



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

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'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie.

Filière: Biologie et Agro Sciences.

Option: Analyses Biologiques et Biochimiques

Thème :

Activité antibactérienne des huiles fruitées (*Citrus limon* ; *Prunus armeniaca*) en fonction du pH et la température du milieu de traitement

Présenté par:

M^{elle}: *YKHELEF WISSAME*

M^{elle} : *KLALIB BASMA*

Soutenu le: 07 Juin 2015 devant le jury :

M^{elle}. Guetarni. H	Présidente	MAB
M^{me}. Daoudi. A	Examinatrice	MAB
Mr Bouras. H	Examineur	MAA
Mr AIT OUAZZOU. A	Promoteur	MAB

Année universitaire 2014/2015



Remerciements

Nos premiers remerciements vont au bon dieu le tout puissant, pour la force, la volonté et la patience qu'il nous a donné pour mener à bien ce travail.

Nous adressons nos plus vifs remerciements et nos sincères reconnaissances et gratitude à:

Nos chers parents qui nous ont guidés depuis notre enfance vers le chemin du savoir ;

Nous remercions notre Professeur AIT OUAZZOU.A, le promoteur de ce mémoire, pour avoir encadrée ce travail. Nous tiens à vous remercier pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils, votre objectivité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Il m'est aussi d'un agréable devoir de vous adresser un grand merci pour la sympathie, la confiance et la liberté d'action dont nous avons bénéficié tout au long de ce mémoire.

M^{elle}. Guetarni. H :*Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury, à qui nous adressons nos sincères gratitude;*

Mr Bouras. H et M^{me}. Daoudi. A *Qui ont bien voulu sacrifier une partie de leur temps pour examiner ce travail;*

En fin nous tenons à remercier tous nos professeurs du primaire jusqu'à l'université ainsi à ceux que n'ont pas été cités par omission involontaire de nos par et qui ont contribué à la réalisation de ce travail, nous leurs présentons tous nos excuses et nous disons merci à toute et à tous.

Dédicaces

Avec une énorme joie et infini plaisir, que je dédicace ce modeste travail, aux prunelles de mes yeux , aux deux plus chères personnes de ma vie, pour leur soutien, leur amour et leur patience ,à mes chères parents;

Je leurs dis: je vous amies.

À mes grands parents, que dieu les protèges;

À ma chère sœur: Rachida et son fiance amine.

À mes chères tantes :Zhor ,Djamila, Zinabe, Fatima et Khadhra;

À mes oncles: Mohamed; Slimane; Ali et Abdelkader; et toutes la famille klalib.

À ma très chère sœur et amie; ma binôme Wissame et toute sa famille ;

À mes chères amies :Ahlem ,Bahiya, Sabrina, Naçira, Malika, Amina, Hadjer; Wafa et Farida;

À tous les étudiants de la promotion d'Analyse Biologie et Biochimie 2014/2015;

À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail;

À tous ceux que j'aime et m'aiment;

À mon pays l'algie.

BASMA

Dédicaces

Je dédie le fruit de mes études tout d'abord à mon dieu le savant qui ma donné sa bénédiction du savoir

A l'être le plus cher à mon cœur, à celle qui m'a guidée pour faire mes premiers pas et qui m'a appris mon premier mot, à celle qui fut toujours à mes côtés, qui a illuminé mes nuits sombres et a ensoleillé mes jours avec son inépuisable affection, qui représente toutes les choses positives de ma vie. À ma mère

À mon très cher père qui m a tout appris, pour toutes les peines et Les sacrifices qu'il s'est donné pour me voir réussir dans la vie.

À ma grande mère que le dieu la protège

À mon frère Mohamed qui m'ont soutenu pendant mes études.

À mes sœurs, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse : Massouda, Djamila, Hanane, Hakima.

*À la personne que j'ai trouvée aux moments difficiles de ma vie
« Mon future mari », Ismail.*

À mes oncles et mes tantes et leurs familles.

À ma très chère amie et ma binôme Basma et toute sa familles.

À toutes mes chères amies: Saliha, Rabia, Naima, Amina, Razika, Sabrine

À toutes les étudiants de la promotion d'analyses biologiques et biochimiques.

À tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

À mon pays l'Algérie.

Wissame

Résumé

Les conservateurs alimentaires synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets indésirables sur la santé. En plus, de la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles fruitées de *Citrus limon* et *Prunus armeniaca*, les deux huiles testées présentent une activité antibactérienne faible soit à pH4.0 au pH7.0 contre *S. aureus* et *E. coli* O157:H7, le nombre de cycle inactivé est de l'ordre 3 à 4 cycles \log_{10} après 24h de traitement à une concentration 200 ppm.

A l'essor de cette étude, nous pouvons conclure que les huiles utilisés dans notre expérience contiennent certains composés essentiels qui sont responsable d'activité antibactérienne.

Mots clés: Huile essentielle; activité antibactérienne ; *S. aureus* ;*E .coli* O157: H7;*Citrus limon*; *Prunus armeniaca*.

Abstract

The synthetic food conservatives are limited in several countries, because of their undesirable effects on health. Moreover, the current trend of the consumers seeks a more natural food increased during these last decades. Several research tasks have concentrated on the essential oils extracted from the aromatic plants. The various results published have indicated that they are endowed with several biological properties. In this context, we tried to evaluate, antibacterial activities of essential oil *Citrus Limon* and *Prunus Armeniaca*, both tested oils have a low antibacterial activity their pH4 to pH7; *S.aureus*. And *E.coli*O157:H7, the inactivated cycle number is 3-4 log 10 cycles for 24 hours in 200 ppm concentrations

In the development of this study, we can conclude that the oils used in our experiment are fruity oils contain some compounds of essential responsible for the antibacterial activity.

Keywords: Essential Oil; antibacterial activity; *S. aureus* ; *E. coli*O157:H7; *Citrus limon*; *Prunus armeniaca*.

الملخص

لما تسببه من نلاحظ في هذه الأعوام الأخيرة منع استعمال الحوافظ الغذائية الصناعية في الكثير من دول العالم، كما نلاحظ أن المستهلك أصبح يبحث عن الأغذية التي لا تحتوي على المواد المصنعة أعراض جانبية على الصحة، في هذا الإطار حاولنا تركيز الكثير من الأبحاث على دراسة الزيوت الأساسية المستخرجة من النباتات العطرية، دراسة الفاعلية المضادة للبكتيريا لزيت الليمون والمشمش، بينت لنا النتائج ان هذه الفاعلية ضعيفة في درجة حموضة 4 أو 7 حيث تم تعطيل ما بين 3 إلى 4 دورات في مدة قدرها 24 ساعة مع استعمال تركيز 200 جزء من المليون. يمكننا أن نستنتج من هذه التجربة إن الزيوت المستخدمة هي زيوت فواكه تحتوي على بعض المركبات الأساسية المسؤولة عن النشاط ضد البكتيريا. الفاعلية المضادة للبكتيريا، اشريشيا كولي ستا فيلو ككيس أو غي يس. الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية،

SOMMAIRE

I. Introduction	01
II. Etude bibliographique	
II.1. Les huiles essentielles	04
I.1.1. Bref historique	04
I.1.2 Définition.....	04
I.1.3. Extraction des huiles essentielles	05
I.1.3.2.Hydrodistillation	05
I.1.3.3. Extraction par solvants organique	06
I.1.3.4.Extraction assistée par micro-onde	06
I.1.3.5.Autres techniques.....	07
I.2.1.1. Les flavonoïdes	07
I.1.4.2. Les polyphénols	07
I.1.4.3. Classification	08
I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles	08
I.1.5.1. terpénoïdes	08
I.1.5.2. Les mono terpènes	08
I.1.5.3. Sesquiterpènes	09
I.1.5.4. Les composés aromatiques	09
I.1.6. Domaines d'application des huiles essentielles.....	09
I.1.7. Mécanismes d'action des huiles essentielles	10
I.1.8. Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles	12
II.1. 1.Généralité sur <i>le Citrus limon</i>	14
II. 1.2 .Classification botanique	14
II.1.3. Généralités sur l'huile essentielle	14
II.2.1. Généralité sur l'abricot	15
II.2.2.Classification botanique.....	15
II.2.3. Généralités sur l'huile essentielle	16
III.1.L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	18
III.2.L'espèce de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
VI. Les procédés de traitement des aliments.....	21
VI.1. Traitement thermique	21
VI.1.1.Pasteurisation.....	21

VI.1.2. Stérilisation	21
VI.2. Techniques non thermiques alternatives	21
VI.2.1. Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC).....	21
VI.2.2. Champs électriques pulsés (CEP).....	22
VI.2.3. Irradiation	22
VI.2.4. UV continu.....	22
VI.2.5. Lumière. pulsée.....	23
VI.3. Evènement d'intoxication alimentaire par <i>Escherichia coli</i> O157:H7	23
VI.3.1. Etats-Unis	23
VI.3.2. Japon.....	23
VI.3.3. En Algérie.....	23
III. ETUDE EXPERIMENTALE	
I. Matériel et Méthodes	26
I.1. Présentation de lieu de stage	26
I.2. L'objectif de l'étude	26
I.3.2. Matériel non biologique	27.
I.4. Méthodes	27
I.4.1. Préparation tampon de McIlvaine	27
I.4.1.1. Définition	27
I.4.2. Préparation des suspensions bactériennes	28
I.4.2.1. Repiquage	28
I.4.2.2. Addition des huiles fruités	28
I.4.2.3.. Addition des suspensions bactériennes.....	29
I.4.2.4. Ensemencement	29
I.4.2.5. Incubation	29
I.4.2.6. Lecture	30
I.4.2.7. Dénombrement	30
IV .Résultat et discussion.....	32
II.1. Résultats	32
II.2. Discussion.....	39
II.2.1. Influence des huiles sur des bactéries à Gram- positif et Gram-négatif.....	39
II.2.2. Influence de pH	40

V. Conclusion.....43

VI. Références Bibliographiques

VII. Annexes

Liste des figures

Figure 01: Montage d'hydro distillation	06
Figure 02: Montage d'extraction assistée par micro-onde	07
Figure 03: Exemples de quelques mono terpènes	08
Figure 04: Exemples de quelques sesquiterpènes	09
Figure 05: Lieux et mécanismes d'action des composants des H. Es sur la cellule bactérienne.....	10
Figure 06: Effets antibactériens des huiles fruités, de <i>citrus limon</i> et l'abricot sur la croissance de <i>E. coli</i> dans pH4 à (4°C).....	32
Figure 07: Effets des huiles fruitées dans pH7 à (4°C) sur <i>E. coli</i>	33
Figure 08: L'activité antibactériennes des huiles fruités de <i>Citrus limon</i> et l'abricot sur <i>S. aureus</i> dans pH4 à 4°C.....	34
Figure 09: Effets des huiles fruités dans pH7 à 4°C sur <i>S. aureus</i>	35
Figure 10: Effets antibactériens des huiles fruités, de <i>Citrus limon</i> et l'abricot sur la croissance de <i>E. coli</i> dans pH4 à 22°C.....	36
Figure 11: Effets des huiles fruitées dans pH7 à (22°C) sur <i>E. coli</i>	37
Figure 12: Effet de l'huile fruitée sur <i>S. aureus</i> dans pH4 à 22°C	38
Figure 13: Résultats des différents effets des huiles fruités à pH7 (22°C) sur <i>S. aureus</i>	38

Liste des tableaux

Tableau n °1: Caractères distinctifs de <i>S. aureus</i>	18
Tableau n ° 2: Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	19
Tableau n °3: Composition de tampon de McIlvaine	27

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ADP: Adénosine Di Phosphate

ATP: Adénosine Tri Phosphate

AGMI: Acide Gras Mono Insaturés

AGPI: Acide Gras Poly Insaturés

C: Degré Celsius

CEP: Champs Electrique Pulsés

E. coli: *Escherichia coli*

G-: Gram-négatif

G+: Gram-positif

h : heure

HE: Huile Essentielle

HPH: Haute Pression Hydrostatique

LPS: Lipo Poly Saccharide

ml: millilitre

PPM: Partie Par Million

pH: Potentiel des ions H^+

K+: Ion potassium

TIA: Toxi-infections Alimentaire

TSA: Trypticase Soy Agar

TSB: Trypticase Soy Broth

UFC: Unité Formant Colonie

UHT: Ultra Haute Température

UV: Ultra Viole

Liste des normes :

AFNOR: Association Française de Normalisation

ISO: International Organization for Standardization

Étude bibliographique

Introduction

Introduction

Pendant de nombreuses années, une variété des composés chimiques différente a été utilisée comme un agent antimicrobien dans les aliments pour inhiber les micro-organismes pathogènes.

Cependant, la généralisation d'utilisation des conservateurs chimiques a conduit à un certain nombre des problèmes écologiques et médicaux, font qu'il est nécessaire d'adopter des stratégies qui sont accessible, simple dans son application, et non toxique pour les humains et les plantes (**Shukla et al . ,2008**).

Herbes ont été utilisées depuis l'antiquité pour leurs propriétés parfumée, saveur, et un conservateur dans une variété de produits et applications à usages médicaux et cosmétiques (**Bakkali et al . , 2008**).

Cependant, de nos jours il ya un renouvellement d'intérêt scientifique de 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 qui possèdent encore une longue durée de vie. Par ailleurs, il ya de nouvelles études concernant la présence croissante de la nouvelle éclosion de maladies d'origine alimentaire causées par des microorganismes pathogènes (**Tajkarimi et al . , 2010**).

Parmi antimicrobiens naturels sont les huiles essentielles (HE) extraits de nombreuses plantes et de fruits, qui ont été signalés à posséder une large spectre d'activité antibactérienne (**Derwich et al .,2010a; Gulluce et al., 2007; Rota et al .,2004**) ainsi que antifongique (**Gulluce et al, 2007;.. Dambolena et al;2010**) antiparasitaire (**Bakkali et al; 2008;. Burt, 2004**) et insecticide (**Batish et al ., 2008; Burt, 2004;.Kordali et al;2008**) ainsi que d'autres activités biologiques (**Viuda-Martos . ,2011**).

Ainsi, leur utilisation semble être particulièrement importante pour la santé publique dans le développement des pays. H.Es sont des mélanges de composés organiques volatils habituellement obtenus à partir de pièces non ligneuses de la plante grâce à la vapeur ou hydro-distillation (**Batish et al;2008; Burt, 2004**).

À l'heure actuelle, environ 3000 HE sont connus, dont 300 sont commercialement importantes, notamment pour l'industrie pharmaceutique, agronomique, alimentaire,

sanitaire, cosmétique et industries de la parfumerie (**Bakkali et al;2008**). L'activité antimicrobienne des HE dépend de leur composition chimique. Ils sont généralement caractérisés par deux ou trois grands composants à des concentrations très élevées (jusqu'à 80%) par rapport à l'autre composants présentent seulement en quantités infimes (**Bakkali et al; 2008;Burt, 2004**).

Cependant, les H Es sont plus fortement antimicrobien par l'effet additif de leurs principaux composants antimicrobiens (**Lattaoui ., 2012**).

Cette étude porte sur :

- Contribuer à la connaissance de deux huiles fruitées (*Citrus limon*, *prunus armeniaca*) des plantes aromatique et médicinales
 - Le développement de processus de conservation des aliments par l'action des huiles fruités et pH de milieu de traitement

Ce présent travail consiste à faire des tests de sensibilité pour évaluer «*in vitro*» l'activité antibactériennes des huiles fruités de *Citrus limon* et *prunus armeniaca* sur des bactéries pathogène qui sont à l'origine d'intoxication alimentaire (*S. aureus*; *E. coli*).

Chapitre I

I.1.Les huiles essentielles

I.1.1.Bref historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (**Baser et al ., 2010**). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines: parfumerie, médecine, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de Commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique Persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (**Besombes, 2008**).

I.1.2 Définition

La définition selon AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. l'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**ISO, 1997; AFNOR, 2000**).

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (**Bruneton b, 1999; Degryse et al; 2008**).

I.1.3. Extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins, etc.) (Hellal, 2011).

I.1.3.1. Pression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (Lesley, 1996; Roux, 2008; Ferhat et al; 2010; Fillâtre, 2011). Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (Basil et al; 1998; Roux, 2008; Ferhat et al; 2010). diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées (Ferhat et al; 2010). Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

I.1.3.2. Hydro- distillation

L'hydro-distillation la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et aussi de fournir de meilleurs rendements (Bruneton, 1993 ; Ferhat et al; 2010). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs se condensent sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993 ; Lucchesi, 2005 ; Baser et al .,2010 ; Ferhat et al; 2010). Cependant, l'hydro distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005 ; Ferhat et al; 2010).

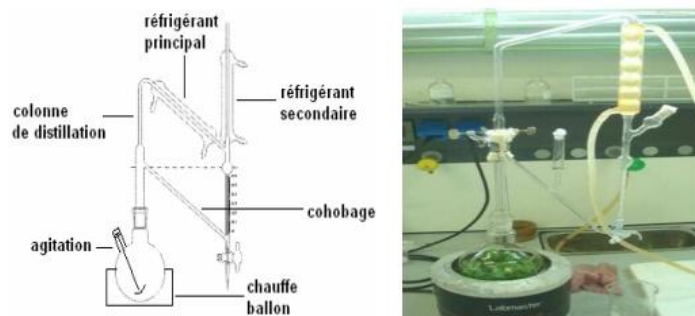


Figure 1 : Montage d'hydro distillation

I.1.3.3. Extraction par solvants organique

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un Solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (**Lucchesi, 2005**).

Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation. (**Lucchesi, 2005**) Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une forte solubilité de l'huile (**Jonhson, 1983**).

Certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de Préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec L'extrait (**Bottin; 2006**) Permis les solvants les plus utilisés sont des carbures aliphatiques (pentane, hexane (**Kartika; 2005; Véronique 2005**) ou des carbures aromatiques (benzène). On opère le plus souvent à la température ordinaire (**Paris; Hurabille; 1981**).

I.1.3.4.Extraction assistée par micro-onde

Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement (**Figure 2**).

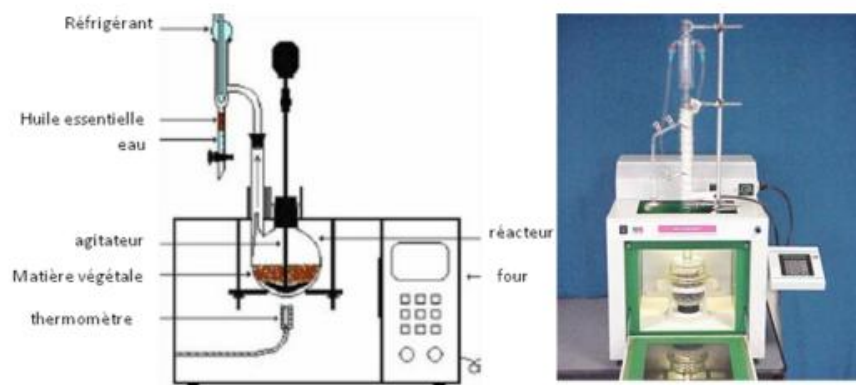


Figure 2 : Montage d'extraction assistée par micro-onde.

I.1.3.5.Autres techniques

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de Recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles Essentielles qui sont beaucoup plus écologiques (**Ferhat et al; 2010**). Parmi ces techniques, figurent, l'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état subcritique (**Kaufmann et Christen, 2002; Piochon, 2008; Ferhat et al; 2010; Dupuy, 2010**), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par le flash détente (**Ferhat et al; 2010**).

I.1.4.Principaux constituant des extraits bruts de plante

I.1.4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (**Rice-evans et packer, 1998**).

Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés une unité de trois carbones (**Walsh, 2003**).

I.1.4.1 .1 *Les poly phénols*

Les composés phénoliques ou les poly-phénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font Partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

I.1.4.1.2 *Classification*

Les poly-phénols sont réparti en plusieurs classes :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les stilbènes
- Les lignanes et les coumestanes

- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols

I.1.5. Composition chimique des huiles essentielles

I.1.5.1. terpénoïdes :

Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les Plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Les Constituants des huiles essentielles sont très variés .on y trouve en plus de terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres (Seenivasan, 2006).

I.1.5.2. Les mono terpènes:

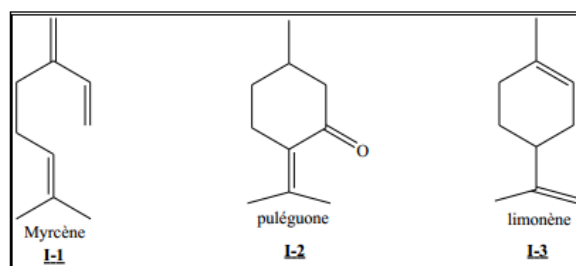


Figure 3:Exemples de quelques mono terpènes

Les mono terpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est Rencontrée dans les huiles essentielles (90%).Ils peuvent être acycliques (Terpinene, cymène) ou bi cycliques pinène camphène, sabinene).Ils constituent Parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (citrus, térébenthines) (Brutonne, 2008).

I.1.5.3. Sesquiterpènes:

Les Sesquiterpènes sont de structures très diverses (C_{15}) : les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (Bruneton ,2008).

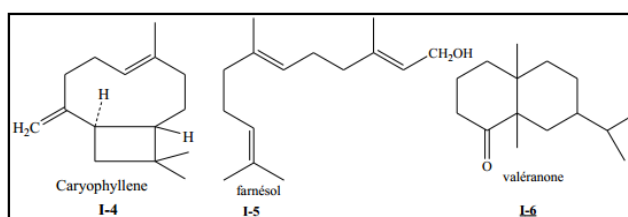


Figure 4:Exemples de quelques sesquiterpènes

I.1.5.4. Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de Propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car Ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des H.E. (**Kunle et Okogum, 2003**).

I.1.6. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs Industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**Grysole, 2005**). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Pingot, 1998; Bruneton a, 1999 ; Grysole, 2005; Aprotosoie et al; 2010**). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (**Grysole, 2005**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. à cause de la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants (**Conner, 1993; Hammeret al; 1999**).

I.1.7. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés (**Hammer et al;1999; Dorman et al;2000; Bagamboula et al;2004**). Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram-

Les travaux de **Burt (2004)**, ont montré qu'une H.E. active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram- (**Mahmoud et al; 2004**).

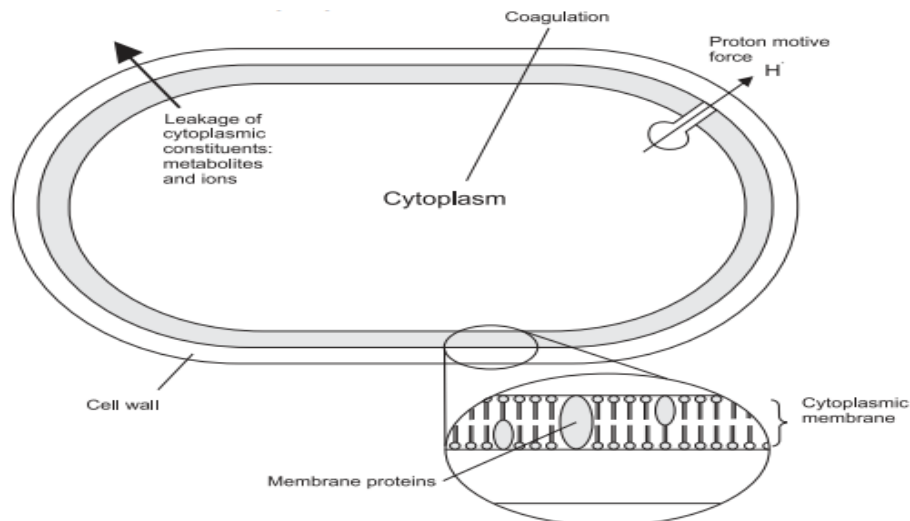


Figure 5: Lieux et mécanismes d'action des H. Es sur la cellule bactérienne.

La dégradation de la paroi cellulaire (**Helander et al;1998.; Thoroski et al;1989**); dommages à la membrane cytoplasmique (**Knobloch et al; 1989.;Oosterhaven et al;1995.;Sikkema et al;1994.; Ultee et al;2002.;Ultee et al;2000**)dommages aux protéines de la membrane (**Juven et al;1994.; Ultee et al;1999**);les fuites du contenu des cellules (**Cox et al;2000.; Gustafson et al;1998.; Helander et al; 1998.;Lambert et al;2001.;Ultee et al;2001**);coagulation du cytoplasme (**Gustafson et al;1998**).

En outre, **Dabbah** et ses collaborateurs (1970) ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram+ par rapport aux Gram- et aux champignons. Dans la même démarche d'étude, **Gordon et ses collaborateurs (1973)** et **Mahmoud et ses collaborateurs (2004)** ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les H.E. pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. **Mahmoud et ses Collaborateurs (2004)**, **G et Boudabous (2006)** quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique et, enfin **Caillet et ses collaborateurs (2007)** ont signalé que les H.E. empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Dans une autre étude qui a été réalisée par **Freeman et Carel (2006)**, l'H.E. d'arbre à thé (*Leptospermumcitratum*) a provoqué des fuites d'ions potassium (K^+) au niveau des membranes cellulaires d'*E. coli* et *S. aureus*. Cette fuite de K^+ est la toute

première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'H.E., rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les H.E. ont donc bien des propriétés bactéricides.

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

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

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative 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 (**Souza et al;2006b; Bajpai& Kang, 2010**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne.

Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémoosmotique et une fuite d'ions (K^+) (**Cox et al; 2000; Souza et al; 2006**).

Des conclusions similaires sont obtenues par d'autres auteurs (**Rhayour, 2002; Chami, 2005**). Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Pavel et al;2009**).

Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, de RNA, des protéines et des polysaccharides (**Malecky, 2007**).

I.1.8. Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures poly osidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace péri plasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace péri plasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...); (**Berche, 2003**).

La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (**Berche, 2003**).

Chapitre II

II.1. 1.Généralité sur le *Citrus limon*

Le citronnier est un petit arbre épineux à feuilles persistantes, atteignant 3 à 6 m de hauteur, à cime étalée et peu dense, au feuillage vert claire. Le fruit est de forme ovale, la peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit ; La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (**Blancke, 2001**).

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (naringosides et hespéridosides) (**Valnet, 2001**).

II. 1.2 .Classification botanique

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification de Citron est la suivante:



- **Règne :** *Plantae*
- **Embranchement :** *Spermaphytes*
- **Classe :** *Eudicotylédones*
- **Ordre :** *Sapindales*
- **Famille :** *Rutaceae*
- **Genre :** *Citrus*
- **Espèce :** *Citrus limon*

II.1.3. Généralités sur l'huile essentielle

Les HE sont des mélanges de divers produits d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. cette définition peut être étendue aux HE obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères (**Bousbia, 2004**).

L'huile essentielle peut contenir: les terpènes, les alcools, les cétones, les Aldéhydes, les esters et les éthers. ces molécules peuvent agir en synergie, ce explique à la fois leur efficacité, (**Girard, 2010**).

D'après **Mondello et al;(2005)**, les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatil (1-15%) et volatile (85-99 %).

L'essence de *Citrus limon* est composée de 92% à 93% de terpènes dont le *d*-limonène est le plus abondant (**Iserinet al;2001.; Ferhat et al;2010**), de sesquiterpènes, d'aldéhydes (dont le citral est le plus dominant) et d'esters (**Iserinet al; 2001**).

II.2.1. Généralité sur l'abricot

L'abricot est le fruit d'un arbre classé dans la famille des rosacées. Facile à cultiver, cet arbre fruitier est de petite taille, d'une hauteur allant de 5 à 6 mètres. à écorce rougeâtre, il s'agit d'un sous-genre des prunus, et son nom scientifique est le *prunus armeniaca*. Ce nom «*armeniaca*» remonte à son origine géographique. Surnommée «prunier d'Arménie»,

L'abricot, légèrement acide de couleur jaune orangé. Riche en provitamine A, l'abricot couvre presque la moitié des besoins journaliers en carotène ; ce précieux antioxydant contribue à un effet protecteur contre le cancer et certaines maladies chroniques.

II.2.2. Classification botanique

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Sous-classe : *Rosidae*
- Ordre : *Rosales*
- Famille : *Rosaceae*
- Sous-famille : *Amygdaloideae*
- Genre : *Prunus*
- Nom binomial : *Prunus armeniaca*
- Nom commun : *Abricotier*



II.2.3. Généralités sur l'huile essentielle

L'abricot renferme également une huile essentielle contenue dans son noyau. De couleur jaune, cette essence est connue pour constituer un véritable cocktail d'acides gras essentiels. d'ailleurs, sa teneur en vitamines A et E lui attribue de réels bienfaits hydratant, nourrissant et régénérant.

Composition chimique d'huile d'abricot

Acides gras essentiels polyinsaturés (AGPI) ou vitamine F : acide linoléique (oméga 6) (22.00%).

Acides gras mono-insaturés (AGMI) : acide oléique (71.00%)

Acides gras saturés (AGS) : acide palmitique (5.2%).

Chapitre III

III.1. L'espèce *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 μ de diamètre (Couture, 1990; Fasquelle, 1974. Gram, 1884).

Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches (Minor et Veron, 1990).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Fasquelle, 1974. Fauchere and Avril, 2002; Ferron, 1984). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (Minor et Veron, 1990).

Les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO₂ pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées (Couture, 1990; Fasquelle, 1974; Minor et Veron, 1990).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Minor et Veron, 1990).

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de Na Cl jusqu'à 7,5%.

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase + (Fasquelle, 1974; Minor et Veron, 1990).

Tableau1:Caractères distinctifs de *S. aureus*

	Espèce <i>S. aureus</i>	Autres espèces de staphylocoques
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches
Milieu de Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf <i>S. epidermidis</i>
Staphylo-coagulase	Positive	Négative

III.2.L'espèce de *Escherichia coli* O157:H7

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli* (Grimont, 1987 et Pohl, 1993); son nom actuel lui est donné en 1919 par (Castellani et Chalmers; Grimont, 1987).

L'Escherichia coli appartient à la famille des *enterobacteriaceae*, il s'agit de bâtonnets à Gram négatif, mobile, aérobie (Fosse et Magras, 2004). *L'Escherichia coli* O157:H7 présente les caractères figurant dans le **tableau n° 2**

Tableau n° 2: principaux caractères d'*E.coli*O157:H7 (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

Indole	+
Pigment jaune	-
Lysine décarboxylase	+
β-xylosidase	-
β-glucuronidase	-
Sorbitol	-
Malonate	-
Adonitole	-

Escherichia coli O157:H7 est le chef de file des *Escherichia coli* entéro-hémorragiques.

Il est responsable typiquement chez l'homme de colite hémorragique avec des lésions caractéristiques pouvant se compliquer de syndrome hémolytique urémique. IL est une cause de plus en plus fréquente d'intoxication alimentaire (Vernozy-Rozand et Montet, 2001).

chapitre IV

Les procédés de traitement des aliments

V.1. Traitement thermique

Le traitement thermique est aujourd'hui la technique de décontamination la plus communément utilisée en industrie agroalimentaire (**Farkas, 2007**). En termes de sécurité alimentaire, il a pour objectif de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes, et d'autre part les microorganismes et leurs toxines.

V.1.1.Pasteurisation

Est un traitement thermique modéré permettant la destruction des microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. La température du traitement est généralement inférieure à 100°C et la durée, de quelques secondes à quelques minutes. Ce traitement thermique doit être suivi d'un brusque refroidissement afin de ralentir le développement des germes encore présents.

V.1.2.Stérilisation

Est un traitement thermique qui a pour finalité de détruire toute forme microbienne vivante. Le traitement à ultra haute température (UHT) consiste à chauffer le produit à une température, entre 135°C et 150°C, pendant de 1 à 5 secondes. Le produit stérilisé est ensuite refroidi puis conditionné aseptiquement. Ce procédé est utilisé par exemple pour la stérilisation des produits liquides (lait, jus de fruits...) ou de consistance plus épaisse (desserts lactés, crèmes, jus de tomate, soupes...).

V.2. Techniques non thermiques alternatives

V.2.1.Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) et Hautes Pressions à Dioxyde de Carbone (HPDC)

Le procédé des hautes pressions consiste à soumettre un produit alimentaire liquide ou solide, avec ou sans emballage, à des pressions comprises entre 100 et 800 MPa (**Devlieghere et al; 2004**), à température ambiante ou inférieure à 50°C. La durée de traitement est généralement comprise entre 5 et 30 min. Contrairement aux traitements utilisant la température, la pression est transmise instantanément et uniformément à travers le produit, indépendamment de sa taille, forme et composition. La pression étant la même dans toutes les directions Cela permet de conserver la forme d'origine du produit (**Goodridge et al;2006**).

V.2.2.Champs électriques pulsés (CEP)

Un générateur de haute tension est utilisé pour charger des condensateurs (**Gongora-Nieto *et al*; 2002**) ou une ligne de transmission (**Kolbet *et al*; 2006**). Un switch haute tension permet de décharger rapidement l'énergie stockée. Le signal ainsi généré a une forme carrée avec des fronts de montée de l'ordre de la nanoseconde, une durée de quelques dizaines de nanosecondes et une amplitude de plusieurs kilovolts. L'aliment est placé entre deux électrodes. La distance entre électrodes vaut quelques centaines de micromètres ce qui permet de générer des champs de plusieurs dizaines de kV/cm. L'intensité du champ électrique appliqué est généralement comprise entre 2 et 87 kV/cm, mais les taux d'inactivation efficaces sont généralement obtenus avec des champs d'intensité comprise entre 20 et 50 kV/cm (**Heinz *et al*; 2001**). Les temps de traitement sont généralement exprimés en micro ou millisecondes.

V.2.3.Irradiations

La décontamination par irradiation fait référence à trois types de phénomènes physiques: le rayonnement gamma, le rayonnement X et les faisceaux d'électron. Le rayonnement γ correspond à l'émission spontanée de photons par le noyau d'un isotope radioactif. Sa longueur d'onde est en général inférieure à 10 pm. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques émises par les couches électroniques profondes des atomes. Leur longueur d'onde est entre 0.011 et 10 nm. Les rayons X durs et gamma sont très pénétrants donc il est possible de traiter des produits ayant un volume important. Les temps d'exposition sont de l'ordre de l'heure (**Satin, 2002**).

V.2.4.UV continu

Le traitement UV continu est une méthode athermique, non chimique et considérée comme non ionisante (**Keklik *et al*; 2009**). L'émission UV est produite dans une lampe à vapeur de mercure. La lampe se compose d'une enceinte en quartz dans laquelle réside un mélange d'argon et de mercure. Deux types de lampes sont différenciés selon la pression dans l'enceinte. La pression est inférieure à 10 Torr pour les lampes dites basse pression et elle est supérieure à 100 Torr pour les lampes dites moyenne pression.

V.2.5. Lumière pulsée:

La lumière pulsée se définit par flashes de lumière produits par une lampe à arc au xénon. Le spectre d'émission de la lampe couvre le domaine en longueurs d'ondes s'étendant entre 200 et 1300nm .La durée des flashes varie entre la microseconde et la milliseconde. L'énergie nécessaire à l'allumage de l'arc est accumulée dans un condensateur puis déchargée dans la lampe.

V.3.Evènement d'intoxication alimentaire par *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli O157:H7 Comme toute la famille des *Escherichia coli*, elle vit naturellement dans les intestins des animaux, notamment chez les bovins. Elle est donc inoffensive pour l'animal, mais elle devient très dangereuse si elle entre en contact direct avec la viande que nous consommons.

V.3.1.Etats-Unis

Chaque année, 20.000 personnes tombent gravement malades en raison de l'*E.coli*O157:H7, et les experts estiment que l'agent infectieux tue environ 500 personnes par années.

V.3.2.Japon

Au Japon aussi, cette bactérie a tué. Depuis fin 96, 10 personnes sont mortes, surtout des enfants et des personnes âgées. Une trentaine d'autres sont dans un état critique. C'est le poisson qui a principalement été incriminé. Il a vraisemblablement été contaminé lors de son conditionnement par contact avec de la viande ou d'autres aliments.

Enfin, il faut savoir que cette bactérie est terriblement résistante. Les produits acides et les produits de conservation ne lui font rien. Le gel non plus, elle survit à des températures très basses quasi éternellement, et dès qu'elle est à température ambiante, elle prolifère joyeusement.

V.3.3.En Algérie

Au cours du premier semestre 2007, 1400 fermetures des établissements alimentaires pour non-respect des conditions d'hygiène sur des produits alimentaires et

mettant en danger la santé des consommateurs ont été enregistrées (Ministère du Commerce: Alger). L'Algérie enregistre des cas d'intoxications alimentaires de plus en plus fréquents et coûteux. Près de 6000 cas ont été enregistrés par exemple en 2008 à l'échelle nationale et le risque est plus que jamais présent avec l'arrivée de la saison estivale. Il est utile de signaler que près de 40% des cas d'intoxication sont dus à l'ingestion de viandes et dérivés impropres à la consommation. Cette pathologie s'est développée à grands pas en raison de la prolifération de la restauration collective, de la libre circulation des denrées alimentaires et aussi du développement de l'industrie agroalimentaire celle-ci s'est aggravée à cause de l'absence et du non-suivi d'impératifs d'hygiène, rupture de la chaîne de froid et de sécurité alimentaire.

Etude expérimentale

I. Matériels et Méthodes

I.1. Présentation de lieu de stage

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie d'université de khemis Miliana durant la période allant du 10 février au 18 mars 2015.

I.2 L'objectif de l'étude

Cette étude porte sur :

- Contribuer à la connaissance de deux huiles fruitées (*Citrus limon*, abricot) des plantes aromatique et médicinales
- Le développement de processus de conservation des aliments par l'action des huiles fruitées et pH de milieu de traitement.

I.3 Matériels

- Souches bactériennes

Deux souches bactériennes ont été utilisées dans notre travail.

Bactérie Gram-positif (G+): *S. aureus* (25922) et bactérie Gram-négatif (G-): *E. coli*(25923)

Deux(2) de ces souches bactériennes ont été isolées cliniquement à laboratoire d'analyses Dr zibouche de wilaya de Ain defla.

Les souches qui ont été reçues dans des tubes à gélose nutritif inclinée, conservés à une température de réfrigération (4°C).

- Critères de sélection des souches

Le choix des souches est basé sur plusieurs paramètres:

- les souches sont d'origine hospitalière, responsables de toxi-infection alimentaires (TIA) (*S. aureus*, *E. coli*);
- pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires

I.3.2 Matériel non biologique

Il s'agit des milieux de culture (TSA ;TSB) et des appareillages qui sont communs à n'importe quel laboratoire de microbiologie.

Les huiles sont achetées d'herboriste au khemis Miliana dans des flacons et conservées à des températures de réfrigération (4°C).

A l'abri de la lumière et de l'oxygène au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de khemis Miliana.

I.4.Méthodes

I.4.1Préparation tampon de McIlvain

I.4.1.1.Définition

Tampon de McIlvaine est une solution dont la composition est telle que son pH varie peu ,soit par addition de petites quantités d'acide ou de base, soit par dilution.

Tampon de McIlvaine que compose:

- _ di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4).
- _ Acide citrique monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).

➤ Pour préparation d'un 1ml de McIlvaine:

Tableau n 3:Composition de tampon McIlvaine

pH	0.2M Na_2HPO_4	0.1M acide citrique
pH=4	38.55 ml	61.45 ml
pH=7	82.35 ml	17.65 ml

I.4.2 Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester (*Escherichia coli*; *Staphylocoques aureus*) sontensemencées dans des Tubes inclinées contenant le Géllose nutritif et incubées pendant 24 heures.

À partir d'une culture de 24 heures ; et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identique sont prélevées et miser dans 5ml de TSB (pré-cultures), pré-cultures bactériennes bien homogénéisés et incubé à 37°C pendant 24 heures.

I.4.2.1. Repiquage

-Après 24 heures on observe un trouble dans le tube de TSB; donc il y a une croissance bactérienne.

-Prendre 100µl de TSB de pré-culture est repiqué dans un flacon de 50ml, puis faire l'agitation à l'aide d'un vortex, incubé à 37°C pendant 24 heures.

I.4.2.2 Addition des huiles fruitées

-Après 24 heures on observe un trouble dans les flacons des TSB, faire l'agitation des flacons qui contenant les suspensions bactériennes (*E. coli*; *S. aureus*).

-Prélever 1ml de chaque flacon et verser dans des eppendorfs, centrifugés à 3000 tours pendant 5 minutes à 4°C.

-éliminer les surnageant à l'aide d'une micropipette (la charge bactériennes correspondant 10^9 UFC /ml).

-Ajouter 1 ml de tampon de McIlvaine de PH4 et l'autre de pH7 (la charge bactérienne correspondant 10^7 UFC/ml).

-Faire l'agitation à l'aide d'un vortex.

-Prendre deux séries des tubes à essai, chaque tube qui contenant 5ml de tampon de McIlvaine de pH4 et l'autre de pH7.

-Ajouter l'huile de *Citrus limon* a concentration de (200ppm) pour les 1^{ere} séries des tubes et l'huile de l'abricot pour la 2 eme série des tubes avec mêmes concentration d'huile (200ppm).

-Faire l'agitation à l'aide d'un vortex.

I.4.2.3. Addition des suspensions bactériennes

-prendre les deux séries des tubes à essai de 5ml de tampon de McIlvaine de (pH4; pH7) qui additionné les huile essentielle de *Citrus limon*, et autres séries l'huile fruités de l'abricot à concentration de (200ppm).

-pour chaque série ajoute 50µL de suspensions bactériennes de *S .aureus*.

- faire l'agitation à l'aide d'un vortex.

-laisser repose (10min; 24 heures) dans une température ambiante (22°C). et l'autre à (4C°)

-après (10min; 24 heures) introduire aseptiquement dans les eppendorfs 900µL de l'eau de peptone et 100µL de suspension (*E. coli*, *S .aureus*), puis homogénéisé à l'aide d'un vortex; cette suspension constitue alors la première dilution qui correspond donc à la dilution 10^{-1} ou 1\10.

-introduire ensuite aseptiquement a l'aide d'une micropipette 100µL de la première dilution dans un eppendorf stérile contenant 900µL de l'eau de peptone: cette dilution sera alors 10^{-2} . Ainsi de suite jusqu' à l'obtention de la dilution 10^{-3} ou 1/1000.

I.4.2.4. Ensemencement

-a partir de la 3^{eme}, 1^{ere} dilution transférer 100µL dans un boite de Petre vide stérile préparée a cet usage.

-compléter ensuite avec environ 20 ml de Gélose TSA fondu puis refroidie à $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

-faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme de «8» pour permettre à suspension bactérienne de se mélanger à la gélose, et laisser solidifier.

I.4.2.5. Incubation

Après solidification de Gélose; incuber les boites couvercle en bas à 37°C pendant 24 heures.

I.4.2.6. Lecture

-Les colonies des *E. coli* se présentent sous forme arrondie de couleur blanc châtre.

-les colonies des *S .aureus* se présentent sous forme rondes, bombées de couleur blanche.

I.4.2.7. Dénombrement

Compter toutes les colonies ayant poussées sur les boites en tenant compte des facteurs de dilution, de plus:

- ne dénombré que les boites contenant entre 15 et 300colonies;
- multiplier toujours le nombre trouvé par l'inverse de sa dilution;
- les résultats s'expriment en nombre de (*E. coli*; *S .aureus*) UFC /ml.

Chapitre :

Resultats et Discussion

II .Résultats et discussion

II.1.Résultats.

Inactivation bactérienne de *E. coli* O157:H7 et *S. aureus* par utilisation des huiles fruités (*citrus limon*; l’abricot).

L'action de 200ppm de chaque Huile sur la survie de *E. coli* O157:H7 et *S. aureus* a été testée à pH7 et un pH4, pour 10 min et 24h à température ambiante 22°C, et température de réfrigération 4°C.

Le graphe inclus également l'inactivation de deux micro-organismes par l’action des huiles de *citrus limon* et l’abricot comme le montre dans les graphes ci-dessous :

Température 4°C:

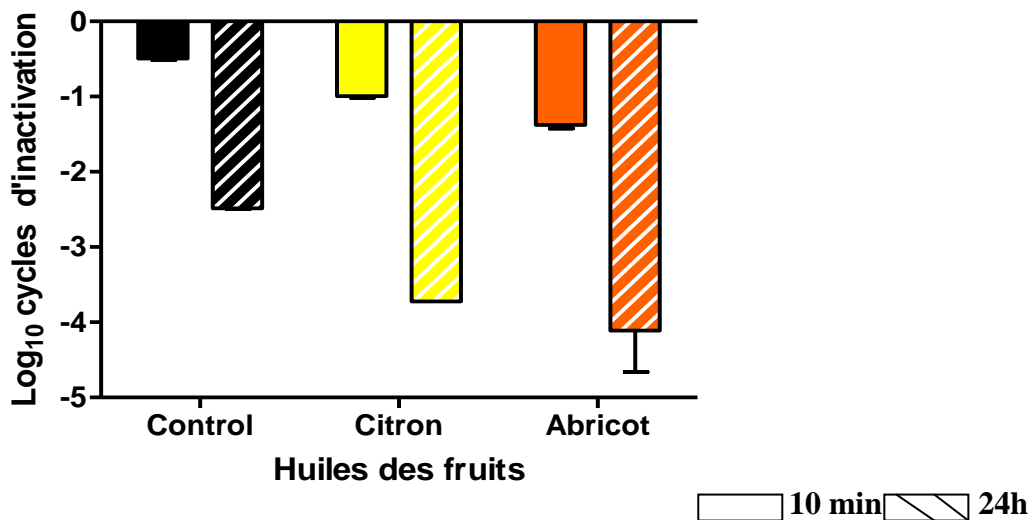


Figure 6: Effets antibactériens des huiles fruités, de *citrus limon* et l’abricot sur la croissance de *E. coli* dans pH4 à (4°C).

Le graphe illustré par la **figure (6)** montre l'effet antibactérien des huiles fruités, de *citrus limon* et l’abricot sur la croissance de *E. coli* dans pH4 à (4°C).

_A travers ce graphe, on remarque que les deux huiles fruité exercent une activité antibactériennes «*in vitro*» à pH4 et à (4°C) comparativement avec le control.

_ Cette activité est non significative durant les première 10min, mais qui augmente au fur à mesure qu’on avance dans le temps 24h.

_ Il ya une diminution remarquable de la croissance bactériennes, atteignant d'inactivation 1cycles logarithmique au bout de 10min pour huile de citron et 1.3 cycle logarithmique pour H. d'abricot et 3.4cycle logarithmique au bout 24h pour huile de citron et 4 cycle logarithmique pour huile d'abricot.

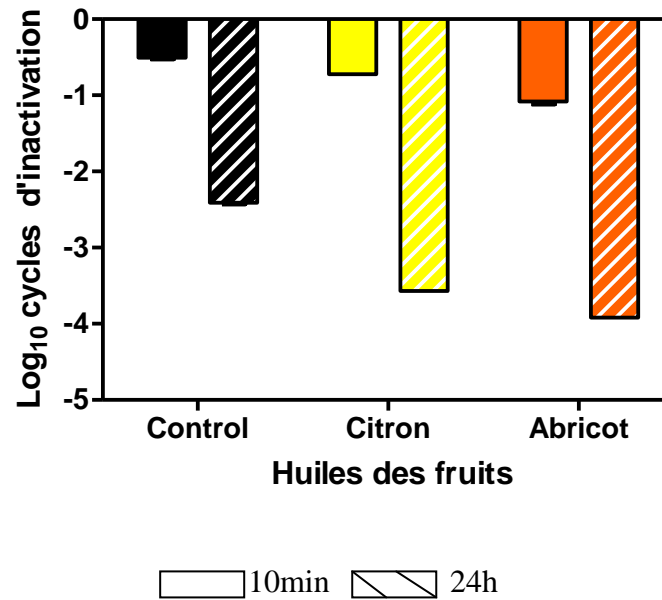


Figure7:effets des huiles fruitées dans pH7 à (4°C) sur *E. coli*.

Le **graphe (7)** montre les résultats des différents effets des huiles fruitées dans pH7 à (4°C) sur *E. coli*.

On remarque que les deux huiles testé présentent une activité antibactérienne «*in vitro*» sur *E. coli* dans pH7 à (4°C), comparativement avec le contrôle.

Il est à noter que cette activité est non significatif durant 10 min, mais qui augmente au fur à mesure qu'on avance dans le temps 24H.

Ilya une réduction considérable de la croissance bactérienne, atteignant d'inactivation 1 cycle logarithmique au bout de 10min pour le huile de citron et 1.1 cycle logarithmique pour huile d'abricot et 3.3 cycles logarithmique au bout de 24H pour huile de citron et 3.4 pour huile d'abricot.

- Il est à noter que l'efficacité d'huile fruitée est proportionnelle avec le temps.
- les différences observées ne sont pas significativement suffisantes soit à pH4 au à pH7.

➤ Nos résultats ont révélé que les deux huiles étudiées, possèdent le même pouvoir d'inactivations bactériennes.

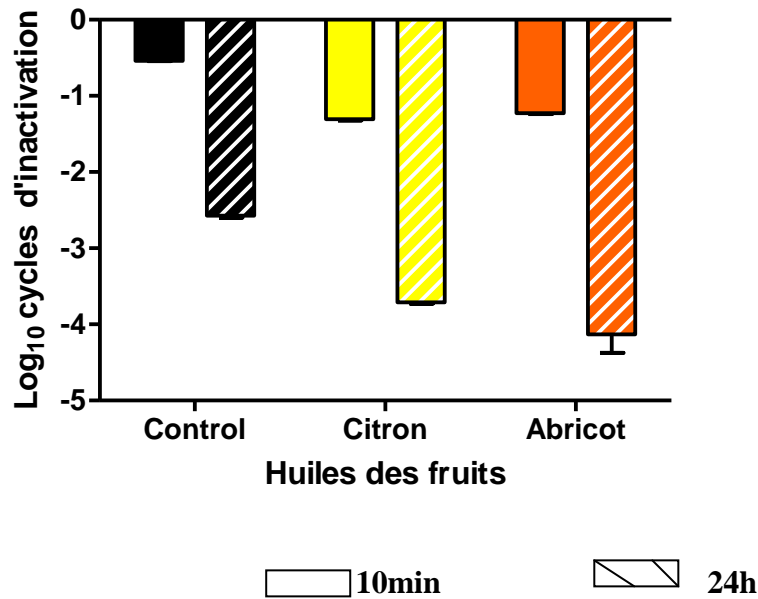


Figure 8: l'activité antibactériennes des huiles fruités de *Citrus limon* et l'abricot sur *S. aureus* dans pH4 à 4°C.

_ La **figure (8)** montre l'activité antibactériennes des huiles fruités de *Citrus limon* et l'abricot sur *S. aureus* dans pH4 à 4°C.

_ huile de *Citrus limon* et l'abricot montrent une activité antibactérienne relativement moyenne, comparativement avec le contrôle.

_ *S. aureus* présente une sensibilité vis -à-vis à les deux huile testé, inactive 1.5 cycles logarithmique durant 10min pour les deux huiles et 3.9 cycles logarithmique pour le *Citrus limon* et 4.1 pour l'abricot durant 24h.

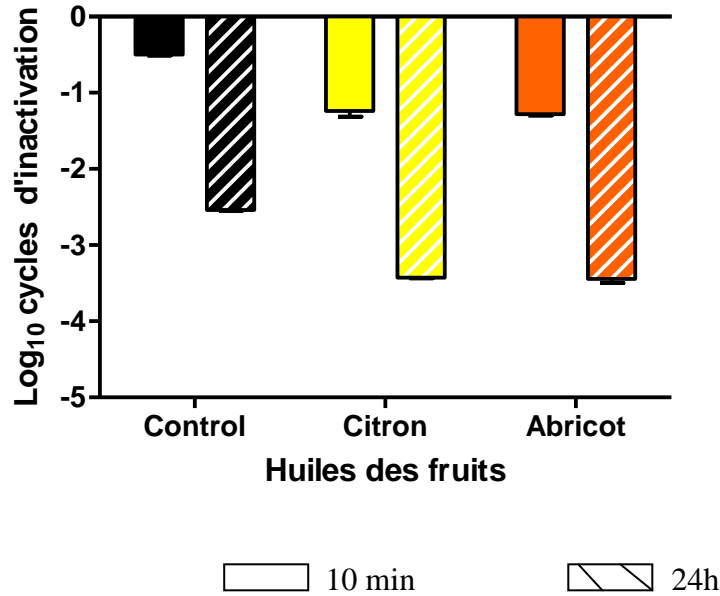


Figure 9: Effets des huiles fruités dans pH7 à 4°C sur *S. aureus*.

_ La **figure (9)** montre les résultats des différents effets des huiles fruités dans pH7 à 4°C sur *S. aureus*.

_ A travers ce graphe on remarque que huile de *Citrus limon* et l'abricot exercent une activité antibactérienne sur *S. aureus* dans 4°C «*in vitro*», comparativement avec le contrôle cette activité est non significatif durant 10 min mais qui augment au fur à mesure qui on avance dans le temps (24h).

_ Il ya une diminution remarquable de la croissance bactériennes atteignant d'inactivation 1.5 cycles logarithmique au bout de 10min pour les 2 huiles de fruits; 3.9 cycles logarithmique pour les deux huiles durant 24h.

- les deux huiles étudiées possèdent même pouvoir d'inactivation bactérienne.
- Les différences observées ne sont pas significativement suffisantes soit à pH4 ou à pH7.

Température 22C:

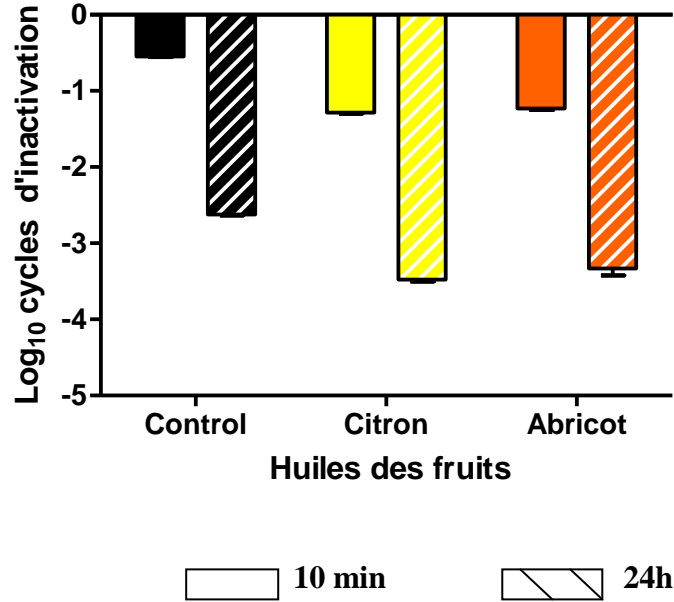


Figure 10: Effets antibactériens des huiles fruitées, de *Citrus limon* et l’abricot sur la croissance de *E. coli* dans pH4 à 22°C.

Le graphe illustré par la **figure (10)** montre les effets antibactériens des huiles fruitées, de *Citrus limon* et l’abricot sur la croissance de *E. coli* dans pH4 à 22°C.

_ On remarque que les deux huiles testé présentent une activité antibactérienne «*in vitro*» sur *E. coli* dans pH4 à (22°C), comparativement avec le contrôle.

_ Il est à noter que cette activité est non significative durant 10 min, mais qui augmente au fur à mesure qu’on avance dans le temps de 24h.

_ Il ya une réduction considérable de la croissance bactérienne, atteignant jusqu’à 1.1 cycle logarithmique d’inactivation pour huile de citron et 1 cycle logarithmique pour huile de abricot au bout de 10min et 3.5 cycles logarithmique pour huile de citron et 3.1 cycles logarithmique pour huile de abricot au bout 24h.

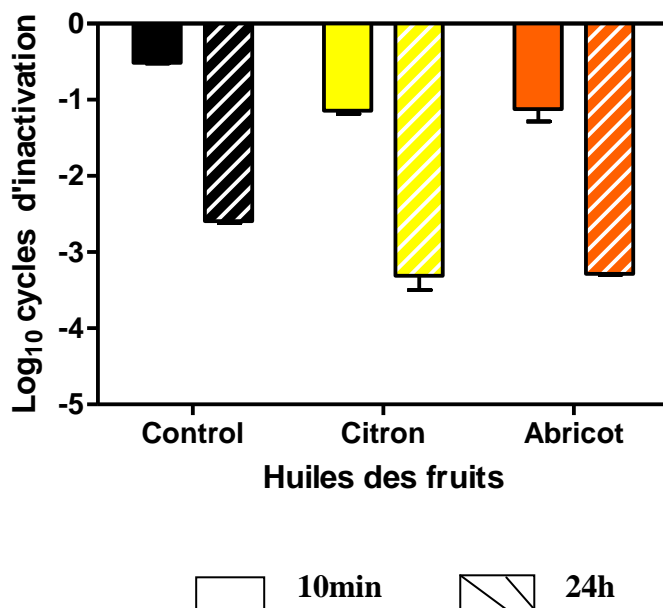


Figure 11: Effets des huiles fruitées dans pH7 à (22°C) sur *E. coli*

La **figure (11)** montre les résultats des différents effets des huiles fruitées dans pH7 à (22°C) sur *E. coli*

- A travers ce graphe, on remarque que les deux huiles fruitées exercent une activité antibactérienne «*in vitro*» dans pH7 à (22°C) comparativement avec le contrôle.

_ Cette activité est non significative durant les première 10min, mais qui augmente au fur à mesure qu'on avance dans le temps 24h.

_ Il ya une diminution remarquable de la croissance bactérienne, atteignant d'inactivation 1 cycle logarithmique au bout de 10min pour les deux huile et 3.3 cycles logarithmiques au bout 24h pour les deux huiles (abricot et citron).

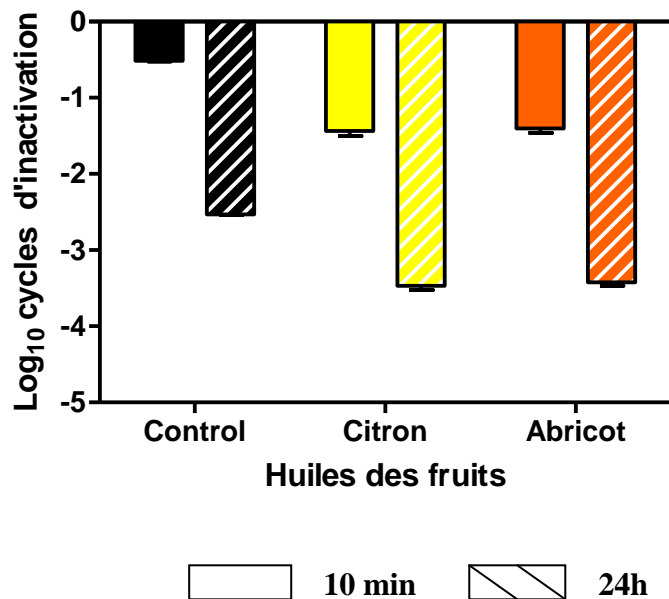


Figure 12: Effet de l'huile fruitée sur *S. aureus* dans pH4 à 22°C.

_ La figure (12) montre l'activité antibactérienne des huiles fruitées de *Citrus limon* et l'abricot sur *S. aureus* dans pH4 à 22°C.

_ huile de *Citrus limon* et l'abricot montrent une activité antibactérienne relativement moyenne, comparativement avec le contrôle.

_ *S. aureus* présente une sensibilité vis-à-vis à les deux huiles testées, inactive 1.2 cycles logarithmiques durant 10 min pour les deux huiles et 3.3 cycles logarithmiques pour le *Citrus limon* et 3.2 pour l'abricot durant 24h.

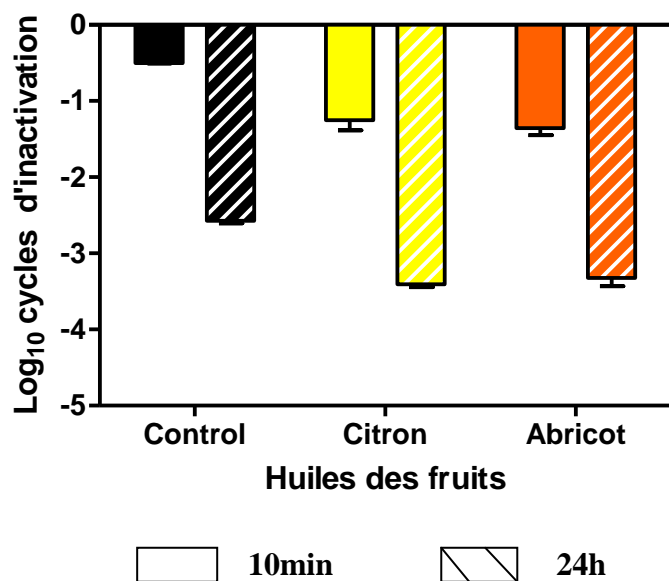


Figure (13): Résultats des différents effets des huiles fruitées à pH7 (22°C) sur *S. aureus*.

_ La **figure (13)** montre les résultats des différents effets des huiles fruitées dans pH7 à 22°C sur *S. aureus*.

_ A travers ce graphe on remarque que huile de citrus limon et l'abricot exercent une activité antibactériennes sur *S. aureus* dans 22°C «*in vitro*», comparativement avec le contrôle cette activité est non significatif durant 10 min mais qui augment au fur à mesure que l'on avance dans le temps (24h).

_ Il ya une diminution remarquable de la croissance bactériennes atteignant d'inactivation 1.1 cycles logarithmique au bout de 10min pour les 2 huiles de fruites; 3.3 cycles logarithmique pour les deux huiles durant 24h.

II .2.Discussion

II.2.1.influence des huiles sur des bactéries à Gram- positif et Gram- négatif

La plupart des études portant sur l'action de l'ensemble H E contre les organismes responsables de la détérioration de la nourriture et borne alimentaire pathogènes conviennent que, généralement, l'HE sont légèrement plus actives contre les bactéries Gram-positives que bactéries Gram-négatives (Shelef, 1983; Shelef et al; 1984; Farag et al; 1989; Mendoza-Yepes et al; 1997; Ouattara et al, 1997; Smith-Palmer et al; 1998; Marin et al; 1999,2001; Negi et al; 1999; Juliano et al; 2000; Rubertoetal;2000; Senatore et al; 2000; CanillacetMourey, 2001; Demetzos et Perdetzoglou, 2001;Lambert et al., 2001; Marin et al; 2001; Cimanga et al; 2002; Delaquis et al; 2002; Pintore et al; 2002; Harpaz et al; 2003). Que les organismes à Gram négatif sont moins sensibles à l'action d'agents antibactériens est peut-être à prévoir, car ils possèdent une extérieure membrane entourant la paroi de la cellule (Ratledge Wilkinson, 1988), ce qui limite la diffusion des composés hydrophobiques par son lipopolysaccharide de recouvrement (Vaara, 1992). Cependant, toutes les études sur HE ont conclu que Gram-positifs sont plus susceptible (Wilkinson et al; 2003). Mais, comme indiqué ici, cela n'a pas appliquer à Nos résultats sont en accord avec Ouattara et al; (1997) qui ont montré aucune différence évidente entre-êtré Gram positifs et Gram-négatifs au bout de 24 h .Une étude testant 50 HE commercialement mesurées contre 25 genres n'ont trouvé aucune preuve de différence de sensibilité entre les bactéries gram-négatif et Gram-positif (doyens et Ritchie, 1987).

Cependant, une étude ultérieure utilisant la même méthode d'essai et les mêmes bactériens mais utilisant apparemment fraîchement H. Es distillés, ont révélé que les bactéries Gram-positives sont en effet plus sensibles aux deux H. Es testées que les espèces Gram-négatives (**Dorman et les doyens, 2000**). Il a été postulé que les composants individuels d'H.E. présentent différents degrés d'activité contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (**Dorman et Doyens, 2000**) et il est connu que la composition chimique d'H.E. d'une espèce de plante particulière peut varier selon l'origine géographique et la période de récolte. Il est donc possible que la variation dans la composition entre les lots d'HE est suffisante pour provoquer une variabilité dans le degré d'susceptibilité des bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

Des bactéries Gram - se sont montrées généralement plus résistantes que les Gram + aux effets de diverses H.E. en raison des lipopolysaccharides présents dans la membrane externe, mais ce n'était pas toujours vrai (**Oussalah et al; 2007**). Les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés. Selon plusieurs auteurs (**Dorman et DEANS, 2000**), cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques.

Cependant, comme le résultat d'un test peut être affectée par des facteurs tels que la méthode utilisée pour extraire le H E à partir de matières végétales, le volume de l'inoculum, phase de croissance, le milieu de culture utilisé, le pH de la presse et temps d'incubation et de la température (**Rios et al; 1988**), la comparaison des données publiées est compliquée (**Janssen et al; 1987; Friedman et al; 2002**).

II.2.2.influence de pH

Le pH du milieu de traitement est l'un des principaux facteurs environnementaux qui influent sur la résistance microbienne aux agents physiques ou chimiques, agents d'inactivation (**Burt, 2004; Hansen et Rieman, 1963**). Il est généralement accepté que les huiles essentielles sont plus efficaces à des pH acides (**Burt, 2004**), mais dans nos résultats l'activité des huiles dans pH4 et pH7 est identique; comme il est connu l'huile de *Citrus limon* contient de 92% à 93% de terpènes dont le *d*-limonène est le plus abondant

(Iserin *et al*; 2001; Ferhat *et al*; 2010), de sesquiterpènes, d'aldéhydes (dont le citral est le plus dominant) (Iserin *et al*; 2001).

Selon les travaux de Somolinos *et al*; (2008); qui montre l'effet de citral sur *E. coli* à pH moyen de traitement en fonction de trois facteurs: la taille de l'inoculum, concentration de citral et le temps Storage. La plus grande efficacité de citral à pH neutre. Cependant, si le temps de traitement a été prolongé jusqu'à 24 h avec inoculum de 10^6 ou 10^7 UFC ml^{-1} ou si concentration citral a été augmentée jusqu'à $500 \mu\text{l l}^{-1}$, Un degré similaire d'inactivation a été observée à la fois dans différentes des valeurs de pH (Somolinos *et al*; 2008).

Les Composition de huile d'abricot présence une activité antibactérienne tel que l'acide oléique elle inhibé la croissance de toutes les espèces bactériennes Gram-positives.

À longue chaîne d'acides gras insaturés, tels que acide linoléique, présentent une activité antibactérienne et sont les ingrédients clés de additifs alimentaires.

En résumé, les huiles utilisées dans notre expérience sont des huiles fruitées qui contiennent certains composés des huiles essentielle en faible quantité tel que le citral.

Conclusion

CONCLUSION

Nous rappelons que les objectifs de cette étude sont la valorisation des huiles de citron (*Citrus limon*) et l'Abricot (*Prunus armenia*) par l'utilisation comme un agent naturel de conservation des aliments.

Cette recherche a permis de mettre en évidence l'effet antibactérien des H.E. de ces plantes "*in vitro*".

Suivant nos résultats, nous pouvons prédire que les huiles étudiées sont des huiles fruitées qui contiennent quelques composés des HE. Plus utilisés en domaine cosmétiques que agro-alimentaires, mais, peuvent être utilisée comme des sources neurales des conservateurs contre des agents antimicrobiens si couplés avec d'autre méthode de conservation pour limiter les empoisonnements d'origine bactérienne, notamment l'huile de *Citrus limon* Cependant, il faut signaler que les activités biologiques d'une huile essentielle ne sont pas seulement dues aux composés majoritaires mais à l'ensemble des composées de base.

Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans les aliments. Vérifier leur innocuité par des tests de toxicité et des tests d'allergénicité semble d'une grande importance.

Cette étude confirme l'intérêt des H.Es, en offrant ainsi un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser, dans la mesure où nos résultats constituent, avec ceux des études réalisées auparavant, une base essentielle en faveur de leur exploitation dans l'industrie agroalimentaire.

Références Bibliographiques

1. **AFNOR, 2000.** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6ième édition. AFNOR, Paris.
2. **Aprotosoie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.) .*FARMACIA*, 58 (1). . 46-54
3. **Bagamboula C. F., UYTENDAELE M. , DEBEVERE J. 2004.** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene toward *S. Shigellesonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*. 21, 33-42.
4. **Bahorun, T. 1997** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius* 8394.
5. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils — A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
6. **Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010.** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994
7. **Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. 2008.** Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166–2174
8. **Berche P. 2003.** Bactériologie générale. PCE M 2. Faculté de médecine Necker-E nfants malades (France). 89.
9. **Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289
10. **Bruneton, J., 2008.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 2eme éd., Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1188.
11. **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 91.
12. **Bruneton J. 1999a.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Ed. Lavoisier, 2ème Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623
13. **Burt, S. 2004.** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
14. **Bruneton J., 1999b.** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* La voisier 3ème édition, Paris.
15. **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 91.
16. **Buchbauer G., 2010.** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, .235 – 280

17. **Caillet S., Lacroix M. 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
18. **Canillac, N., Mourey, A., 2001.** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18, 261–268.
- Carson, C.F., Riley, T.V., 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters in Applied Microbiology* 16, 49–55.
19. **Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte', J., Pieters, L., Vlietinck, A.J., 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 213–220.
18. **Conner D. E., Beuchat L. R. 1984a.** Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49, 429–434.
19. **Couture B. 1990.** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.
20. **Cox, S. D., C. M. Mann, J. L. Markham, H. C. Bell, J. E. Gustafson, J.R. Warmington, and S. G. Wyllie. 2000.** The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88:170-175..
21. **Dabbah. R., Edwerds V. M., MOATS W. A. 1970.** Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiology*. 19, 27-31.
22. **Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., 2008.** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87.
23. **Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
23. **Demetzos, C., Perdetzoglou, D.K., 2001.** Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. scabrum* Boiss. Et Heldr. from Greece. *Journal of Essential Oil Research* 13, 460–462.
23. **Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. 2010.** Chemical composition of leaf Essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 199–204.
24. **Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. 2004.** New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273-285.
25. **Dorman H. J. D. et Deans S. G. 2000.** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 308-316.

- 26. Dupuy A. 2010.** Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). France. 305
- 27. Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils .*Journal of Food Protection* 52 (9), 665– 667.
- 27. Farkas, J. 2007.** Physical methods of food preservation. In *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 685-712.
- 28. Fasquelle R. 1974.** *Eléments de bactériologie médicale* 9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36..
- 29. Fauchere J.L. and Avril J.L. 2002.** *Bactériologie générale et médicale*. ellip ses, Paris. 213-217.
- 30. Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010.** *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 .
- 31. Ferron A. 1984.** *Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine*. 12ème édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.
- 32. Fillatre Y. 2011.** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. *Thèse de doctorat* , université d'Angers, France. 266.
- 33. Fosse J. et Margras C., 2004.** *Dangers biologiques et consommation des viandes*. Editions tec & Doc, Lavoisier, Paris, 223 .
- 34. Gram H. (1884).** Über die isolirte Färbung der Schizonycten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin* 2.
- 35. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C.H.N. 1973.** The genus *Bacillus* .*Agriculture Handbook*. N° 427, ARS-USDA, Washington (USA)
- 36. Guesmi A. et Boudabous A. 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie- les Plantes à Parfum, aromatiques et médicinales. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis - El Manar, 2092, Tunis.
- 37. Grysole J. 2005.** La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse et de séparation. des essences. végétales), Québec, 139-162
- 38. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., & Ozkan, H. 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449–1456.

39. Goodridge, L. D., Willford, J. & Kalchayan and, N. 2006. Destruction of *Salmonella* Enteritidis inoculated onto raw almonds by high hydrostatic pressure. *Food Research International* **39**, 408-412
40. Gongora-Nieto, M. M., Sepulveda, D. R., Pedrow, P., Barbosa-Canovas, G. V. & Swanson, B. G. 2002. Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel -Wissenschaft Und -Technologie-Food Science and Technology* **35**, 375-388.
41. Grimont P.A.D., 1987. Taxonomie des Escherichia. Méd. Mal. Infec. In : Vernozy- Rozand C. et Montet M-P., 2001. Escherichia coli O157 :H7. Edition tec& Doc, Lavoisier, Paris, 135 .
42. Gustafson, J. E., Y. C. Liew, S. Chew, J. L. Markham, H. C. Bell, S. G. Wyllie, and J.R. Warmington. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* **26**:194-198.
43. Hammer K.A., CARSON C. F., RILEY T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiology*. **86**, 985-990.
44. Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A., 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of fresh water reared Asian sea bass fish (Late scalcarifer). *Journal of Food Protection* **66** (3), 410–417.
45. Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A. & Knorr, D. 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design. *Trends in food science & technology* **12**, 103-111
46. Helander, I. M., H.-L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris, and A. Von Wright 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:3590-3595.
47. Hellal Z. 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
48. I. Amalia. Kartika. 2005, nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol. Thèse doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, France
49. Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F. et al. 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins*. 2ème Ed. Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française Paris. 335 .

50. Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., BaerheimSvendsen, A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976– 1986 literature review. Aspects of the test methods .*Planta Medica* 53,396–398.
51. ISO, 1997. Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle - Vocabulaire, 2
52. Juven, B. J., J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76:626-631.
53. Kaufmann B. et Christen P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, .105-113
54. Keklik, N. M., Demirci, A. & Puri, V. M. 2009. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light. *Journal of Food Science* 74, M431-M439.
55. Kolb, J. F., Kono, S. & Schoenbach, K. H. 2006. Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics* 27, 172-187.
56. Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99, 8788–8795.
57. Knobloch, K., A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand, and N. Weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1:119-128.
58. Kunle, O., J. Okogun, 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract *Phytomedicine* .Vol 10.59-61.
59. L.A. Jonhson. Comparison of alternative solvents for oils extractions 1983. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60,229-242.
60. Juliano, C., Mattana, A., Usai, M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.
61. Lambert, R. J. W., P. N. Skandamis, P. Coote, and G.-J. E. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91:453-462.
62. Minor L. and Veron M. 1990. *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»* J. Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
63. Lesley B. 1996. *Plantes médicinales et aromatiques*. Ed. Lavoisier. Paris. 58-61

64. **Lucchesi M.E. 2005.**Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.143.
65. · **Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong-Suk C., Suzuki T. 2004.** Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*.**21**, 657-666
66. **Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 187– 195.
67. **Martin S., Andriantsitohaina R. 2002** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**:304-315.
68. **M. Paris, M. Hurabielle. Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie). Tome 1 Masson, Paris 1981, 1-3,5-10**
69. **Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. 2005.** Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils .*Flavour and Fragrance Journal.*, 20(2), .136-140
70. **Montet M-P.,2001.** Escherichia coli O157 :H7. Edition tec & Doc, Lavoisier, Paris, 135.
71. **Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 1999.** Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* **62** (9), 1017– 1023.
72. **Marino, M., Bersani, C., Comi, G., 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 187– 195.
73. **Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan Rao Mohan, L., Sakariah, K.K., 1999.** Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4297– 4300.
74. **Oosterhaven, K., B. Poolman, and E. J. Smid. 1995.** S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products* **4**:23-31.
75. **Padrini F., Lucheroni M. T. 1996.** *Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Énergétiques avec Plus de 100 Photographies.* Ed. De Vecchi , Paris, 11, 15, 61 et 111.
76. **Pingot A. 1998.** *Les huiles essentielles.* Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 230- 236
77. **Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., Casanova, J., 2002.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Ros marinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica .*Flavour and Fragrance Journal* **17**, 15–

19. Pol, I.E., Smid, E.J., 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 166–170.
78. **Piochon M. 2008.** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. *Thèse de doctorat*. Université du Québec, 5-9
79. **Pohl P., 1993.** Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Ann. Méd. Vét*; 13:325-333. In: **Vernozy- Rozand C. et**
72. **B., Simar. Ouattara d, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Bégin, A., 1997.** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential
80. **Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988.** An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, 3–22.
81. **Rice-Evance C. A. et Packer L.; 1998;** Flavonoids in Health and Disease; Ed: MARCEL DEKKER: 61- 160.
82. **Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. 2004.** In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252–1256.
83. **Roux D. 2008.** *Conseil en aromathérapie*. 2ème Ed. Pro-Officina., 187
84. **Ruberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G., Dorman, H.J.D., 2000.** Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica* 66, 687–693.
85. **Shelef, L.A., 1983.** Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6, 29–44.
86. **Shelef, L.A., Jyothi, E.K., Bulgarelli, M.A., 1984.** Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science* 49 (737–740), 809.
87. **Seenivasan Prabuseenivasan, 2006.** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *Journal of Complementary and Alternative*
88. **Senatore, F., Napolitano, F., Ozcan, M., 2000.** Composition and antibacterial activity of the essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15, 186–189.
89. **Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C. S., Srivastava, B., & Dubey, N. K. 2008.** Antimycotic and anti-aflatoxinogenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodegradation of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 348–351.
90. **Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology* 26, 118–122.

91. Sikkema, J., J. A. M. De Bont, and B. Poolman. 1994. Interactions of cyclhydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269:8022-8028.
92. Sikkema, J., J. A. M. De Bont, and B. Poolman. 1994. Interactions of cyclhydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269:8022-8028.
93. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Review. *Food Control*, 21, 1199–1218.
94. Thoroski, J., G. Blank, and C. Biliaderis. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52:399-403.
95. Ultee, A., E. P. W. Kets, and E. J. Smid. 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4606-4610.
96. Ultee, A., E. P. W. Kets, M. Alberda, F. A. Hoekstra, and E. J. Smid. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174:233-238.
97. Ultee, A., M. H. J. Bennink, and R. Moezelaar. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561-1568.
98. Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56 (3), 395– 411. Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J., 1999. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, .116.
99. Valnet J. 2001. *La santé par les fruits, légumes et les céréales*. Ed Vigot. France, 411
100. Vernozy-Rozand C. et Montet M-P., 2001. *Escherichia coli* O157 :H7. Edition tec & Doc, Lavoisier, Paris, 135.
101. Véronique bergognoux. 2005. Biosynthèse et sécrétion du parfum chez *Rosa x hybrida* L. Thèse de l'Académie de Lyon. France.
102. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. 2011. Spices as functional food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 13–28.
103. Walsh G.; 2003; *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*; Ed2: WILEY & SONS; 23- 40
104. Wilkinson, J.M., Hipwell, M., Ryan, T., Cavanagh, H.M.A., 2003. Bioactivity of *Backhousiacitriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 76– 81.

Annexes

Annexe

Les milieux de culture

❖ **Bouillon de soja tryptique(pH=7.3±0.2) TSB**✓ **Composition**

Tryptone	17g
Peptone de soja	03g
Glucose	2.5g
Nacl	05g
Phosphate dipotassique	2,5 g/l
Eau	1000 ml

+0.5% extrait de levure dans 1L

✓ **Preparations**

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7.3. stériliser pendant 20min à 121°C±1°C, conserver dans un flacon de verre, à la température ambiante.

❖ **Tryptone Soya Agar (TSA)**✓ **Composition**

Tryptone de soja	05g
Tryptone de casiene	15g
Agar	20g

+extrait de levure 6g dans un 1L d'eau.

✓ **Preparations**

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition.

Stériliser pendant 20min à 121°C±1°C. Conserver dans un flacon de verre, à la température ambiante.