300	> 300	2,47	2,46	2,46	2,4 4	2,40	2,38	2,35	2,39	2,32	2,29	2,25	2,32	2,26
HE.T	2,30	2,25	2,20	2,15	2,23	2,0 7	1,99	1,84	1,70	1,9	1,47	< 30	< 30	< 30	1,4
HE.L	> 300	> 300	> 300	2,47	2,47	2,4 6	2,43	2,42	2,41	2,46	2,39	2,38	2,36	2,34	2,36
HE.RT	> 300	> 300	2,46	2,43	2,44	2,3 9	2,36	2,32	2,27	2,34	2,20	2,14	2,07	2	2,10
HE.RL	> 300	> 300	2,47	2,46	2,47	2,4 3	2,40	2,38	2,34	2,39	2,32	2,29	2,25	2,17	2,26
HE.TL	> 300	> 300	2,47	2,46	2,46	2,4 3	2,39	2,38	2,34	2,39	2,32	2,28	2,24	2,17	2,25
HE.RT L	> 300	2,47	2,39	2,36	2,41	2,3 2	2,27	2,23	2,17	2,25	2,11	2,04	1,95	1,84	2,01
Témoin	> 300	> 300	> 300	2,47	2,56	2,4 7	2,46	2,45	2,45	2,45	2,45	2,44	2,43	2,43	2,41