

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
EN SCIENCES

Option: Microbiologie Appliquée

THEME

*Sélection d'extraits bio-actifs des espèces du genre Thymus
comme conservateurs antibactériens naturels*

Présentée par : **Mme. HENI Sonia**

Devant le JURY

Président de jury:	Pr. BRANES Zidane	Université d'Annaba
Directeur de thèse:	Pr. DJAHOUDI Abdelghani	Université d'Annaba
Examineur:	Pr. CHEFROUR Azeddine	Université de Souk Ahras
Examinatrice:	MCA. GARARA Nedjoud	Université de Guelma

Année universitaire: 2015-2016

Remerciements

Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **DJAHOUDI Abdelghani** pour sa disponibilité et son souci constant de manière à ce que cette thèse se passe dans les meilleures conditions possibles. Ses qualités humaines, sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant.

C'est aussi avec une profonde sincérité, que j'adresse toute ma reconnaissance au Professeur **BENNADJA Salima**, pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces années et pour m'avoir communiqué la passion pour la recherche, avec ses précieux conseils et ses encouragements, j'ai beaucoup appris.

Je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur **BRANES Zidane**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury, Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et reconnaissance.

Monsieur **CHEFROUR Azeddine**, Professeur à l'université de Souk Ahras, qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance de thèse et d'examiner ce travail, je le remercie également de me consacrer de son temps et d'avoir accepté de se déplacer.

Melle **GRARA Nedjoud**, Maitre de conférences à l'université de Guelma, pour l'honneur qu'elle m'a fait de sa participation à mon jury de thèse, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et d'avoir accepté de se déplacer. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance et de tous mes remerciements pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie cette thèse,

A tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma vie, leur confiance en moi, leurs encouragements, et leur amour.

A mon époux, pour sa patience tout au long de ce travail et pour son soutien sans faille.

A mes enfants, *Razane* et *Mohamed*, qui m'ont donnée un sens à ma vie, que ce travail soit pour vous un exemple à suivre.

A ma sœur *Lylia* et mes deux frères, pour leur support continu et leur amour.

Et surtout à ma sœur adorable *Racha*.

A toutes mes amies en particulier *Amira*, *Nora* et *Mina* pour leur soutien morale et leur collaboration.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

PARTIE I : Analyse bibliographique

Chapitre I : Le thym

I. Le Thym	1
1. Historique	1
2. Caractéristiques botaniques.....	2
2.1. Description.....	2
2.2. Classification botanique du thym	2
3. Répartition géographique	2
3.1. Dans le monde.....	2
3.2. En Algérie.....	3
4. <i>Thymus ciliatus</i> Desf. (Benth.).....	4
4.1. Description botanique	4
4.2. Position systématique.....	4
4.3. Répartition géographique.....	5
5. <i>Thymus numidicus</i> Poiret.....	5
5.1. Description botanique.....	5
5.2. Position systématique	5
5.3. Répartition géographique.....	6
6. Propriétés du Thym	6
II. Les huiles essentielles.....	7
1. Définition.....	7
2. Localisation et lieu de synthèse.....	7
3. Rôles physiologiques	8
4. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	9
4.1. Entraînement à la vapeur d'eau.....	9
4.2. L'hydrodistillation.....	9
4.3. L'enfleurage.....	10

4.4. L'extraction par solvant organique.....	10
4.5. Extraction assistée par micro-ondes.....	10
4.6. L'extraction au CO ₂ supercritique.....	10
5. Contrôle de la qualité des huiles essentielles.....	11
6. Techniques d'analyse des huiles essentielles.....	11
6.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	11
6.2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse ...	11
7. Principaux constituants des huiles essentielles	12
7. 1. Terpènes	12
7. 2. Phénylpropanoïdes	13
8. Toxicité des huiles essentielles.....	13
III. L'huile essentielle de thym.....	14
1. Composition chimique.....	14
2. Notion de chémotype.....	15
3. Activités biologiques et pharmacologiques de l'huile essentielle de thym.....	17
4. Domaines d'utilisation.....	17
4.1. En Agro- alimentaire.....	17
4.2. En parfumerie et cosmétique.....	17
4.3. En usage thérapeutique.....	17

Chapitre II : Bactéries des produits alimentaires

I. Généralités.....	19
II. Principaux germes de contaminations des aliments.....	19
1. Le genre <i>Pseudomonas</i>	20
1.1. Caractères morphologiques.....	20
1.2. Habitat et pouvoir pathogène.....	20
2. Le genre <i>Acinetobacter</i>	20
2.1. Caractères morphologiques.....	20
2.2. Habitat et pouvoir pathogène	20
3. Le genre <i>Aeromonas</i>	21
4. Les <i>Enterobacteriaceae</i>	21
5. <i>Escherichia coli</i>	22
III. Les bactéries impliquées dans les Toxi-infection alimentaire.....	23
1. Le genre <i>Salmonella</i>	24
1.1. Caractères morphologiques.....	24
1.2. Habitat et pouvoir pathogène.....	24

2. Le genre <i>Staphylococcus</i>	25
2.1. Caractères cultureux.....	25
2.2. Potentiel Enzymatique.....	25
2.3. Pouvoir pathogène.....	26
2.4. Sources de contamination et prévention.....	26
2.5. Pouvoir pathogène chez l'Homme.....	26
3. Le genre <i>Campylobacter</i>	27
3.1. Caractères cultureux.....	27
3.3. Pouvoir pathogène.....	27
4. Le genre <i>Clostridium</i>	28
5. Le genre <i>Listeria</i>	29
5.1. Caractères morphologiques.....	29
5.2. Sources de contamination et prévention.....	29
5.3. Pouvoir pathogène.....	29
5.4. Mode d'action.....	30
6. <i>Bacillus cereus</i>	32
6.1. Caractères morphologiques.....	33
6.2. Habitat.....	33
6.3. <i>B. cereus</i> source de problème dans les industries agroalimentaires	33
6.4. <i>B. cereus</i> pathogène alimentaire.....	33
6.4.1. Les Toxi-infection alimentaires Collectif (TIAC).....	33
6.4.2. Les atteintes gastro-intestinales.....	34
7. <i>Yersinia enterocolitica</i>	35
7.1. Caractères morphologiques.....	35
7.2. Habitat et pouvoir pathogène.....	35
7.3. Symptômes.....	35

Chapitre III : Les additifs alimentaires

I. Les additifs alimentaires.....	36
1. Historique.....	36
2. Définition.....	37
3. Classification des additifs alimentaires.....	37
II. Les Conservateurs.....	39
1. Agents conservateurs (Antibactériens).....	39
2. Mécanismes d'action des conservateurs.....	40

3. Qualité requise d'un conservateur.....	41
3.1. Innocuité.....	41
3.2. Spectre d'activité.....	41
3.3. Efficacité à long terme.....	41
4. Problèmes liés à certains conservateurs alimentaires.....	41
5. Quelques agents conservateurs minéraux.....	42
6. Quelques agents conservateurs organiques.....	43
7. Effet de combinaison des additifs alimentaires.....	43

Partie 02 : Matériel et méthodes

I. Enquête ethnobotanique.....	44
1. Lieux de l'enquête.....	44
2. Fiche de l'enquête.....	44
3. Population enquêtée.....	45
II. Zones d'échantillonnages.....	45
1. Situation géographique.....	45
2. Aspect climatique.....	46
3. Aperçu pédologique.....	46
III. Matériel végétal.....	46
1. Récolte de la plante.....	46
2. Description anatomique.....	47
3. Séchage et conservation.....	48
IV. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	48
1. Méthodologie.....	49
2. Calcul du Rendement en huile essentielle.....	50
3. Conservation des huiles essentielles.....	50
V. Etude analytique des huiles essentielles extraites.....	50
1. Propriétés organoleptiques.....	50
2. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles.....	51
2.1. Propriétés physiques.....	51
2.2. 1. Densité relative.....	51
2.2.2. Indice de réfraction.....	51
2.1.3. Miscibilité à l'éthanol.....	52
2.2. Propriétés chimiques.....	52
2.2.1. Indice d'acide.....	52
2.2.2. Indice d'Ester.....	53

3. Composition chimique.....	54
3.1. Principe de la technique.....	54
3.2. Conditions chromatographiques.....	55
VI. Recherche d'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites.....	56
1. Aromatogramme.....	56
1.1. Identification et antibiogramme des souches bactériennes test-objet....	57
1.1.1. Identification.....	57
1.1.2. Sensibilité aux antibiotiques.....	57
1.1.3. Tests complémentaires.....	59
1.2. Aromatogramme proprement dit.....	60
2. Quantification de l'activité antibactérienne des huiles essentielle extraites.....	62
2.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	63
2.2. Concentrations minimales bactéricides (CMB).....	63
3. Détermination de type d'activité : (bactéricide / bactériostatique).....	64
VII. Cytotoxicité des huiles essentielles	64
1. Objectif de l'étude.....	64
2. Choix de <i>Paramecium sp</i> comme modèle biologique.....	64
3. Rappels sur la Paramécie	65
4. Préparation de culture de paramécies.....	66
5. Traitement des paramécies par les huiles essentielles.....	66
6. Cinétique de croissance cellulaire.....	66
7. Calcul du pourcentage de réponse.....	68
VIII. Recherche de synergies Antibiotique/ huile essentielle.....	68
X. Usage de l'huile essentielle comme conservateur alimentaire.....	69
1. Test de dégustation.....	70
2. Protocole expérimentale.....	71
3. Dénombrement des bactéries.....	71
3.1. Dénombrement de la microflore mésophile aérobie totale (<i>MMAT</i>)...	71
3.2. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	72
4. Calculer le taux d'abattement.....	74
5. Analyse statistique.....	74

Partie III : Résultats et discussions

I. Enquête ethnobotanique.....	75
1. Régions enquêtées	75
2. Répartition des enquêtés selon le sexe	75

3. Répartition des enquêtés selon l'âge.....	76
4. Connaissance du thym.....	76
5. Répartition des enquêtés selon l'usage.....	77
6. Répartition des enquêtés selon la source d'information.....	78
7. Répartition des résultats selon la source de la plante.....	78
8. Répartition selon les parties utilisées.....	79
9. Répartition selon l'indication.....	80
10. Répartition selon le mode de préparation.....	80
11. Quelques recettes d'utilisation du thym.....	81
II. Zones d'échantillonnages.....	82
1. Coordonnées.....	82
2. Aspect climatique.....	82
3. Aperçu pédologique.....	83
III. Matériel végétal.....	84
1. Etude descriptive.....	84
2. Description anatomique.....	85
IV. Huiles essentielles.....	89
1. Extraction et rendement en huiles essentielles.....	89
V. Etude analytique des huiles essentielles extraites.....	90
1. Propriétés organoleptiques.....	90
2. Propriétés physicochimiques.....	90
3. Composition chimique des huiles essentielles extraites.....	93
3.1. L'huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> de Taoura et de Djebel Maouna.....	93
3.2. L'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> de Djebel El Ouahch et de Berrahel.....	97
3.3. Les classes biochimiques des HEs extraites.....	100
VI. Recherche d'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites.....	102
1. Aromatogramme.....	102
1.1. Souches bactériennes test- objets.....	102
1.1.1. Identification des souches bactériennes test-objet.....	103
1.1.2. Antibiogramme de la microflore test-objet.....	104
1.2. Aromatogramme proprement dit.....	111
2. Etude quantitative de l'activité antibactérienne des HEs extraites.....	118
2.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	118
2.2. Concentrations minimales bactéricides (CMB).....	122

3. Bactéricidie / bactériostase.....	124
VII. Cytotoxicité des huiles essentielles.....	126
1. Effet du DMSO sur la croissance de <i>Paramecium sp</i>	126
2. Croissance de <i>Paramecium sp.</i> en présence d'huiles essentielles.....	127
3. Calcul du pourcentage de réponse (PR).....	128
VIII. Effet synergique : Antibiotique/ Huile essentielle.....	130
X. Usage de l'huile essentielle comme conservateur alimentaire.....	132

Conclusion

Résumés

Références bibliographiques

Annexes

Travaux scientifiques

Liste des abréviations

ADN : acides désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

AM : Ampicilline

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique

ANOVA : **analysis of variance** (analyse de variance)

ATCC : American Type Culture Collection

ATM : Aztréonam

AX : Amoxicilline

BGN : Bacilles à Gram négatif

BGP : Bacilles à Gram positif

BLSE : béta- lactamases à spectre élargie

BMR : Bactéries multi-résistantes

C : Chloramphénicol

CA-SFM : société française de microbiologie

CAZ: Ceftazidime

CEE : Communauté économique européenne

CGP : Cocci à Gram positif

CIP : Ciprofloxacine

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG/SM : chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

CT : Colistine

CTX : Cefotaxime

D.J.A : *Dose Journalière Admissible*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DZI : diamètre des zones d'inhibition

E.F.S.A : *Autorité Européenne de Sécurité des Aliments*

E.S.S.C : *Escherichia, Salmonella, Shigella, Citrobacter*

FSAI: *Food Safety Authority of Ireland*

FQ : Fluoroquinolones

GRAS: Generally Recognized As Safe

g: gramme

h: heure

HE: huile essentielle

IE : impact électronique

IMP: Imipenème

INSP : institut national de santé publique

ISO : International Standard Organization

K.E.S.H : *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia*

MH : Muller – Hinton

MHE : Quantité d'huile essentielle extraite en gramme

MLS: Macrolides-Lincosamides- Streptogramines

MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA : Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

MMAT : microflore aérobie mésophile totale

ml : millilitre

mm : millimètre

min : minute

µg : microgramme

µl : microlitre

N : Néomycine

NA : Acide nalidixique

NaCl : Chlorure de sodium

OX : Oxacilline

P : Pénicilline

PLP : protéines liant la pénicilline

P.M.P : *Proteus, Morganella, Providencia*

SXT : Triméthoprim + Sulfaméthoxazole

TCC : Ticarcilline + acide clavulanique

TIC : Ticarcilline

T. ciliatus (Ta) : *Thymus ciliatus* de la région de Taoura

T. ciliatus (Ma) : *Thymus ciliatus* de Djebel Mahouna

T. numidicus (Ou) : *Thymus numidicus* de Djebel El Ouahch

T. numidicus (Br) : *Thymus numidicus* de Berrahel

UFC : Unité Formant Colonie

UBMA : Université Badji Mokhtar Annaba

Liste des figures

Fig.01	Différents organes sécréteurs.....	08
Fig.02	Schéma du dispositif de l'Hydrodistillation	09
Fig.03	Terpènes et leurs dérivés oxygénés.....	12
Fig.04	Présentation du cycle aromatique des Phénols.....	13
Fig.05	Dérivés phénoliques	13
Fig.06	Situation géographique des zones d'échantillonnage.....	45
Fig.07	<i>Thymus numidicus</i> pendant la floraison	47
Fig.08	Montage de l'appareil d'Hydrodistillation.....	49
Fig.09	Appareil de la CG / SM 10.....	56
Fig.10	Structure d'une paramécie sous microscope.....	65
Fig.11	Schéma simplifié du protocole expérimental.....	73
Fig.12	Répartition des enquêtés selon le sexe	75
Fig.13	Répartition des enquêtés selon l'âge.....	76
Fig.14	Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante.....	77
Fig.15	Répartition des enquêtés selon l'usage du thym.....	77
Fig.16	Répartition selon la source d'information.....	78
Fig.17	Répartition selon la source de la plante.....	79
Fig.18	Répartition des enquêtés selon les parties utilisées.....	79
Fig.19	Répartition des enquêtés selon les indications	80
Fig.20	Répartition des enquêtés selon le mode de préparation	81
Fig.21	<i>Thymus numidicus</i>	84
Fig.22	<i>Thymus ciliatus</i>	84
Fig.23	Coupe transversale d'une feuille de <i>T. ciliatus</i> (M.O : Gx10)	86
Fig.24	Coupe transversale d'une feuille de <i>T. numidicus</i> (M.O : Gx10).....	86
Fig.25	Crypte d'une feuille de <i>T. ciliatus</i> (M.O :Gx40)	86
Fig.26	Crypte d'une feuille de <i>T. numidicus</i> (M.O :Gx40)	86
Fig.27	Poil sécréteur poil tecteur d'une feuille de <i>T. ciliatus</i> (M.O :Gx40).....	86
Fig.28	Structure secondaire d'une tige de <i>T. ciliatus</i> (M.O : Gx10).....	88
Fig.29	Structure secondaire d'une tige de <i>T. numidicus</i> (M.O : Gx10).....	88
Fig.30	Poil sécréteur et poil tecteur d'une tige de <i>T. ciliatus</i> (M.O :Gx40).....	88
Fig.31	Poil sécréteur et poil tecteur d'une tige de <i>T. numidicus</i> (M.O :Gx40).....	88
Fig.32	Composants majoritaires de l'HE de <i>T. ciliatus</i> de Taoura.....	94

Fig.33	Composants majoritaires de l'HE de <i>T. ciliatus</i> de Djebel Maouna.....	96
Fig.34	Composants majoritaires de l'HE de <i>T. numidicus</i> de Djebel El- Ouahch....	98
Fig.35	Composants majoritaires de l'HE de <i>T. numidicus</i> de Berrahel.....	99
Fig.36	Répartition des souches bactériennes selon l'origine.....	103
Fig.37	Résistance des Entérobactéries aux autres antibiotiques.....	108
Fig.38	Résistance des BGN-NF aux antibiotiques.....	109
Fig.39	Résistance des <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques.....	110
Fig.40	Résistance des BGP aux antibiotiques.....	111
Fig.41	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur les souches <i>K.E.S.H</i>	113
Fig.42	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur <i>M. morgani</i> et <i>P. stuartii</i>	114
Fig.43	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur les souches <i>E.S.S.C</i>	114
Fig.44	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	115
Fig.45	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur <i>Staphylococcus aureus</i>	116
Fig.46	Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur <i>Bacillus cereus</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	117
Fig.47	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches <i>K.E.S.H</i>	118
Fig.48	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches de <i>Morganella morgani</i> et <i>Providancia stuartii</i>	119
Fig.49	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches <i>E.S.S.C</i>	120
Fig.50	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	120
Fig.51	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches de <i>S. aureus</i>	121
Fig.52	Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches <i>Bacillus cereus</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	122
Fig.53	Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur les souches <i>K.E.S.H</i>	122

Fig.54	Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur <i>Morganella morganii</i> et <i>Providencia stuartii</i>	123
Fig.55	Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur les souches <i>E.S.S.C</i>	123
Fig.56	Cinétique de croissance des paramécies en présence du DMSO.....	126
Fig.57	Cinétique de croissance des paramécies en présence de l'HE de <i>Thymus ciliatus</i>	127
Fig.58	Cinétique de croissance des paramécies traitées aux CMI de l'HE de <i>Thymus numidicus</i>	128
Fig.59	Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de l'HE de <i>Thymus numidicus</i>	129
Fig.60	Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de l'HE de <i>Thymus ciliatus</i>	129
Fig.61	Evolution de la charge bactérienne (<i>MMAT</i>) en UFC/g à différents temps de conservation.....	134
Fig.62	Evolution de la charge bactérienne (<i>Staphylococcus aureus</i>) en UFC/g à différents temps de conservation.....	134
Planche 01.	Structures anatomiques des feuilles de <i>T. ciliatus</i> et <i>T. numidicus</i>	86
Planche 02.	Structure anatomique des tiges de <i>T. ciliatus</i> et <i>T. numidicus</i>	88

Liste des tableaux

Tab.01	Localisation des principales espèces du thym en Algérie	03
Tab.02	Composition de l'huile essentielle de quelques espèces du thym.....	15
Tab.03	Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius.	37
Tab.04	Rendement moyen en huiles essentielles extraites.....	89
Tab.05	Caractéristiques organoleptiques des quatre HEs.....	90
Tab.06	Valeurs des densités des HEs.....	90
Tab.07	Valeurs obtenues des indices de réfraction.....	91
Tab.08	Valeurs obtenues de la miscibilité des HEs à l'éthanol	91
Tab.09	Valeurs d'indices d'Acide des HEs.....	92
Tab.10	Valeurs d'Indice d'Ester des HEs.....	92
Tab.11	Composition chimique de l'HE de <i>Thymus ciliatus</i> de Taoura.....	93
Tab.12	Composition chimique de l'HE de <i>Thymus ciliatus</i> de Djebel Maouna.....	95
Tab.13	Composition chimique de l'HE de <i>Thymus numidicus</i> de Djebel el Ouahch.....	97
Tab.14	Composition chimique de l'HE de <i>Thymus numidicus</i> de Berrahel.....	99
Tab.15	Classes biochimiques des HEs de <i>Thymus ciliatus</i> et <i>Thymus numidicus</i> récoltées.....	101
Tab. 16	Répartition des souches bactériennes selon l'espèce.....	104
Tab.17	Effet d'association HE/ ATB sur les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	130
Tab.18	Résultat d'abattement de la MMAT et des <i>S. aureus</i>	136

Introduction

Résultats et discussions

I. Enquête ethnobotanique

En Algérie, douze espèces de thym colonisent le territoire, parmi elles, certaines sont aussi retrouvées en Afrique du nord. Les espèces : *Thymus ciliatus* Desf. et *Thymus numidicus* Poiret. sont largement répandues dans différentes régions du pays.

Ces dernières, faisant partie de notre patrimoine culturel, occupent une large place dans la pratique culinaire spécialement dans le Nord- Est-Algérien, et ont un large usage en médecine traditionnelle locale.

Notre enquête a été menée au près de 240 personnes choisies aléatoirement sans considération ni de leur situation sociale ni de leur niveau culturel. Le but est de souligner la véritable valeur culinaire portée au thym et le degré de son application dans la médecine traditionnelle.

1. Régions enquêtées

L'enquête ethnobotanique a couvert un vaste territoire qui s'étend sur quatre wilayas du Nord- Est- Algérien, caractérisées par l'abondance du thym et dont les populations partagent des traditions culturelles très similaires.

L'enquête a eu lieu dans les localités suivantes : Guelma, Héliopolis, Hammam Debeh, Annaba, Sidi Amar, Séraïdi, Berrahel, Souk Ahras, Taoura, Zaarouria, Machrouha et enfin la ville de Constantine.

2. Répartition des enquêtés selon le sexe

D'après la lecture des données récoltées dans notre enquête, les femmes constituent une proportion dominante de 79,57% de notre échantillon, alors que les hommes représentent 20,43% (Fig.12).

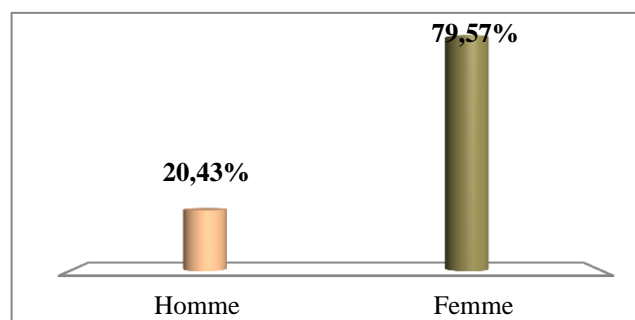


Figure 12. Répartition des enquêtés selon le sexe

Ceci est beaucoup plus dû au fait que les femmes sont plus disponibles que les hommes, mais aussi à leur réceptivité au questionnaire et à leur capacité de transmettre les informations d'une part, et au fait qu'elles sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel d'autre part.

NB : Beaucoup de fiches d'enquête ne nous ont pas été restituées.

3. Répartition des enquêtés selon l'âge

La population interrogée dans les différentes régions enquêtées, se répartit sur quatre tranches d'âge (Fig.13).

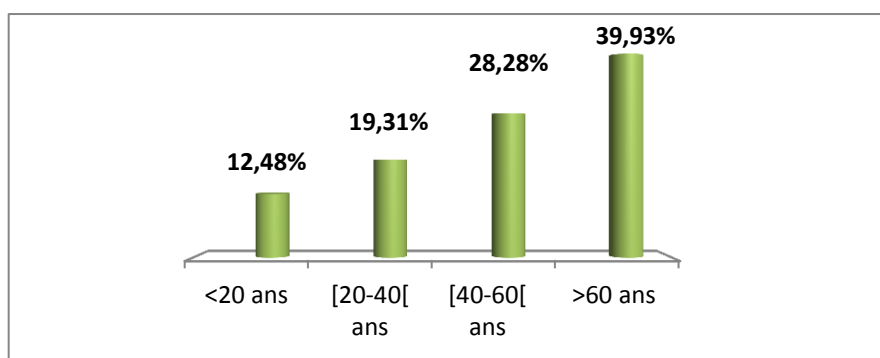


Figure 13. Répartition des enquêtés selon l'âge

Les personnes d'âge supérieur à 60 ans ont été les plus questionnées avec une proportion de 39,93%. Suivi de la tranche d'âge [40-60] ans, avec une proportion de 28,28%, puis la tranche d'âge [20-40] ans avec un pourcentage de 19,31%, et enfin la tranche des personnes les moins âgées (moins de 20 ans) avec une proportion réduite de 12,48%.

4. Connaissance du thym

Il est judicieux de noter que malgré la diversité des espèces de thym poussant dans les régions étudiées ainsi que sur les étalages des herboristes ; les enquêtés n'arrivent pas à distinguer les espèces entre elles. Pour les populations locales toutes les espèces prennent le nom général de « *Zaaitra* » (thym).

Malgré la réputation du thym comme plante aromatique très appréciée, son abondance et sa large répartition géographique, il ressort de notre enquête que sur les 240 personnes interrogées, 15 % des enquêtés ne connaissent pas le thym, contre 85% des enquêtés qui le connaissent bien (Fig.14).

Notons que, parmi les interrogés qui ne connaissent pas la plante, certains ont confondu entre le thym et l'origan (*Zâatar* et *Zaaitra*).

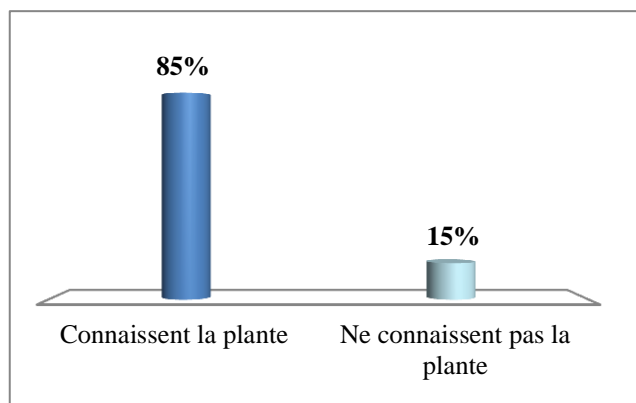


Figure 14. Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante

Notons que les personnes les plus âgées ont fourni plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale au sujet de l'usage des plantes en médecine traditionnelle. De cela, on peut déduire que les personnes âgées ont gardé toujours la notion des remèdes naturels, et semblent s'intéresser beaucoup plus à la phytothérapie. Les jeunes questionnés, par contre, semblent ne pas trop croire en cette médecine traditionnelle.

Les données ci-dessous ne concernent que la proportion des enquêtés connaissant le thym.

5. Répartition des enquêtés selon l'usage

Au total, sur les 204 enquêtés qui connaissent le thym (85% des enquêtés), 71% l'utilisent dans les différents remèdes naturels et en usage culinaire (Fig.15), du fait que cette plante est très appréciée et présente un grand intérêt dans les recettes de cuisine.

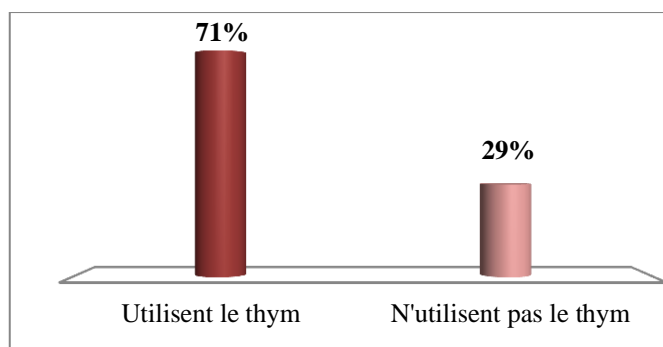


Figure 15. Répartition des enquêtés selon l'usage du thym

Notons que, parmi les enquêtés qui utilisent le thym, les femmes sont les plus dominantes avec un taux de 80%, ceci peut être expliqué par l'utilisation des plantes médicinales par les femmes dans d'autres domaines que la thérapie et par leur responsabilité en tant que mères, ce sont elles qui donnent les premiers soins en particulier pour leurs enfants, et que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapeutique traditionnel.

6. Répartition des enquêtés selon la source d'information

Vu le statut endémique du thym et ses vertus thérapeutiques expérimentées depuis longtemps (Valnet *et al.*, 1998 ; Blumenthal *et al.*, 2000 ; Barnes *et al.*, 2002) d'où leurs précieuses indications empiriques transmises de génération en génération ; la principale source d'information des enquêtés reste toujours les connaissances héritées de leurs ascendants familiaux avec un pourcentage dominant de 48%, ceci reflète l'importance de la transmission des pratiques traditionnelles d'une génération à l'autre (Fig.16).

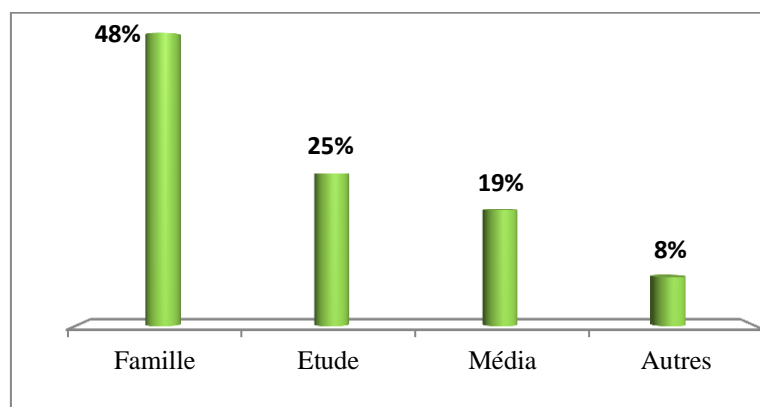


Figure 16. Répartition selon la source d'information

Les autres personnes recueillent leurs informations soit à travers des études et des ouvrages spécialisés avec un taux de 28%, soit par les médias avec un taux de 19%.

Enfin, 8% des enquêtés se réfèrent à d'autres sources telles que les herboristes ou bien en se basant sur leur propre expérience grâce à l'existence de nombreuses plantes médicinales dans leur entourage.

7. Répartition des résultats selon la source de la plante

Les résultats recueillis dans les quatre régions semblent être similaires concernant la source de la plante, on constate que 51% des enquêtés se procurent le thym dans son habitat naturel à l'état sauvage (Fig.17).

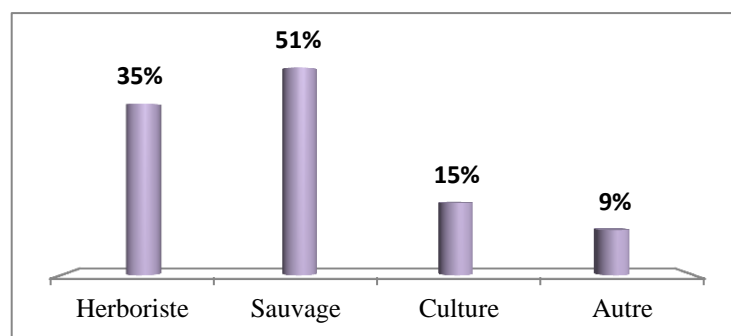


Figure 17. Répartition des enquêtés selon la source de la plante

Alors que 35% des interrogés se procurent le thym chez des herboristes, et 12% le cultivent en tant que plante aromatique très appréciée.

8. Répartition selon les parties utilisées

Parmi les différentes parties de la plante, les parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) sont les plus utilisées et plus précisément les feuilles et les tiges avec un taux de (64,1%), et seulement 35,9% des interrogés préfèrent utiliser la plante entière y compris les racines (Fig.18), ce dernier procédé contribue à la raréfaction et à long terme la disparition de ces espèces de thym.

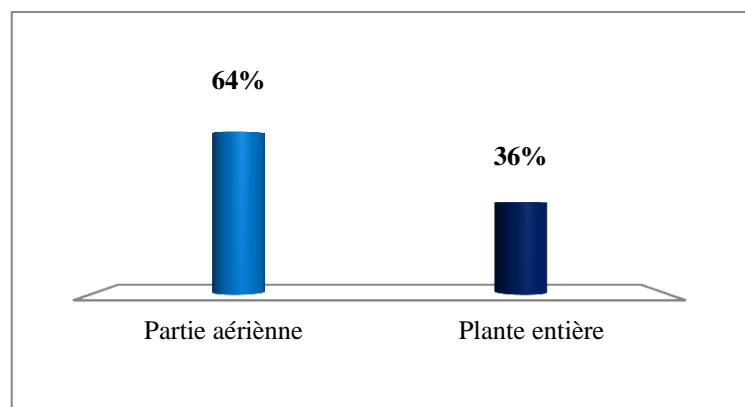


Figure 18. Répartition des enquêtés selon les parties utilisées

L'utilisation des organes végétaux varie selon les espèces, et la prédominance d'utilisation des feuilles de thym peut s'expliquer par le fait qu'elles soient le lieu de la majorité des réactions photochimiques et le réservoir de la matière organique qui en dérive (Chamouleau, 1979).

9. Répartition selon l'indication

On constate que la population locale utilise le thym dans le traitement curatif ou préventif de différentes pathologies (Fig.19).

Les pathologies digestives occupent la première place avec un pourcentage de (30,20%), et viennent en second lieu les pathologies infectieuses de gravité variable avec un taux de (27,40%), les pathologies respiratoires viennent en troisième position avec 25,30%, suivies des pathologies dermatologiques (10%) et d'autres pathologies (7,10%).

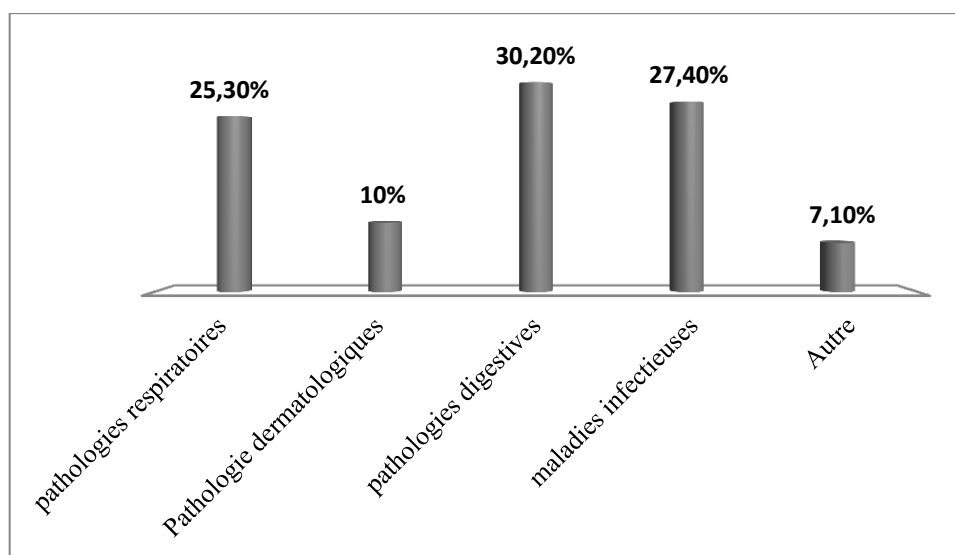


Figure 19. Répartition des enquêtés selon les indications

Le thym est présent dans toutes les pharmacopées mondiales et dans de nombreux médicaments, notamment pour la bouche ou la sphère ORL. Son action puissante est très utilisée afin de soulager les quintes de toux embarrassantes lors de certaines affections pulmonaires comme la bronchite aiguë. Il s'agit de l'une des plantes les plus recommandées à cette fin. Selon l'OMS le thym est reconnu pour de nombreuses finalités.

10. Répartition selon le mode de préparation

La préparation des remèdes est différente selon les principes actifs ciblés, l'infusion, la macération et la décoction constituent les principaux modes de préparation des drogues végétales dans la thérapeutique traditionnelle.

De notre enquête, il ressort que le mode de préparation le plus couramment utilisé par les enquêtés est la décoction avec (60,30%), alors que les autres modes de préparation utilisés sont la tisane (24,20%), la macération (5,5%) et enfin, on constate d'autres modes de préparation avec un pourcentage de 10% (Fig.20).

A partir des résultats obtenus, on peut déduire que le mode de préparation « décoction » utilisé par la majorité des populations n'est pas adéquat.

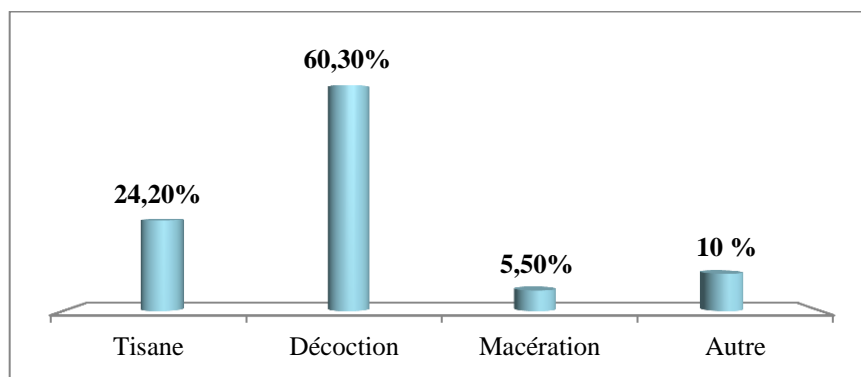


Figure 20. Répartition des enquêtés selon le mode de préparation

En effet, le criblage chimique des feuilles de thym a permis de déceler la richesse du thym en Terpènes et en Flavonoïdes (Kouch *et al.*, 2015). Ces substances sont dotées de certaines activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques, antitumorales, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, hypotensives et diurétiques (Burt, 2004 ; Valnet, 2005 ; Haddouchi, 2008 ; George *et al.*, 2009 ; Astani *et al.*, 2011 ; Silva *et al.*, 2011).

L'infusion convient mieux à l'extraction de ces principes actifs très sensibles à la chaleur puisqu'ils sont volatiles ou thermolabiles comme les huiles essentielles (Baba-Aissa, 2000; Kraft et Hobbs, 2004).

11. Quelques recettes d'utilisation du thym

De notre enquête, il ressort que la population enquêtée dans les quatre régions, utilise les feuilles et les tiges en infusion et/ou en décoction dans différentes pathologies:

- Calmer les quintes de toux, notamment dans les affections de type coqueluche, bronchite et le rhume des foins.
- Soulager les inflammations de la sphère bucco-pharyngée, caries, soins dentaires et diminuer les sécrétions nasales ou rhinorrhées.
- Soulager les dérèglements intestinaux tels que diarrhée. Aussi il est mis à profit dans le traitement des mycoses, des plaies et de l'herpès.

Par ailleurs, les fleurs de thym sont utilisées en macération comme produit de beauté tonique, connu pour son eau qui resserre les pores de la peau.

Son huile essentielle diffuse dans une huile végétale est indiquée contre la fatigue et conseillée pour masser le dos et la plante des pieds.

II. Zones d'échantillonnages

Les zones d'échantillonnage choisies en se basant sur les conseils et orientations des habitants autochtones et des herboristes. Elles comptent parmi les régions algériennes qui se singularisent par un climat méditerranéen et par une grande diversité de reliefs (forêts, plaines, bassins versants) favorisant une diversité floristique particulière (Quezal *et al.*, 1963). Il s'agit des zones montagneuses colonisées par des populations rurales, utilisant les plantes médicinales dans le domaine culinaire, phyto-thérapeutique, cosmétique, et fourrager. On distingue : Taoura (Souk Ahras), Djebel El Ouahch (Constantine), Djebel Maouna (Guelma) et Berrahel (Annaba).

1. Coordonnées

La position géographique, et l'altitude de l'environnement où pousse la plante considérée, sont des facteurs extrinsèques qui influencent le rendement en huiles essentielles d'une part, ainsi que leur aspect quantitatif et qualitatif (Olle et Bender, 2010).

Les positions géographiques des zones sous-citées sont représentées comme suit (Google Earth):

- Taoura : est située au Sud - Est - à 20 Km de la wilaya de Souk Ahras, à une Latitude de 36°08'39.36"N et une Longitude de 8° 2' 36.82"E, et à une altitude de 850m.
- Djebel Maouna : La forêt de la Mahouna est située au sud de la ville de Guelma, à une Latitude de 36°22'19.25" N et une Longitude de 7° 23' 06.70"E. C'est une forêt de montagne à relief accentué avec une altitude de 1080m.
- Djebel el Ouahch : est située au nord-est de la wilaya de Constantine à une Latitude de 36° 22'59' 82"N et une Longitude de 6°47'10.09"E, et à environ 7Km de la ville, le site s'étend sur une superficie de 45.54 ha et culmine à 1110m d'altitude.
- Berrahel : est située dans la wilaya d'Annaba à l'extrême Est algérien à une Latitude de 36°50'07"N et une Longitude de 7°27'11"E et à une altitude par rapport au niveau de la mer égale à 30m.

2. Aspect climatique

Les conditions environnementales, tels que, le climat, la température, la quantité de lumière et la pluviométrie, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante, conditionnent non seulement le rendement mais aussi la qualité de ses extraits (Bruneton, 1999; Benini, 2007).

Ainsi, la température joue un rôle déterminant dans l'étude de l'évaporation et de l'évapotranspiration qui intervient dans le développement du rythme biologique des végétaux (Benini, 2007).

Les différents types de climats qui caractérisent nos zones d'échantillonnage sont :

- Région de Taoura : se détermine par un climat méditerranéen au nord et continental à l'extrême sud, semi- humide avec un été chaud et un hiver froid et humide (classification de Köppen : Csa).
- Région de Djebel Maouna : se caractérise par un climat sub - humide au centre et au nord et semi-aride vers le Sud. Ce climat est doux et pluvieux en hiver (450 à 600 mm/an), et chaud en été. (Emberger 1986).
- Région de Djebel El-Ouahch : le climat est continental et se distingue par des hivers rigoureux très froids et des étés plus chauds (Beniston, 1984).
- Région de Berrahel : bénéficie d'un climat méditerranéen. Elle est connue par ses longs étés chauds et secs. Les hivers sont doux et humides, la neige est rare mais pas impossible. Les pluies sont abondantes et peuvent être diluviennes. Il fait généralement chaud surtout de la mi-juillet à la mi-août (Weather Stastics, 2011).

3. Aperçu pédologique

La composition du sol, la rétention de l'humidité, la fertilité, le pH, conditionnent le développement des espèces botaniques et assurent une activité physiologique et biologique optimum, ainsi, les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Mohammad *et al.*, 2009 ; Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

Les différents types de sols de chaque région où la plante est récoltée sont représentés comme suit (Bazin et Gaudin, 2004):

- La position géographique de Taoura, nous oriente vers l'axe du grand synclinal Taoura-Merahna. Il s'agit des niveaux argilo-gréseux du Miocène inférieur sur des formations marnes et marno-calcaires du Crétacé. Ces formations nous donnent un sol riche en silice, argile et des carbonates.
- Djebel Maouna fait partie de la formation géologique appelé en Afrique du nord la nappe numidienne, c'est une série argilo-gréseuse très puissante. Dans cette région elle dépasse les 500 mètres d'épaisseur.
Elle donne généralement un sol très riche en silice et en aluminium (SiO_2 et Al_2O_3). On rencontre parfois des nodules de fer (Fe).
- Djebel Ouahch est identique à celui de la Maouna sauf du tracé de l'Autoroute et les tunnels. On descend vers le centre ville de Constantine nous rencontrons les formations géologiques du néritique. Il s'agit d'une formation géologique à dominante carbonatée en alternance avec des niveaux marneux.
Le sol de ces formations est très riche en bicarbonates de calcium (calcaires) et de Magnésium (la dolomie).
- La région de Berrahel est caractérisée par des formations géologiques du Mio-Plio-Quaternaire, présentant des niveaux argilo-gréseux et calcaires. Le type de sol est argileux, non salé pauvre en matière organique et très fertile.

III. Matériel végétal

1. Etude descriptive

D'après la description botanique des différents thyms récoltés, nous avons pu identifier au niveau du laboratoire de Botanique médicale de la Faculté de médecine, de l'Université Badji Mokhtar d'Annaba, deux espèces : *Thymus ciliatus* Desf. (Benth.) et *Thymus numidicus* Poiret.



Figure 21. *Thymus numidicus* (HENI,

2. Description anatomique



Figure 22. *Thymus ciliatus* (HENI, 2012)

Les coupes histologiques réalisées sur les tiges et les feuilles des deux espèces étudiées, *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* nous ont permis l'observation des structures représentées dans les photographies qui suivent.

2.1. Feuille

La coupe transversale des feuilles de *T. ciliatus* et *T. numidicus* présente :

- 1- Une nervure principale, formée essentiellement par un faisceau cribro-vasculaire,
- 2- Un Mésophylle hétérogène composé d'un parenchyme palissadique ou chlorophyllien sur la face supérieure, siège de la photosynthèse, et d'un parenchyme lacuneux ou aérénchyme sur la face inférieure, siège des échanges gazeux.

La structure de la feuille présente des adaptations à la sécheresse leur permettant de réduire leur transpiration (Feuilles velues à limbe enroulé par-dessous ; stomates enfoncés).

Les épidermes supérieur et inférieur sont pourvus de poils épidermiques de deux types :

Les poils tecteurs : ils sont unicellulaires unisériés, ils jouent un rôle de protection car ils servent à limiter les pertes en eau par transpiration.

Les poils sécréteurs : ils sont très abondants, ils accumulent dans leurs cytoplasmes des essences, souvent sécrétées sous la cuticule (Fig. 27).

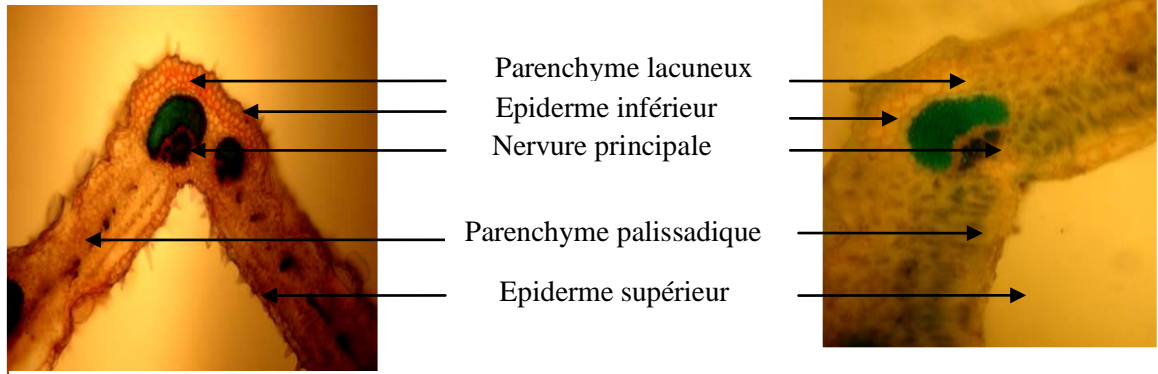


Figure 23. Coupe transversale d'une feuille de *T. ciliatus* (M.O : Gx10)

Figure 24. Coupe transversale d'une feuille de *T. numidicus* (M.O : Gx10)



Figure 25. Crypte d'une feuille de *T. ciliatus* (M.O :Gx40)



Figure 26. Crypte d'une feuille de *T. numidicus* (M.O :Gx40)

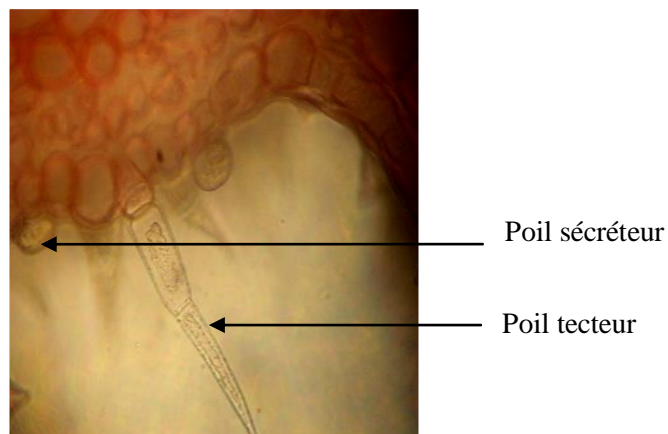


Figure 27. Poil sécréteur et poil tecteur d'une feuille de *T. ciliatus* (M.O :Gx40)

Planche 01. Structures anatomiques des feuilles de *T. ciliatus* et *T. numidicus* (photos, HENI)

2.2. Tige

Les coupes transversales réalisées sur les tiges de *T. ciliatus* et *T. numidicus* ont montré:

- La présence de formations secondaires caractéristique d'une tige dicotylédone âgée.
- On note également la présence des ilots de collenchyme aux quatre angles de la tige, ce qui lui donne l'aspect quadrangulaire caractéristique des Lamiacées.

Le collenchyme est constitué de cellules vivantes avec leur paroi pectocellulosique, épaisse, fusiformes à ponctuation simples qui contribuent à la solidité mécanique de la tige.

- La présence du parenchyme médullaire au centre de la tige et qui se résorbe avec le temps.
- La présence du parenchyme cortical, délimité par l'épiderme et constitué par une couche unique de cellules recouvertes d'une cuticule plus au moins épaisse conférant aux cellules leur imperméabilité.
- La coupe nous laisse découvrir d'autres caractéristiques des Lamiacées qui se manifestent par la présence de cryptes et de cystolithes. On note aussi la présence de poils tecteurs: unicellulaires, unisériés et de poils sécréteurs de type glandulaire (Fig. 30 et 31).

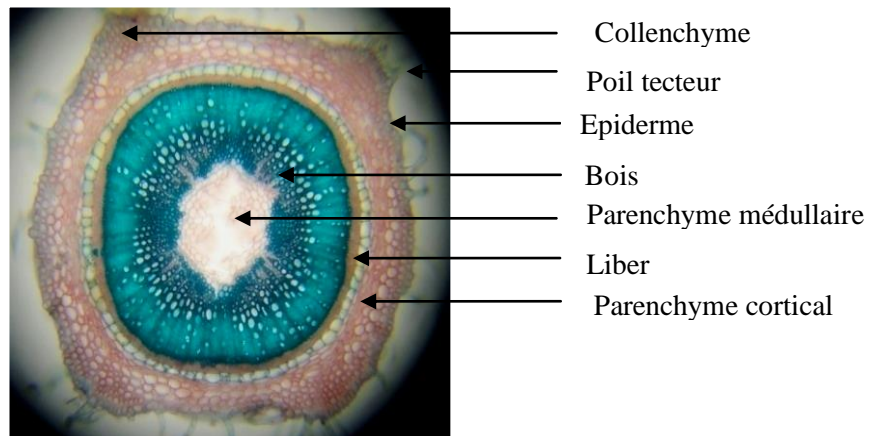


Figure 28. Structure secondaire d'une tige de *T. ciliatus* (M.O : Gx10)

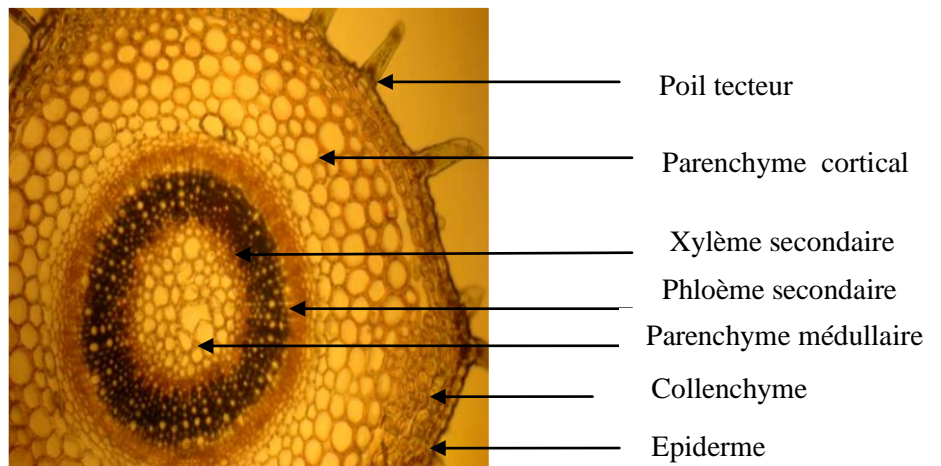


Figure 29. Structure secondaire d'une tige de *T. numidicus* (M.O : Gx10)

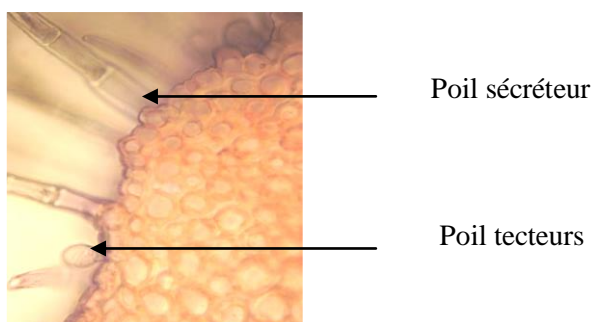


Figure 30. Poil sécréteur et poil tecteur d'une tige de *T. ciliatus* (M.O :Gx40)



Figure 31. Poil sécréteur et poil tecteur d'une tige de *T. numidicus* (M.O :Gx40)

Planche 02. Structure anatomique des tiges de *T. ciliatus* et *T. numidicus* (photos, HENI. S.)

En somme les caractéristiques anatomiques de ces deux espèces de thym dénotent une grande tolérance et une bonne adaptation au climat méditerranéen à longue saison sèche. Nous notons aussi qu'il n'ya pas une grande différence entre les structures anatomiques des deux espèces, sauf l'abondance des cils qui caractérisent les feuilles de *Thymus ciliatus* d'où l'appellation « *ciliatus* » octroyée à l'espèce.

IV. Huiles essentielles

1. Extraction et rendement en huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes par hydrodistillation a donné des rendements moyens allant de 1.9% à 2.9%. (Tab. 4).

Tableau 4. Rendement moyen en huiles essentielles extraites.

Huiles essentielles	<i>T. ciliatus</i> (Ta)	<i>T. ciliatus</i> (Ma)	<i>T. numidicus</i> (Ou)	<i>T. numidicus</i> (Br)
Rendement(%)	2,2%	2,9%	1,9%	2,1%

(Ta) : Taoura ; (Ma) : Djebel Maouna ; (Ou) : Djebel el Ouahch ; (Br) : Berrahel

T. ciliatus : *Thymus ciliatus* ; *T. numidicus* : *Thymus numidicus*

Il ressort aussi que les rendements moyens en **HE** des espèces de *T. ciliatus* récoltées dans les régions de Taoura et de djebel Maouna sont de l'ordre de 2.2% et 2.9% respectivement. Ces productivités sont légèrement inférieures à celui de Djebel el Edough - Annaba (3,2%) (Amrouni *et al.*, 2014), et meilleurs que celui du moyen Atlas-Maroc (1,9%) (Amarti *et al.*, 2010).

Les rendements en **HEs** de *T. numidicus*, récoltés dans les régions de djebel el Ouahch et de Berrahel, sont de l'ordre de 1,9% et 2,1% respectivement. Ces résultats sont comparables aux travaux rapportés par Kouch *et al.* (2015), sur la même espèce, du même biotope (Berrahel). La même constatation est faite par Kabouch et ses collaborateurs (2005), ayant obtenu un rendement de 1,2% pour la même espèce récoltée à djebel el Ouahch en période de floraison.

D'autres résultats rapportés par Ghorab et ses collaborateurs (2014), sur l'**HE** de *T. numidicus* de la région d'Azzazga (Kabylie) qui a généré un rendement moyen de 2,4%.

Ces variations dans le rendement peuvent être attribuées à plusieurs facteurs en même temps d'une part à la drogue utilisée, mais aussi aux facteurs climatiques et environnementaux, à l'intensité du métabolisme de plante, son espèce, l'âge et la période de la cueillette. Non moins important est la situation géographique (Bennadja *et al.*, 2013).

V. Etude analytique des huiles essentielles extraites

1. Propriétés organoleptiques

Les propriétés organoleptiques des quatre huiles essentielles de *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* récoltés dans les régions sus - citées, sont résumés dans le tableau 5.

En général, les huiles essentielles de *T. ciliatus* de Taoura, de Maouna et celui de *T. numidicus* de Berrahel possèdent les mêmes caractéristiques organoleptiques.

Tableau 5. Caractéristiques organoleptiques des quatre HEs.

Huile essentielle	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	Liquide mobile limpide	Jaune clair	Agréable	Piquante
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	Liquide mobile limpide	Jaune rougeâtre	Très forte	Fortement piquante
<i>T.numidicus</i> (Ou)	Liquide	Jaune pâle à jaune orangé	Agréable parfumée	Douce
<i>T.numidicus</i> (Br)	Liquide mobile limpide	Jaune	Forte	Fortement piquante

Par contre, l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch se distingue par une saveur douce et un aspect uniquement liquide.

2. Propriétés physicochimiques

2.1. Propriétés physiques

2.1.1. Densité relative

La densité d'une HE est un critère de qualité dans le domaine de la cosmétique, pharmacie, agroalimentaire etc..(AFNOR 2000). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit révélant les tentatives de fraudes et d'altération. Les valeurs obtenues des densités de nos HEs rapportées dans le tableau 7 varient de 0,880 à 0,928.

Tableau 6. Valeurs des densités des HEs.

Huiles essentielles	Densités obtenus	(NF T 75 - 111)
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	0,925	[0,894 – 0,930]
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	0,928	
<i>T. numidicus</i> (Ou)	0,900	
<i>T. numidicus</i> (Br)	0,880	

Elles sont comparables aux valeurs des normes françaises de densité du thym (Norme NF T 75 - 111).

2.1.2. Indice de réfraction

Les valeurs d'indice de réfraction des huiles essentielles de *T. ciliatus* de Taoura et de Maouna sont semblables et sont de 1,5015. Cependant, celles des **HEs** de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch et de Berrahel sont comprises entre 1,4830 et 1,4990 (Tab. 7).

Tableau 7. Valeurs obtenues des indices de réfraction.

Huiles essentielles	Valeurs d'IR obtenues	(NF T 75 – 112)
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	1,5015	
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	1,5015	[1,4830 à 1,5100]
<i>T. numidicus</i> (Ou)	1,4830	
<i>T. numidicus</i> (Br)	1,4990	

De cela, on peut déduire que les valeurs d'indice d'ester dépendent des espèces et pas des régions.

L'indice de réfraction est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité des **HEs** à réfléchir la lumière. Les valeurs de l'indice de réfraction de nos échantillons correspondent aux normes (NF T 75 – 112). Elles indiquent leur faible réfraction à la lumière.

2.1.3. Miscibilité à l'éthanol

La miscibilité à l'éthanol des **HEs** de *T. ciliatus* de Taoura et de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch et de Berrahel est d'un volume d'huile essentielle pour deux volumes d'éthanol (1v/2v) (Tab.8).

Tableau 8. Valeurs obtenues de la miscibilité des **HEs** à l'éthanol.

Huiles essentielles	Miscibilité à l'éthanol	(Norme AFNOR, 2010)
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	(2v/1v)	[2v/1v/ 3v/1v]
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	(3v/1v)	
<i>T. numidicus</i> (Ou)	(2v/1v)	
<i>T. numidicus</i> (Br)	(2v/1v)	

Cependant elle est d'un volume pour trois volumes pour l'espèce *T. ciliatus* de Djebel Maouna.

Donc les **HEs** des espèces de *T. ciliatus* de Taoura, de *T. numidicus* de djebel el Ouahch et celui de Berrahel sont plus miscibles que l'espèce de *T. ciliatus* récolté à djebel Maouna. Ces variations sont dues probablement à leur densité.

Les miscibilités à l'éthanol des huiles essentielles des espèces *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* présentent des valeurs identiques à ceux de la norme AFNOR (2v/1v, 3v/1v).

2.2. Propriétés chimiques

2.2.1. Indice d'Acide (IA)

Selon les normes Afnor l'IA varie de [4,1 – 5,2]. Nos **HEs** du thym, laissent apparaître des valeurs différentes variant dans un intervalle beaucoup plus large allant de 2,5 à 5,1 (Tab.9).

Tableau 9. Valeurs d'indices d'Acide des **HEs**.

Huiles essentielles	Indice d'Acide (IA)	(Norme AFNOR, 2010)
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	4,2	[4,1 – 5,2]
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	5,1	
<i>T. numidicus</i> (Ou)	2,5	
<i>T. numidicus</i> (Br)	3,4	

L'**HE** de *T. numidicus* se distingue par un indice d'acide plus bas variant de 2,5 à 3,4. Cependant, l'**HE** qui s'est avérée la plus acide est celle de *T. ciliatus* poussant à djebel Maouna, et celui le moins acide est celui de *T. numidicus* de djebel el Ouahch.

2.2.2. Indice d'Ester (IE)

Les valeurs d'indice d'Ester de nos extraits sont comprises entre 50,515 et 51,825 (Tab.10)

Tableau 10. Valeurs d'Indice d'Ester des **HEs**.

Huiles essentielles	Indice d'Ester (IE)	(Norme AFNOR, 2000)
<i>T. ciliatus</i> (Ta)	51,825	[49,5 – 52,55]
<i>T. ciliatus</i> (Ma)	50,765	
<i>T. numidicus</i> (Ou)	50,515	
<i>T. numidicus</i> (Br)	51,825	

Celles des **HEs** de *T. ciliatus* de Maouna et *T. numidicus* de Djebel el Ouahch sont un peu plus bas (50,765 et 50,515). Les valeurs d'IE obtenues rentrent dans l'intervalle de la norme AFNOR.

Les résultats indiquent que les paramètres physico chimique des échantillons analysés oscillent dans des intervalles comparables aux normes européennes. Ces paramètres diffèrent suivant l'origine de l'HE de thym. Ainsi, une huile de France n'aura pas les mêmes valeurs de paramètres qu'une huile d'Algérie, du Turque de l'Espagne

Nos valeurs obtenues, sont celles concernant exclusivement les deux espèces de *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* des régions sus- citées. Tous ces paramètres étant influencées par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes, il est logique que leurs valeurs diffèrent d'un endroit à l'autre du globe (Juiliani *et al.*, 2006) ; cela fait partie de la complexité de la notion de chémotype.

3. Composition chimique des huiles essentielles extraites

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) des quatre échantillons d'HEs de thym considérés, a permis d'identifier à plus de 98% les éléments constitutants

3.1. L'huile essentielle de *Thymus ciliatus* de Taoura et de Djebel Maouna

Ainsi, L'analyse chimique de l'HE de *Thymus ciliatus* de Taoura (Souk Ahras), a permis l'identification de 24 composés qui représentent environ 99,87% de cette essence (Tab. 11).

Tableau 11. Composition chimique de l'HE de *Thymus ciliatus* de Taoura.

TR	Composés	Teneur en %
6.38	α -Thujène	0.23
6.56	1R- α -pinène	0.93
7.80	1-octène-3-ol	0.78
8.12	α -pinène	0.45
8.79	α - Phellandrene	0.08
8.79	β - thugène	0.01
8.99	α - terpinolène	1.00
9.30	p – cymene	12.25
9.41	Limonène	0.51
10.51	γ-terpinène	4.42
10.87	3-carène	0.28
12.14	Pseudo-Limonène	5.10
15.33	5-isopropyl-2-methylbicyclo[3.1]hexan-2-ol	0.23
17.74	Thymol methyl ether	0.93
18.45	Thymoquinone	0.60
20.54	Thymol	67.78
20.82	Carvacrol	2.70

23.73	α -Cubebène	0.007
24.11	β -bourbonène	0.02
25.55	Caryophyllène	0.92
27.87	5-Muuroène	0.06
29.74	Δ -Cadinène	0.13
29.37	Epi-Bcyclo sesqui phellandrène	0.03
31.26	2,5-Dimethoxyethylbenzène	0.43
TOTAL		99,87%

TR : temps de rétention

Il ressort de cette analyse que le thymol est l'élément dominant avec plus de 67 %. Non moins importante est la part du *p*-cymène (12.25%) (Fig.32).

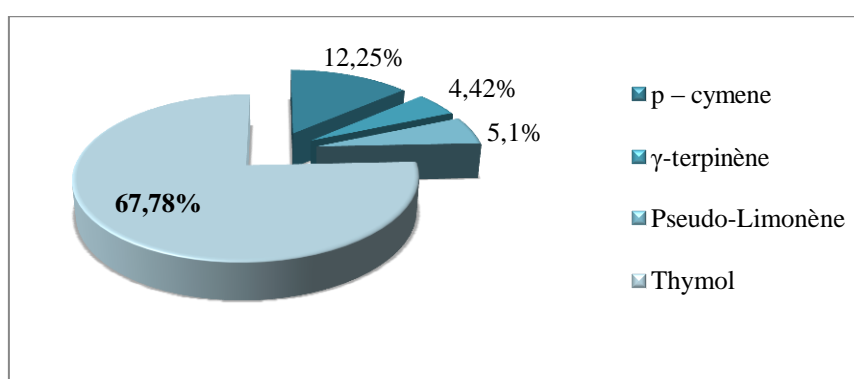


Figure 32. Composants majoritaires de l'HE de *T. ciliatus* de Taoura

On retrouve par ailleurs d'autres constituants à des teneurs relativement moindres tels est le cas du pseudo-Limonène (5.10%), du γ -terpinène (4.42%) et du Carvacrol (2,70%). Ces six composés à eux seuls totalisent plus de 92% du total de cette essence.

Pour ce qui est de l'EH de *Thymus ciliatus* récolté à Djebel Maouna (Guelma), elle renferme 39 composés identifiées ainsi à environ 98,87% (Tab. 12).

Tableau 12. Composition chimique de l'HE de *Thymus ciliatus* de la Maouna.

<i>TR</i>	<i>Composés</i>	<i>Teneur en %</i>	<i>TR</i>	<i>Composés</i>	<i>Teneur en %</i>
4,5	3-heptanone	0,01	12,81	Terpinène-4-ol	0,82
5,4	α - thujène	0,58	13,06	α -terpineol	0,20
5,6	1R- α - pinène	1,02	13,94	Cyclohexasone	0,10
5,8	β -thujène	0,02	14,16	Méthyle éthyle éther	3,14
6,02	Camphene	0,06	14,62	Carvacrol	58,63
6,72	1-octène-3-ol	1,11	17,30	Thymol	0,14
6,83	3-Octanone	0,13	17,42	3-methyl-5-isopropyl phenyl	6,17
6,91	β - myrcene	0,78	17,60	Isoeugenol	0,04
7,15	3-Octanol	0,22	18,53	α -Cubebène	0,08
7,74	α -phellandrene	0,16	18,78	β -Bourbonène	0,12
7,52	3- Carene	6,85	19,67	Caryophyllène	1,74
7,76	4- Carene	1,17	20,93	2-isopropyl-5-méthyle-9-méthylène	0,10
8,06	p-cymene	7,19	21,20	α -Caryophyllène	0,80
8,14	D-Limonène	0,37	22,02	Δ -Cadinène	0,58
8,20	β -phellandrene	0,19	22,58	Epi-bicyclo sesequi phellandrene	0,10
8,28	Eucalyptol	0,09	22,80	β - bisabolène	0,49
9,02	γ - terpinène	3,78	23,58	β - sesequi phellandrene	0,20
9,68	1-Nonene -3-ol	0,15	23,77	Acétophénone	0,31
10,53	Cis-verbenol	0,06	24,05	Cis γ -Cadinène	0,06
12,40	Borneol	0,29		<i>NI</i>	1,54
TOTAL				98,87	

TR : temps de rétention

C'est l'huile la plus riche où le Carvacrol représente plus de la moitié des composés (58,63%). (Fig.33).

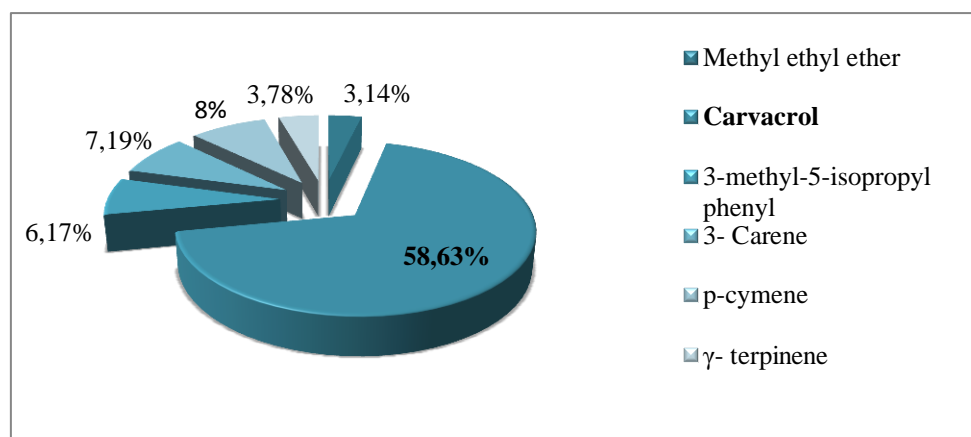


Figure 33. Composants majoritaires de l'HE de *T. ciliatus* de Djebel Maouna

De plus les éléments majoritaires contribuent au mélange à concurrence de 85,76%. On y retrouve d'autres composés à des teneurs moins importantes : le p-cymène (7,19%) ; le 3- Carene (6,85%) ; le 3-méthyle-5-isopropyl phényle (6,17%) et enfin le γ - terpinène (3,78%) et le méthyle éthyle éther (3,14%).

D'autres études effectuées au niveau de notre laboratoire sur la même espèce récoltée dans la localité de l'Edough (Annaba) ont montré que l'HE extraite est dominée par le Thymol (57,66%), le carvacrol (16,19%) ainsi que l'O-cymène (12,04%) et le γ - terpinène (6,42%) (Amrouni *et al.*, 2014).

L'HE de la même espèce issue d'Ain M'Lila (Est de l'Algérie) analysée par Ghorab et ses collaborateurs a montrés une composition dominée par le thymol (54,98%) suivi de γ - terpinène (11,33%) et de p- cymène (6,66%). Le Carvacrol ne représente qu'une faible quantité (4,96%) (Ghorab *et al.*, 2013). En revanche, le Carvacrol (72,4- 80,3%) est le constituant principal de l'HE de huit provenances de *T. ciliatus* de la région de Tlemcen (Bousmaha *et al.*, 2007).

L'HE de *T. ciliatus* de l'Algérie est caractérisée par une grande variabilité dans sa composition chimique, celle du Maroc montre également une grande diversité en ce qui concerne les composés majoritaires de cette essence. Tel les résultats d'El Ajjouri et ses collaborateurs (2010) qui ont montré que l'HE de *T. ciliatus* récolté dans la région d'Azrou (Moyen Atlas du Maroc) est constitué principalement de thymol (44,20%), de β -O-cymène (25,80%) et d' α - terpinène (12,30%), où le carvacrol n'existe qu'en faible pourcentage (2,40%). La teneur et la nature des composés majoritaires varient considérablement d'un échantillon à l'autre en fonction du biotope où pousse la plante et des conditions environnementales et climatiques.

3.2. L'huile essentielle de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch et de Berrahel

Concernant l'HE de *T. numidicus* provenant de Djebel el Ouahch (Constantine), nous avons pu identifier 24 constituants, qui représentent 98,26% (Tab.13).

Tableau 13. Composition chimique de l'HE de *Thymus numidicus* de Djebel el Ouahch.

<i>TR</i>	<i>Composés</i>	<i>Teneur en %</i>
5,35	α - pinène	0,29
5,43	α - thujène	1,02
5,66	1R- α - pinène	3,30
6,06	Camphene	1,02
6,60	β -thujène	1,34
6,76	β – pinène	0,47
6,99	β- phellandrene	5,08
7,49	α - phellandrene	0,24
7,80	Cyclohexene methyl	1,92
8,09	p- cymene	7,31
8,20	Limonene	2,79
9,05	γ- terpinène	9,71
9,88	α - terpinolène	1,13
10,72	Linalol	35,47
10,75	Hotrienol	0,51
11,34	Linalyl propionate	0,83
12,08	Comphore	0,54
13,01	Borneol	2,70
13,30	Terpinène-4-ol	11,94
13,70	γ - terpineol	2,30
13,75	Spirohexane-4-one, 5,5 dimethyl	0,73
14,94	Thymol methyl ether	0,19
16,81	Thymol	2,93
20,93	Caryophyllene	1,64
	<i>NI</i>	2,86
	TOTAL	98,26%

Cette essence est composée principalement de Linalol qui représente (35,47%) de la composition chimique totale (Fig.34).

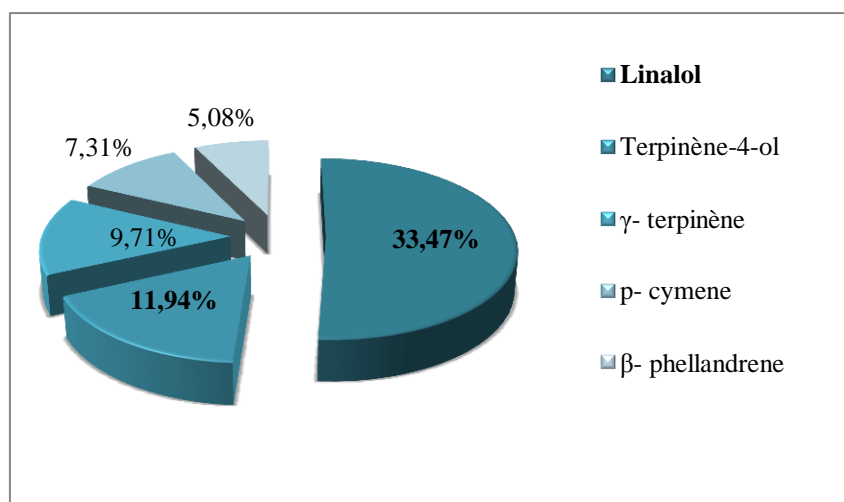


Figure 34. Composants majoritaires de l'HE de *T. numidicus* de Djebel El- Ouahch

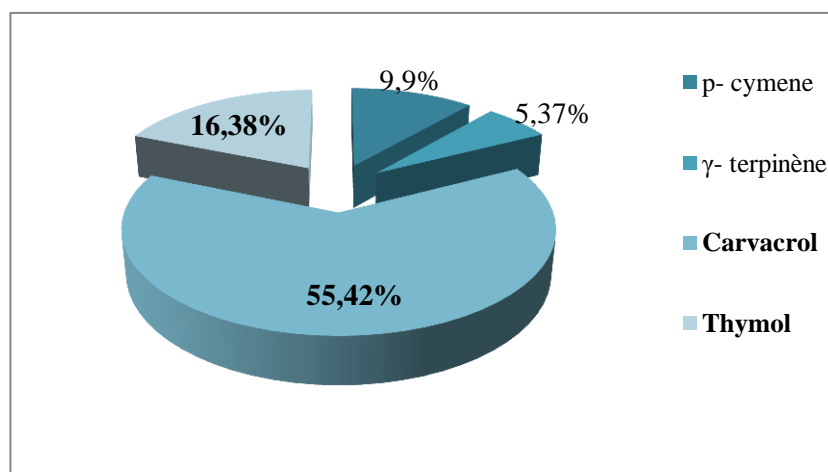
Cependant, des composés sont présents à des teneurs relativement moyenne, le Terpinène-4-ol avec (11,94%), le γ -terpinène (9,71%), le p-cymène (7,31%), le β -phellandrene (5,08%), et d'autres sont présents à de faibles quantités tels que le thymol (2,93%), le limonène (2,79%), le borneol (2,70%) et le γ -terpineol (2,30%) avec une absence totale du Carvacrol.

Ainsi, l'essence de *Thymus numidicus* de Berrahel est composée de 18 éléments qui représentent environ 98,62% de l'huile totale (Tab. 14).

Tableau 14. Composition chimique de l'HE de *Thymus numidicus* de Berrahel.

<i>TR</i>	<i>Composés</i>	<i>Teneur en %</i>
5,42	α -thujène	0,67
5,44	1R- α -pinène	1,65
6,65	1-octen-3-ol	1,03
6,93	β -pinène	0,71
7,48	α -phéllandrène	0,17
7,80	3-Carène	1,58
8,11	<i>p-cymène</i>	9,90
8,18	D-Limonène	0,44
8,24	β - phéllandrène	0,19
9,07	γ -terpinène	5,37
10,36	Exo-borneol	1,24
17,29	Carvacrol	55,42
17,51	Thymol	16,38
20,93	Diethoxymethyl	0,42
21,73	2,5-di-t-butyl hydroquinone	0,11
22,61	β -Cadinène	0,60
23,79	Σ -Cadinène	0,56
24,55	α -Caryophyllène	0,18
	TOTAL	98,62%

L'analyse chimique montre que cette huile est composée essentiellement de carvacrol (55,42%) et de thymol (16,38%) (Fig.35).

**Figure 35.** Composants majoritaires de l'HE de *T. numidicus* de Berrahel

Ainsi, les composés minoritaires sont représentés par le *p*-cymène (9,90%) et le γ -terpinène (5,37%).

Une autre étude réalisée par Kouch et ses collaborateurs (2015), sur l'**HE** de la même espèce *T. numidicus* poussant dans le même biotope (Berrahel), présente qualitativement le même profil chimique avec le thymol (77,5%) comme élément majoritaire, et les autres constituants importants tels que le *p*-cymène (10,10%), le γ -terpinène (6,38%) et le β -pinène (3,16%), le carvacrol quant à lui est à l'état de traces (0,17%). Cependant, une autre étude relativement similaire réalisée par Ghorab et ses collaborateurs (2014) sur la même espèce poussant aussi dans le même biotope Djebel el Ouahch (Constantine) a montré que son **HE** est composée de Linalol (11,5%), de thymol (68,20%) et de carvacrol (16,90%). Et une autre effectuée par les mêmes auteurs sur la même espèce de la Kabylie a montré une **HE** exempt de thymol, et semble être de chémotype carvacrol/*p*-cymène.

Thymus numidicus espèce endémique, les études de sa composition chimique dans son aire de répartition en Algérie montre que c'est une essence à thymol – carvacrol, dont les teneurs de ces derniers varient d'une station à l'autre, en fonction de la période de récolte.

Outre, l'absence de certains composants, on note la présence de leurs précurseurs, on peut donc déduire leur formation ultérieure au cours du cycle végétatif, on constate notamment la présence du carvacrol à l'état de traces mais aussi la présence du *p*-cymène qui en est le précurseur (Burt *et al.*, 2007).

Ceci montre que ces essences sont caractérisées par un polymorphisme chimique très important, qui se manifeste d'une région à l'autre et sous l'action de différents facteurs.

3.3. Les classes biochimiques des HEs extraites

Les composants chimiques des **HEs** des espèces du genre *Thymus* étudiées se répartissent sur sept classes biochimiques fondamentales.

Les thyms récoltés dans les régions de Taoura, de la Maouna et de Berrahel indépendamment de l'espèce, se caractérisent principalement par les phénols monoterpéniques et les hydrocarbures monoterpéniques. On y retrouve des phénols

monoterpéniques avec plus de 58%, des hydrocarbures monoterpéniques (plus de 20%) et une absence totale d'esters (Tab. 15).

Par contre, l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch est la seule à se caractériser par la présence d'alcools monoterpéniques (33,7%), d'hydrocarbures sesquiterpéniques (52,92%) (52,92%) et des Esters (0,83%).

Tableau 15. Classes biochimiques des HEs de *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* récoltés.

Classes Biochimiques	<i>T. ciliatus</i> (Ta)	<i>T. ciliatus</i> (Ma)	<i>T.numidicus</i> (Ou)	<i>T.numidicus</i> (Br)
Phénols Monoterpéniques	70,48	58,77	2,93	71,80
Hydrocarbures monoterpéniques	25,50	23,31	33,70	21,84
Hydrocarbures sesquiterpéniques	0,92	2,31	1,64	0,18
Alcools monoterpéniques	0,78	2,98	52,92	2,27
Cétones monoterpéniques	0,60	0,55	1,27	0,11
Esters	-	-	0,83	-
Ethers	1,59	9,41	2,11	0,42
Total	99,87%	98,87%	98,26%	98,62%

Les profils biochimiques des quatre huiles essentielles sont alors très variables du point de vue qualitatif et quantitatif, cependant, trois des quatre HEs montrent une forte teneur en phénols notamment, le carvacrol ou le thymol.

Le carvacrol, composé principal de l'HE de *T. numidicus* de Berrahel, est présent avec un très faible taux (2,70%) dans l'HE de *T. ciliatus* de Taoura, et totalement absent dans celui de la Maouana et de Djebel el Ouahch.

En contre partie, le taux du thymol dans l'essence de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch et de *Thymus ciliatus* de la Maouana, est relativement faible (2,93%, 0,14% respectivement), alors qu'il est majoritaire (67,78% et 16,8%) dans les essences de *Thymus ciliatus* de Taoura et *T. numidicus* de Berrahel respectivement.

Les HEs de *Thymus ciliatus* (Taoura) et de Djebel Maouana ainsi que l'HE de *T. numidicus* (Berrahel) sont les plus riches en phénols (70,48%, 58,77% et 71,8% respectivement) alors que ces derniers ne présentent que 2,93% dans l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch.

Les hydrocarbures monoterpéniques sont présents en quantités importantes dans les quatre huiles avec un taux légèrement élevé (33,7%) dans l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch.

L'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch, est le plus riche en alcools monoterpéniques avec un taux assez important de (52,92%) de la totalité de cette huile, alors qu'ils ne figurent qu'à 0% à 2% pour les autres HEs.

Les Hydrocarbures sesquiterpéniques, les cétones monoterpéniques, et les éthers sont représentés en faibles quantités dans les quatre HEs analysées.

La composition chimique de l'HE des plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. Ces variétés chimiques sont communément appelées chémotype. Elles peuvent être due à plusieurs facteurs comme les conditions environnementales, tels que : le climat, la nature et les composants du sol, l'altitude etc.

D'autres facteurs peuvent aussi influencer la composition chimique tels que, la partie de la plante utilisée, le moment de la récolte, les conditions de stockage, les techniques d'extraction et les paramètres d'analyses lors de l'identification des composés (Bruneton, 2009; Karoussou *et al.*, 2005). Dans notre cas l'exception de la composition chimique de l'HE de Djebel el Ouahch semble être liée au biotope de la plante.

Les HEs étudiées sont riches en phénols, principalement le thymol et le carvacrol. Par la même occasion ce sont les composés antimicrobiens les plus connus décrits à ce jour (Kempf *et al.*, 2011).

VI. Recherche d'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites

1. Aromatogramme

C'est une technique qui permet de rechercher une éventuelle activité sur des cibles vivantes (bactéries, champignons, parasites...). La réalisation de l'aromatogramme repose sur le principe de la technique de l'antibiogramme selon les recommandations du (CLSI) et conforme aux recommandations du [CASFM - EUCAST ; 2014- V2], par diffusion en milieu gélosé, où les disques d'antibiotiques sont remplacés par des disques imbibés d'extraits.

1.1. Souches bactériennes test- objets

Les produits alimentaires peuvent être dégradés par une multitude de microorganismes, et pour être au plus près de cette réalité nous avons essayé d'intégrer dans notre expérimentation une large gamme de groupe physiologique bactérien. Certaines souches ont été pour la majorité mises à notre disposition par les laboratoires de microbiologie CHU Annaba, de la répression des fraudes, de la DSP et l'EPH de Guelma. D'autres ont pu être isolées de produits alimentaires au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine.

Ainsi, 160 souches bactériennes sur un total de 240 sont retenues. Ces dernières proviennent des urines (n= 55; 34%), de denrées alimentaires altérées et/ ou contaminés (n=40; 25%) et de coproculture suite à des toxi-infections alimentaire collective (n=22; 14%) (Fig.36).

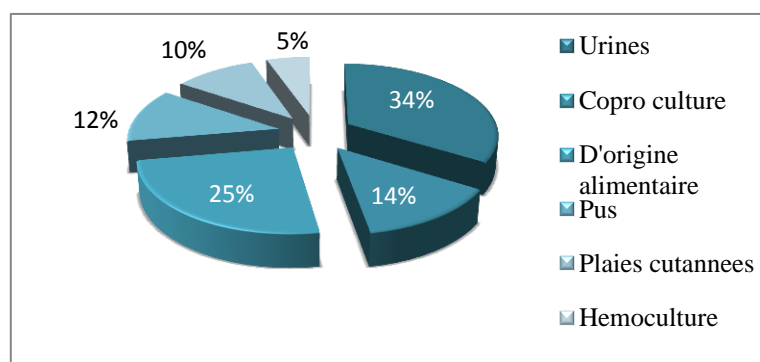


Figure 36. Répartition des souches bactériennes selon l'origine.

Les autres souches sont issues d'hémoculture (n= 8; 5%), de pus (n= 19; 12%) et de plaies cutanées (n= 16; 10%).

Les souches bactériennes retenues appartiennent à différents groupes physiologiques. Les bacilles à Gram négatif représente un taux de 69% (entérobactéries 56%, non entérobactéries 13%), les Cocci à Gram positif 29% et les bacilles à Gram positif 2%.

1.1.1. Identification des souches bactériennes test-objet

Les résultats de l'identification biochimique ont permis d'intégrer 85 souches à la famille des *Enterobacteriaceae*, dont 20 au groupe K.E.S.H, 15 au P.M.P et 20 au E.S.S.C (Tab.16).

Tableau 16. Répartition des souches bactériennes selon l'espèce.

	Groupe	Genre	Espèces
<i>Enterobacteriaceae</i>	K.E.S.H (n= 85)	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. terrigena</i>
		<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazakii</i> ,
		<i>Serratia</i>	<i>S. rubidaea</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. marcescens</i>
		<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
	P.M.P (n= 15)	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>
		<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
		<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i>
		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	E.S.S.C (n= 20)	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella sp.</i>
		<i>Shigella</i>	<i>Shigella sp.</i>
<i>Citrobacter</i>		<i>C. freundii</i>	
BGN- NF	BGN- NF (n= 20)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>Acinetobacter</i>	<i>A. baumannii</i>
BGP	BGP (n=2)	<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
		<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>
CGP	CGP (n=50)	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>

Nous retrouvons aussi parmi les bacilles à Gram négatif dix souches *Pseudomonas aeruginosa*, dix *Acinetobacter baumannii*. Les Gram positif retenus regroupent cinquante souches de *Staphylococcus aureus*, une souche de *Bacillus cereus* et une *Listeria monocytogenes*.

1.1.2. Antibiogramme de la microflore test-objet

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques révèlent que sur environ 2200 tests d'étude effectués, les souches de la microflore test-objet ont montré une résistance à plus de 45%. Ceci nous a permis d'établir le profil de résistance de chaque groupe de bactérie en fonction de caractères bactériologiques.

- **Entérobactéries**

Globalement la résistance aux antibiotiques des entérobactéries retenues varie de 52,25% à 69,13%. Cependant, elle est variable à l'intérieur des groupes physiologiques de cette famille au regard de chaque type d'antibiotique. Dans le monde, l'OMS estime que les diarrhées tuent 1,5 million de personnes, et que 70% sont "foodborne" (Busby & Roberts, Gastroenterology, 2009). Parmi les TIAC à entérobactéries déclarées, ce sont les salmonelles qui sont le plus souvent identifiées (80 % des cas).

En 2011 en Algérie on note une augmentation du nombre total de foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à entérobactéries déclarés par rapport à l'année 2010. Durant cette année on a enregistré plus de 82 foyers avec 2807 personnes touchées dont 5 décédées (Mouffok, 2011). Même constat est fait en France en 2014, où 1380 foyers de TIAC à *Salmonella* ont été déclarés, affectant 12109 personnes, dont 649 (5 %) ont été hospitalisées et 2 sont décédées. Et dont les bactéries incriminées dans ces infections ont montré une résistance après une antibiothérapie (INVS, 2014).

- **β-Lactamines**

Le groupe *K.E.S.H* montre le plus de résistance aux β-Lactamines avec un taux de 69,13%.

Parmi les 50 souches appartenant à ce groupe, cinq sont productrices de bêta lactamases à spectre élargie : deux *Klebsiella pneumoniae* une *K. oxytoca* deux *Enterobacter aerogenes* et une souche *Serratia marcescens*.

Le groupe *E.S.S.C* est à 62,66% résistant aux β-Lactamines. Le quart de ces représentants produisent des bêta-lactamases à spectre élargie (trois *E. coli* et deux *Citrobacter freundii*). De leur part les *P.M.P* sont à 52,55% résistant aux β-Lactamines et aucune souche n'est productrice de BLSE.

En moyenne, il ressort que 12,94% des Entérobactéries testées sont BLSE+ et pour la plus part appartiennent au groupe *K.E.S.H* et issues d'infections urinaires.

Ce taux n'est pas à négligé par rapport au taux rapporté par le réseau national de la surveillance de la résistance aux antibiotiques (2014), où 36,62% de souches *K.E.S.H* isolées d'infections communautaires sont de phénotype BLSE+.

L'étude de l'antibiorésistance de nos souches bactériennes a mis en évidence des taux de résistance assez marqué aux antibiotiques testés, notamment à l'AMX et à l'AMC

avec des taux de (56,89%) et (48,17%) respectivement. L'acquisition de la résistance à l'AMC, et à l'AMX, antibiotique à très forte prescription en Algérie, est un phénomène mondial rapporté à des taux variables.

La résistance des entérobactéries à la CTX, est marquée pour toutes les espèces à l'exception celles du groupe *P.M.P.*

Depuis 2011-2012 jusqu'à nos jours, le réseau national Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, ne cesse de rapporter un profil d'antibiorésistance grandissant. On y trouve surtout un taux élevé de résistance à l'AMX, et une résistance émergente à la CTX (Benslimani et Mahieddine, 2012). Aucune résistance à l'imipénème n'a été observée pour toutes les souches testées.

En 2009, six souches résistantes aux C3G par production de BLSE ont été décrites chez les salmonelles sérotype Derby. En 2010 on retrouve les mêmes avec un profil « ACroCazFoxSKTGSuTmpCTe » associé à une épidémie à l'origine de TIAC en France (42 cas) rapporté par le CNR-ESS en 2014. L'analyse des mécanismes moléculaires de résistance ont permis d'identifier la production concomitante de la BLSE CTX-M-1 et de la céphalosporinase CMY-2 chez ces souches.

➤ **Aminosides**

Le groupe *K.E.S.H.* montre le plus de résistance aux aminosides avec un taux de 25,08%. Celui des *P.M.P.* et *E.S.S.C.* est de 20,21% et 18,17% respectivement.

Des résistances associées aux aminosides sont retrouvées chez la plus part des souches, précisément ceux productrices de β -lactamases à spectre élargie, ce qui présente un fort risque d'échec thérapeutique.

Les souches *E. coli* et *E. aerogenes* présentent un profil particulier aux aminosides avec une résistance assez marquée de 67% et 31% pour la Gentamicine et Nétilmicine respectivement.

Les souches de *K. pneumoniae* présentent également des taux de résistance très importants, soit 78% à la Gentamicines et 80% à la Nétilmicines. Concernant les souches *K. oxytoca*, on assiste à une résistance de 100% vis-à-vis des deux antibiotiques.

Notons que *Salmonella sp.* Appartenant au groupe *E.S.S.C.*, était l'espèce qui a montré plus de résistance aux aminosides notamment à la Gentamicine (56,3%).

Le rapport national de surveillance de l'antibiorésistance de 2012 rapporte des taux élevés de résistance des Salmonelles à différents antibiotiques notamment à la GN avec un taux égal à 68,29% (Benslimani et Mohiédine, 2012).

➤ **Quinolones**

La résistance aux quinolones des entérobactéries retenues varie de 38,19% à 50,96%. Il est de 38,19% pour le groupe des *K.E.S.H.*, 50,96% pour les *E.S.S.C* et 48,51% pour les *P.M.P.*

On rapporte un pourcentage élevé de résistance à l'acide nalidixique des souches de *Salmonella* sérotype Paratyphi A. En 2014, chez ce type de souches a été isolé en Thaïlande (n=3), en Inde (n=2), en Afghanistan (n=1), au Pakistan (n=1), au Sri Lanka (n=1), au Cambodge (n=1) et au Sénégal (n=1) (CNR-ESS, 2014).

Chez nos souches la résistance aux quinolones est de 34 % pour l'acide Nalidixique, de 29% pour la Péfloxacine et de 12 % pour la Ciprofloxacine. A l'exception, de *C. freundii* totalement sensibles aux quinolones.

Des souches de *Salmonella* de sérotype Brandenburg isolées lors de TIAC hautement résistantes à la Ciprofloxacine, persistent depuis 2000 dans une clinique du département de l'Allier en France. En 2013, une souche Cip^R produisait également une BLSE de type CTX-M-32 (CNR-ESS, 2014).

➤ **Autres antibiotiques**

On note par ailleurs des profils de résistance de la majorité des souches au triméthoprime. Le groupe des *E.S.S.C.* apparaît le plus résistant à ce dernier avec un taux de 70%.

Le groupe des *K.E.S.H.* quant à lui est le plus résistant à l'association sulfaméthoxazole + triméthoprime, avec un taux supérieur à 60%. Alors que la résistance au chloramphénicol est de moins de 30% pour tous les groupes physiologiques bactériens testés.

Parmi les entérobactéries productrices de BLSE, les souches de *K. pneumoniae* sont les plus résistantes, soit 89% à l'association sulfaméthoxazole + triméthoprime (SXT), et 100% pour le chloramphénicol (C) et triméthoprime (TMP).

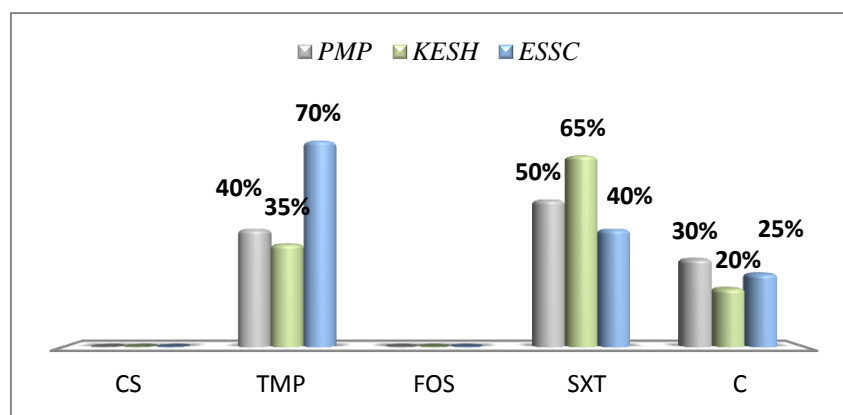


Figure 37. Résistance des Entérobactéries aux autres antibiotiques

Toutes les souches bactériennes testées sont sensibles à la colistine (CS) et la fosfomycine (FOS). Les *P.M.P.* étant naturellement résistants à cette molécule.

- **Les bacilles à Gram négatifs non fermentant**

Les souches d'*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales surtout au niveau des unités de soins intensifs d'une part (Giamarellou et al., 2008), et agents d'altérations des denrées alimentaires d'autre part. Les composés de la paroi des espèces de genre *Pseudomonas* élaborent des protéines et des toxines (Garrity et al., 2010). De plus, ces bactéries possèdent la meilleure capacité de développement au froid présentant une importante activité protéolytique et lipolytique et sont à l'origine de principales altérations (Bornert, 2000).

Dans notre étude, les BGN oxydatives isolées, montrent des taux élevés de résistance à la majeure partie des aux antibiotiques testés.

Ainsi, *Acinetobacter baumannii* s'est révélé à 80,90% résistants aux β -lactamines avec plus de 70,23% à la Ticarcilline (TIC), 68,9% à la Pipéracilline (PIP) et 76,2% à la ceftazidime (CAZ) (Fig.38).

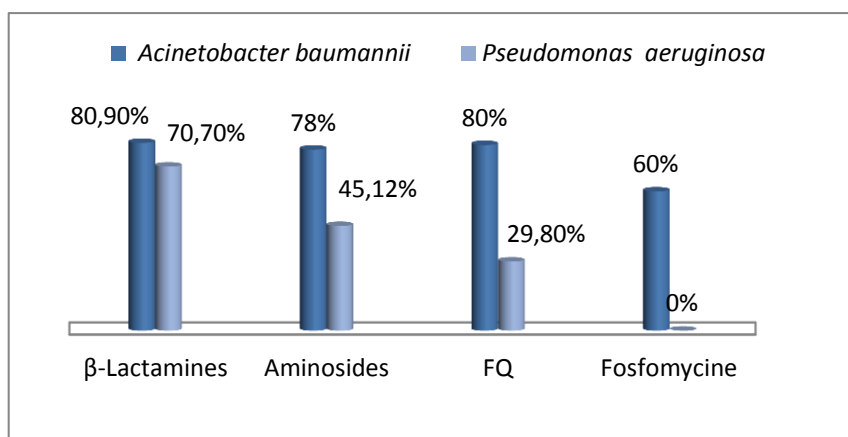


Figure 38. Résistance des BGN-NF aux antibiotiques

On n'a détecté aucune résistance à l'Imipénème, alors que le réseau national de surveillance de l'antibiorésistance a enregistré en 2014 un taux de 77,49% des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées dans ces structures.

La résistance aux Fluoroquinolones est assez importante (80%), avec 90% à la Ciprofloxacine (CIP).

La résistance n'est pas moins importante aux Aminocyclitolés (78%), avec 52% à la Gentamycine (GN) et 57,21% à l'Amikacine (AK).

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par le réseau national de la surveillance aux antibiotiques de l'année 2014, où les souches sus-citées, présentent des taux de résistance très alarmants pour les principales familles à usage thérapeutiques telles que, les β-Lactamines notamment la TIC (85,31%), la PIP (91,77%) et la CAZ (87,10%). Les aminocyclitolés avec 77,73% à la GN et 60,841% à l'AK ; les Fluoroquinolones avec 78,99% à la Cip (Benslimani et Mahieddine, 2014).

Les *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré des taux de résistance élevés aux β-lactamines (70,70%) avec 80% de résistance à la CAZ, aux aminocyclitolés (45,12%) avec 67,2% pour la GN, et en fin aux Fluoroquinolones (29,80%) avec 67% de résistance à la Cip. Ces taux de résistance sont

Le rapport national de surveillance de l'antibiorésistance (2014) rapporte des taux moins élevés de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques notamment à la CAZ (15,40%), à la GN (16,35%) et à la Cip (14,27%).

- Les Cocci à Gram positif

La plus part des souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes aux antibiotiques testés (Fig.39). Cette résistance varie de 51% pour la Fosfomycine à 96% pour les bêta-lactamines.

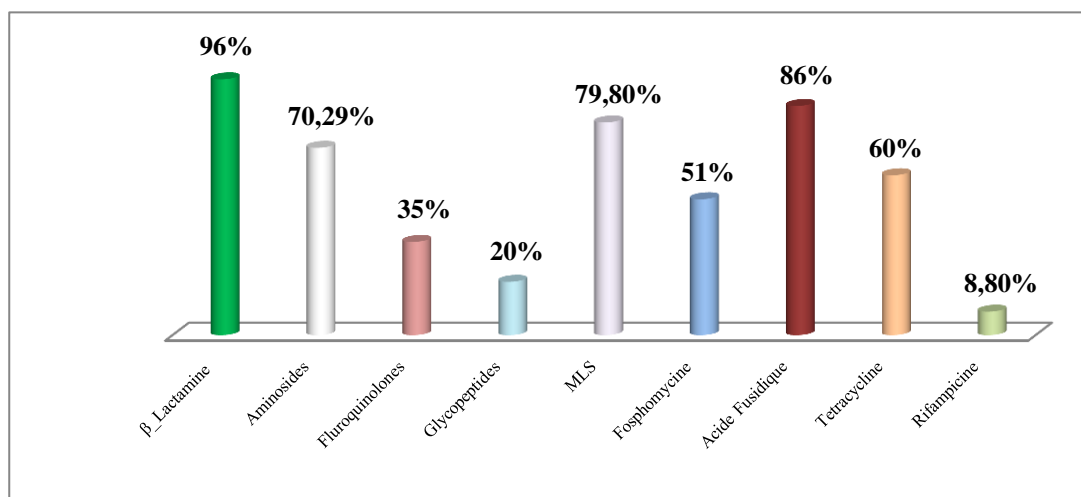


Figure 39. Résistance des *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques

Elle est non moins élevée pour les Glycopeptides (20%), FQ (35%). Seule la Rifampicine reste sensible à 81,2%.

A partir des résultats, il ressort une grande résistance de *Staphylococcus aureus* aux β-Lactamines (96%), à l'Acide Fusidique, aux MLS et aux Aminosités avec des taux de 86%, 79,80% et 70,29% respectivement.

Les spécimens ont montré aussi une résistance notable aux Tetracyclines (60%) et aux Fosfomycines (51%), mais, une moindre résistance aux autres familles d'ATB testées.

Les MRSA sont des bactéries pathogènes produisant des entérotoxines et responsables d'intoxications alimentaires à morbidité aiguë passagère très intense et invalidante. De plus, cette bactérie a une formidable capacité à acquérir des résistances contraignant à une recherche continue de nouveaux antimicrobiens (Wernli *et al.*, 2011).

La détection de la résistance à la Méthicilline chez staphylocoques dorés testées par le Screening - Test à l'oxacilline, a révélé que 88% des souches sont de type MRSA. Ce taux est très important par rapport à celui enregistré par le réseau national de la surveillance de l'antibiorésistance (35,37%) en milieu hospitalier et (24,76%) en milieu communautaire (Benslimani et Mahieddine, 2012).

En fait, en Algérie les *Staphylococcus aureus* sont au deuxième rang des bactéries responsables d'intoxications alimentaires après les salmonelles. Elles produisent des entérotoxines à l'origine des différents symptômes (INSP, 2014). En France l'agent responsable le plus fréquemment incriminé ou suspecté était l'entérotoxine staphylococcique avec 33% des foyers de TIAC (INVS, 2011).

- **Les Bacilles à Gram positifs**

Les souches de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* d'origine alimentaire, n'ont montré aucune résistance aux antibiotiques testés. (Fig.40)

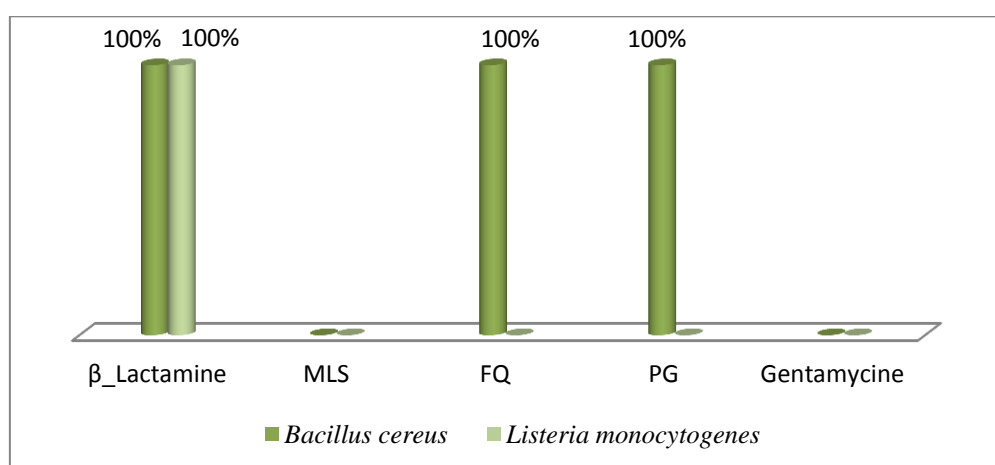


Figure 40. Résistance des BGP aux antibiotiques

Malgré la sensibilité de ces dites souches aux antibiotiques testés, *L. monocytogenes* constitue actuellement la principale menace pour la santé publique. *B. cereus* possède deux types de toxines impliquées dans des infections d'origine alimentaire : des toxines diarrhéogènes et une toxine émétisante.

Plusieurs pays ont enregistré des cas d'intoxication lié à l'ingestion de *Bacillus cereus*. En Europe, 124 (2.2%) des cas d'intoxication dus à l'ingestion de *Bacillus sp.* ont reporté pour 11 pays membres de l'union Européenne en 2009 (FSAI, 2011).

En France, cette bactérie est considérée comme la troisième cause (17% des cas) de TIAC (Delmas et al., 2010). Par contre dans les pays du Maghreb, étant non recherché, aucun cas associé à ce pathogène n'a été enregistré (Mouffok, 2011). Cependant deux cas - suspectés épidémiologiquement d'après les symptômes ont été causés par *B. cereus* à Bizerte – Tunisie (2010-2011) (Anonyme, 2011)

Les souches retenues pour notre étude ont montré des phénotypes de résistances aux antibiotiques assez inquiétants, détectés chez 44 souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), chez 11 souches d'entérobactéries productrices de BLSE et appartenant à différents genres (*Kebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Citrobacter*) et enfin chez *E. coli* résistantes à la Ciprofloxacine (Cip).

1.2. Aromatogramme proprement dit

Le diamètre moyen des zones d'inhibitions des huiles brutes testées varie de [19,9mm à 45,9mm] ce qui permet de qualifier d'excellente l'activité de nos huiles sur 95% des souches considérées. Résultats meilleurs par rapport à ceux rapportés par certains auteurs dont les diamètres moyens des zones d'inhibition des huiles essentielles de plusieurs espèces de thym se situent dans un intervalle de [13,3mm à 35,6mm] (Rasooli *et al.*, 2002 ; Dob *et al.*, 2006 ; Rota *et al.*, 2008 ; Maksimavic *et al.*, 2008 ; Haddouchi *et al.*, 2009).

L'analyse comparative des résultats entre les différents groupes physiologiques de la microflore testée laisse apparaître des comportements variables. Ainsi, pour les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* l'intervalle de variation des diamètres des zones d'inhibition est de [19,9mm à 33,8mm]. Et par ailleurs on note une conduite variable des différents sous groupes de cette famille.

D'autre part, nos résultats sont meilleurs par rapport à ceux obtenus lors d'une étude menée par Saidali et ses collaborateurs, où quelques souches de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* et *E. coli*) se sont montrées moyennement sensibles à l'HE de *Thymus vulgaris* avec des diamètres des zones d'inhibition variant de 10 à 15mm (Saidali *et al.*, 2014).

La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 sensible aux antibiotiques s'est montrée sensible à toutes les HEs testées avec un diamètre moyen des zones d'inhibitions de 23,8mm.

➤ Groupe *K.E.S.H.*

Le diamètre des zones d'inhibition des huiles testées sur les souches *K.E.S.H.* oscille dans un large intervalle allant de 15mm à 37,1mm. C'est une excellente activité mais un comportement différent des genres composants ce groupe.

Résultats proches de ceux rapportés par Khadir et ses collaborateurs, ayant montré que l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* possède une excellente activité sur la majorité des souches bactériennes de référence (ATCC) testées (*Salmonella enteritidis* ATCC 2453, *Salmonella montevideo* ATCC 3581, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922) avec des diamètres des zones d'inhibitions allant de 20 à 32mm (Khadir *et al.*, 2013).

Au sein des espèces du genre *Klebsiella* et *Serratia* le diamètre moyen se situe dans un intervalle étroit, et est de [21,4mm à 29,7mm]. Reflétant une meilleure spécificité d'action des différentes huiles testées sur ces bactéries. Cette remarquable activité est associée aux huiles essentielles de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna, et de *T. numidicus* de Berrahel (Fig.41).

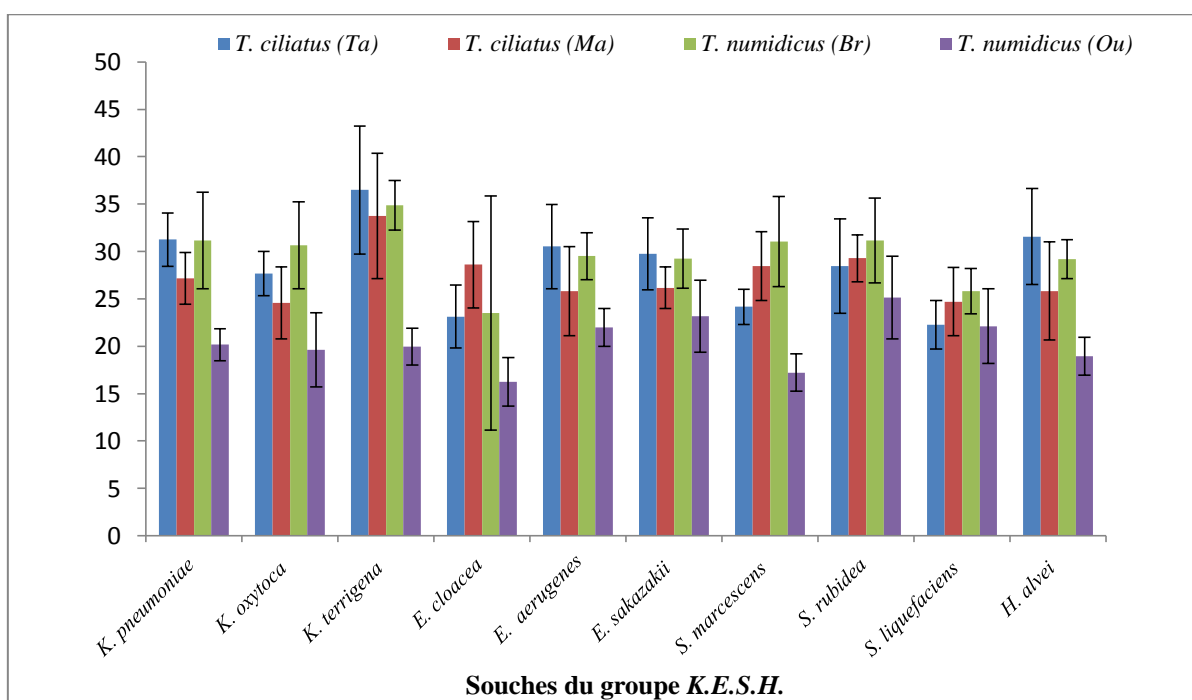


Figure41. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur les souches *K.E.S.H.*

T. ciliatus (Ta) : *Thymus ciliatus* de Taoura, *T. ciliatus* (Ma) : *Thymus ciliatus* de Djebel Maouna, *T. numidicus* (Br) : *Thymus numidicus*, *T. numidicus* (Ou) : *Thymus numidicus*, *K* : *Klebsiella*, *E* : *Enterobacter*, *S* : *Serratia*, *H* : *Hafnia*

L'activité est moins prononcée pour les souches des genres *Enterobacter* et *Hafnia* où le diamètre moyen des zones d'inhibition est de 25,3mm et 22,2mm respectivement.

➤ Groupe *P.M.P.*

Les spécimens du groupe *P.M.P* se sont montrés sensibles à toutes les HEs testées, seules les souches de *Proteus mirabilis* qui sont résistantes. Pour les isolats de

Providencia stuartii et *Morganella morganii*, les diamètres moyens des zones d'inhibition se trouve dans des intervalles étroits de [19,9mm à 27.1mm] et [20,7mm à 24,7mm] respectivement représentant ainsi un comportement similaire (Fig.42).

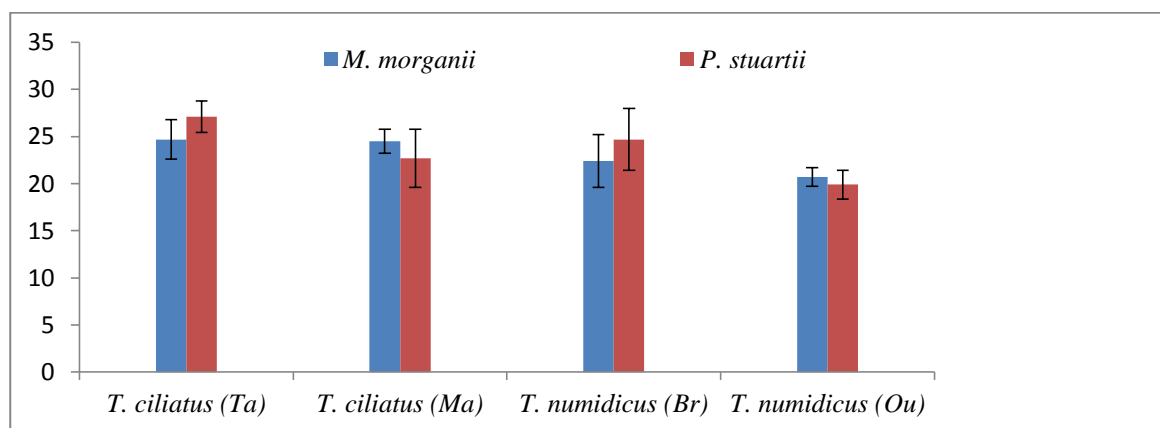


Figure 42. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur *M. morganii* et *P. stuartii*

Notons que la meilleure activité est attribuée aux huiles essentielles de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna, et de *T. numidicus* de Berrahel.

➤ **Groupe E.S.S.C.**

Les spécimens du groupe *E.S.S.C* apparaissent les très sensibles parmi les entérobactéries testées, avec un diamètre moyen des zones d'inhibition importants de 35,8mm (Fig.43).

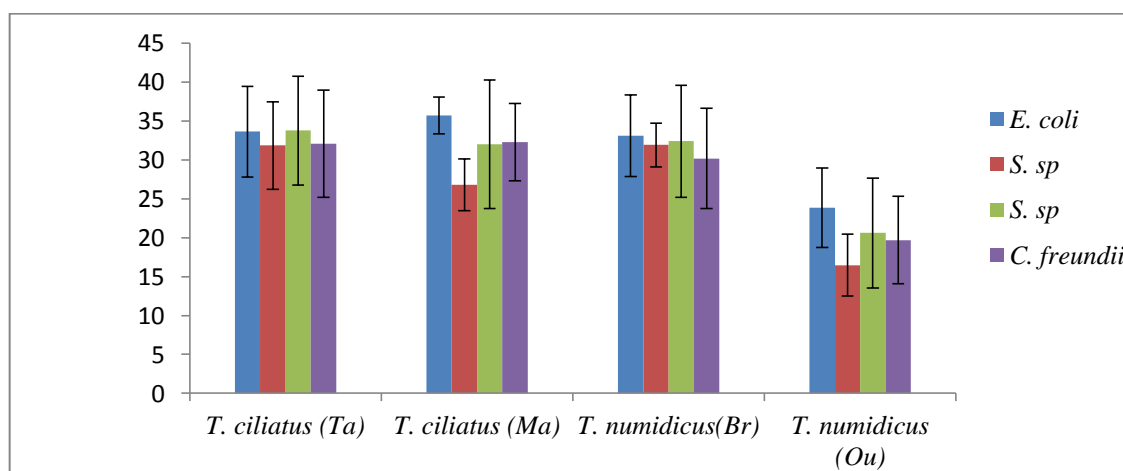


Figure 43. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur les souches *E.S.S.C*

Les souches appartenant à ce groupe, présentent un comportement semblable des **HEs** testées où les diamètres des zones d'inhibition se retrouvent dans un intervalle étroit allant de 31,5 à 33,1mm.

De cela, il ressort que les **HEs** de *T. ciliatus* (Ta), de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel seraient les plus actives. La même chose pour l'**HE** de *T. numidicus* de Djebel El mais à moindre degré.

➤ **Les bacilles à Gram négatif-Non fermentant**

La souche de référence de *P.aeruginosa* ATCC 27853 sensible aux antibiotiques, est aussi sensible aux différentes huiles étudiées avec un diamètre moyen des zones d'inhibitions de 17,5mm.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se sont montrées totalement résistantes aux huiles testées, par ailleurs connues pour leur résistance intrinsèque aux agents antimicrobiens notamment les antibiotiques d'une part, et la structure de leurs membranes externes, particulièrement imperméables aux molécules hydrophobes, d'autre part (Nordmann, 2006; Abi-Ayad *et al.*, 2011). Cependant certains auteurs rapportent une activité significative d'extraits des mêmes espèces collectées dans le même biotope à des périodes différentes (Amrouni *et al.*, 2014 ; Kouch *et al.*, 2014).

Alors que, les diamètres des zones d'inhibition des cultures d'*Acinetobacter baumannii* sont très importants pour toutes les **HEs** testées, allant de 32,4mm à 35,7mm (Fig.44).

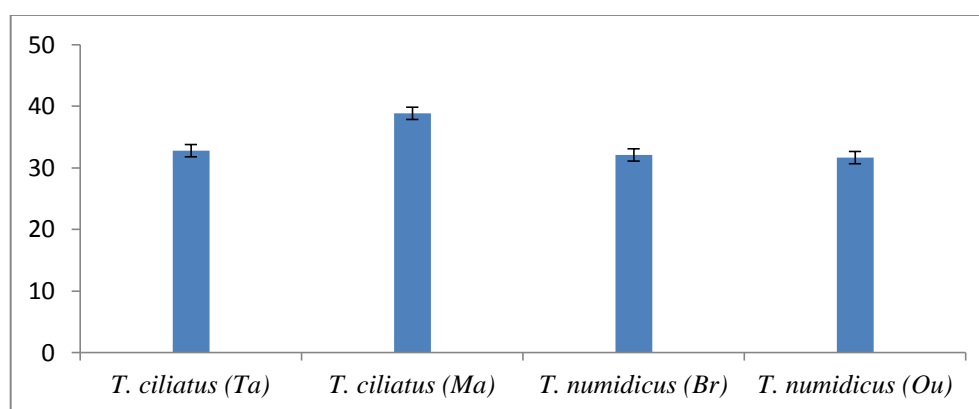


Figure 44. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées d'*Acinetobacter baumannii*

➤ Les Cocci à Gram Positif

Les souches de référence *S. aureus* ATCC 25923 sensible aux antibiotiques, *S. aureus* ATCC 29213 sensible à la méthicilline et *S. aureus* ATCC 43300 résistante à la méthicilline se sont montrées sensibles aux huiles avec des diamètres moyens des zones d'inhibition de 22,25mm, 21,9mm et 25,1mm respectivement.

De loin, les souches de *Staphylococcus aureus* sont les plus sensibles notamment aux HEs de *T. ciliatus* de Taoura et *T. numidicus* de Berrahel, avec des diamètres des zones d'inhibitions atteignant 39mm. Ces dites souches restent toujours très sensible aux huiles de *T. ciliatus* collectée dans la région de la Maouna et de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch avec des diamètres d'inhibitions moyens de 29mm et 25,6mm respectivement (Fig.45).

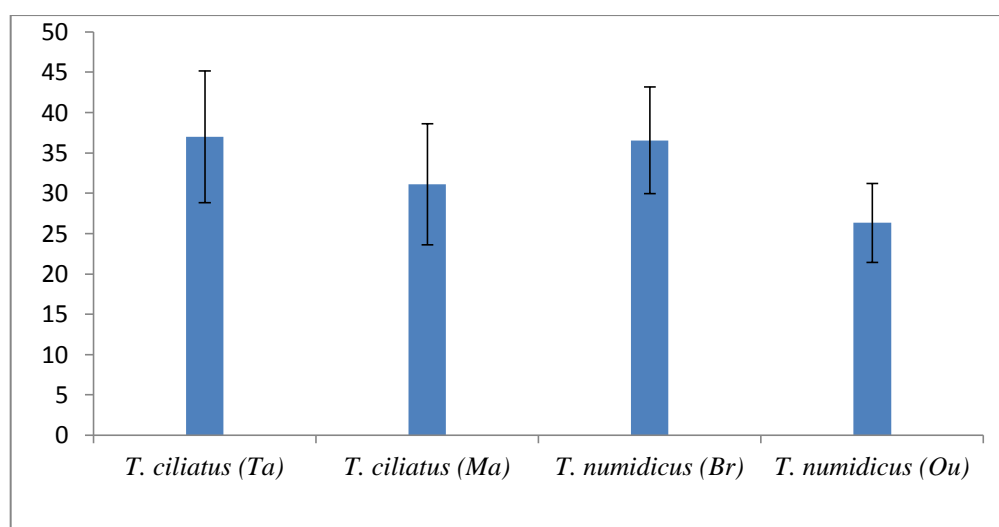


Figure 45. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur *Staphylococcus aureus*

➤ Les Bacilles à Gram Positif

L'essai des bacilles à Gram positif permet de rapporter une totale sensibilité de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* à toutes les huiles testées, avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 27,7mm à 40mm respectivement (Fig.46).

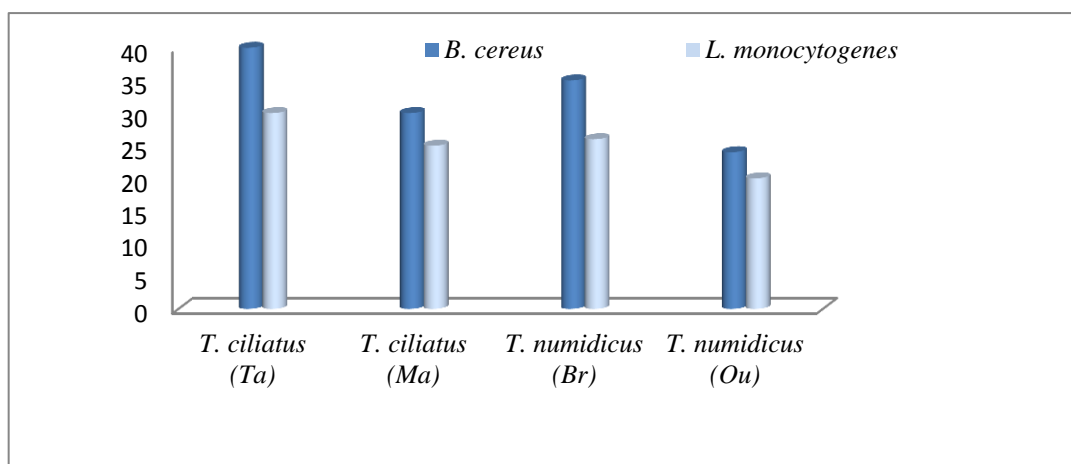


Figure 46. Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*

L'analyse statistique montre que le test ANOVA effectué à un intervalle de confiance de 95% montre qu'il y a des différences très hautement significatives ($p < 0,01$) entre les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles testées sur toutes les souches sensibles.

Le comportement variable des souches bactériennes vis-à-vis des HEs testées serait attribué à la différence dans les structures fonctionnelles des groupes physiologiques bactériens considérés mais aussi la réactivité des classes biochimiques des huiles de thym testées.

De leur part les bactéries à Gram négatif possèdent une couche fine de peptidoglycane et une membrane externe riche en phospholipide, cette structure complexe constitue une barrière d'imperméabilité aux substances hydrophobes telle les HEs. La biosynthèse du peptidoglycane est un processus régulé faisant intervenir des enzymes de finalisation de synthèse de peptidoglycane qui agissent en période active de croissance et de division bactérienne. Leur insensibilité rend les huiles inactives sur ce groupe de bactérie (Chao *et al.*, 2000 ; Sandri *et al.*, 2007).

Les bactéries à Gram positif quand à elles, selon les explications de (Randrianarivelo et Zarai) , vue l'absence de cette barrière et la faible teneur en phospholipides, permet le contact direct des constituants hydrophobes de l'huile essentielle avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant ainsi soit, une augmentation de la perméabilité des ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux, soit une déficience au niveau du système enzymatique (Randrianarivelo *et al.*, 2009 ; Zarai *et al.*, 2011).

2. Etude quantitative de l'activité antibactérienne des HEs extraites

2.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La CMI moyenne des HEs testées vis-à-vis de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 est de 0,1%.

Pour les *Enterobacteriaceae*, les espèces bactériennes présentent un comportement similaire vis-à-vis des HEs testées. Ils montrent une sensibilité extrême aux HEs de *T. ciliatus* de Taoura, de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel avec des CMI comprises entre (0,0125% et 0,15%). L'activité atteint son minimum avec l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch avec des CMI de (0,25% à 0,5%).

➤ Le groupe *K.E.S.H.*

Les CMI des souches bactériennes appartenant au groupe *K.E.S.H.* sont très faibles et varient de 0,025% à 0,25% pour les HEs de *T. ciliatus* de Taoura, de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel (Fig. 47).

Cependant, l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch est la moins active, ceci est visible par les valeurs absolues des CMI par ailleurs assez élevées (de 0,25% à 0,5%).

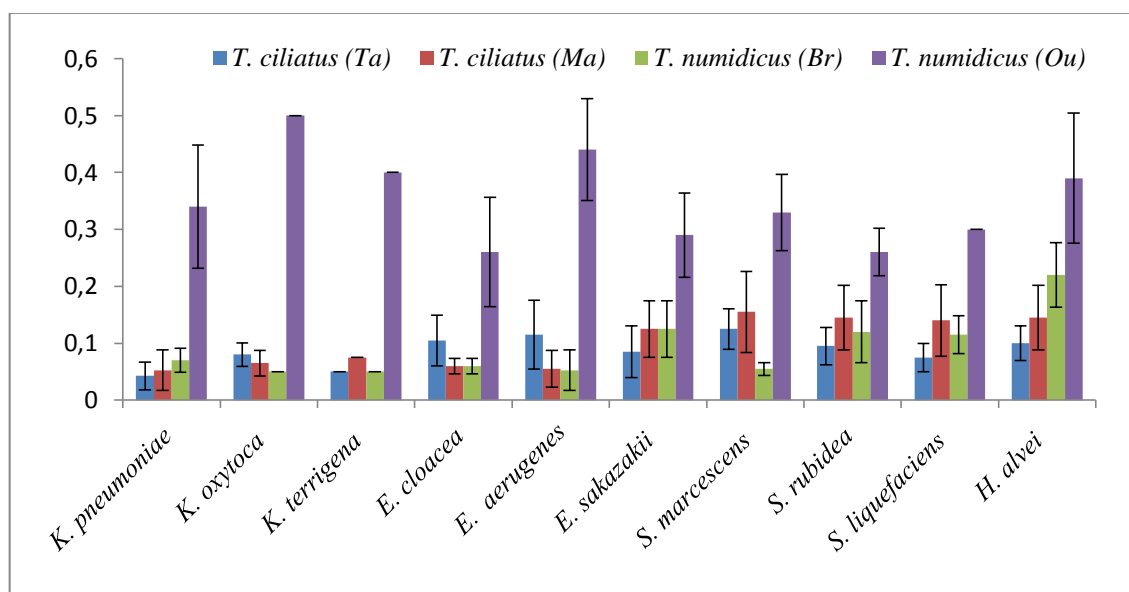


Figure 47. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches *K.E.S.H.*

A l'intérieur des espèces du genre *Klebsiella* les CMI moyennes allant de 0,05% à 0,4%. Notons que les souches de *K. pneumoniae* présentent des CMI plus faibles.

Par ailleurs, les espèces du genre *Enterobacter* et *Serratia* sont sensible aux essences aromatiques testées avec des CMI moyennes comprises entre 0,05% et 0,4%. Alors que les spécimens des *Hafnia alvei* se sont montrés résistants avec des CMI moyennes de 0,1% et 0,3%.

➤ Le groupe *P.M.P.*

Les souches de *Morganella morganii* et *Providencia stuartii*, se montraient sensibles vis-à-vis des HEs de *T. ciliatus* de Taoura, de Maouna et *T. numidicus* de Berrahel avec des CMI moyennes allant de 0,15% à 0,2% ; et peu sensible vis-à-vis de l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch avec des CMI beaucoup plus élevées (0,3% et 0,5%). (Fig.48)

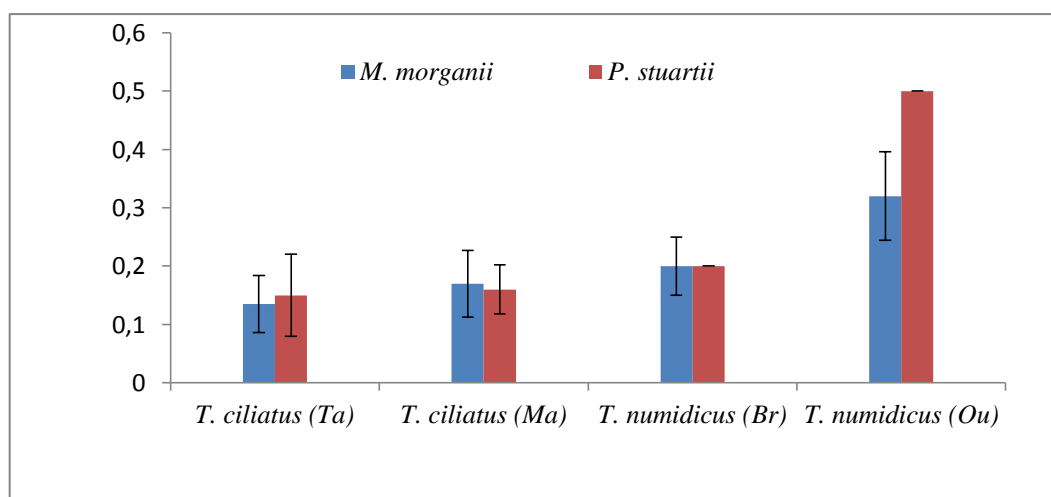


Figure 48. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches de *Morganella morganii* et *Providencia stuartii*

Morganella morganii est l'espèce la plus sensible aux huiles testées avec des CMI moyennes qui se situent dans un intervalle étroit de 0,1% à 0,3%, alors que *Providencia stuartii* est la plus résistance avec des valeurs des CMI moyennes variant de 0,15% à 0,5%

➤ Le groupe *E.S.S.C.*

Les souches bactériennes de ce groupe sont très sensibles aux huiles de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna avec des valeurs de CMI très faibles (0,05% à 0,15%), notamment pour l'HE de *T. numidicus* de Berrahel (0,0125% et 0,025%). Cependant, les dites souches restent sensibles à l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch, mais à moindre degré avec des CMI assez élevés comprise entre 0,25% et 0,4% (Fig. 49).

Pour les souches d'*E. coli*, les valeurs des CMI moyennes se situent dans un large intervalle de [0,05% et 0,2%]. Par ailleurs, les CMI moyennes des espèces des genres *Salmonella* et *Shigella* varient de 0,025% à 0,15%. Les différentes huiles ont fournis des CMI moyennes de 0,05% et 0,1% sur les souches de *Citrobacter freundii*.

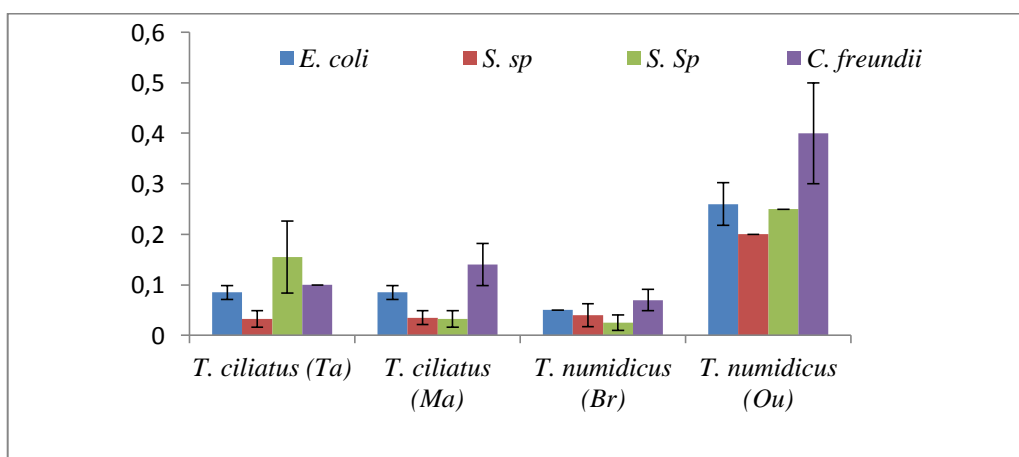


Figure 49. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches E.S.S.C.

➤ Les Bacilles à Gram Négatif non fermentant

La CMI moyenne des différentes huiles testées sur la souche de référence de *P.aeruginosa* ATCC 27853 est de 0,2%.

Acinetobacter baumannii s’est montré extrêmement sensible aux HEs de *T. ciliatus*, de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel, avec des CMI relativement très faibles allant de 0,0125% à 0,025%. Et moins sensible vis-à-vis de l’HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch avec des CMI plus élevées de 0,2% (Fig. 50).

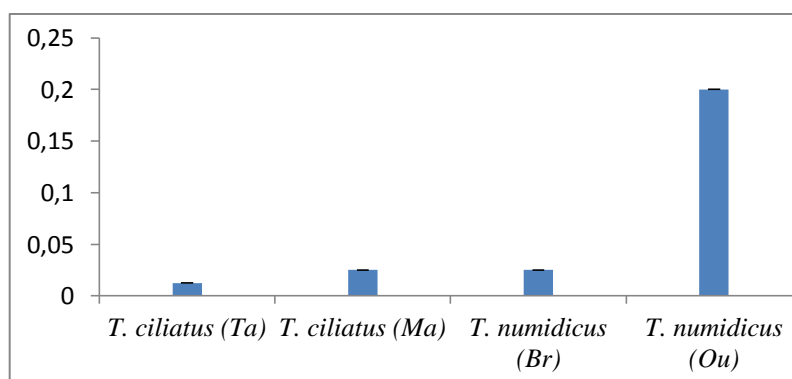


Figure 50. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches d’*Acinetobacter baumannii*

➤ Les Cocci à Gram positif

Les souches de référence *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300 sont sensibles aux huiles testées avec des CMI moyennes très faibles de 0,05%, 0,02% et 0,05% respectivement.

Les CMI moyennes des **HEs** de *T. ciliatus* (Ta), de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel vis-à-vis les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) et sensibles à la méthicilline (SASM) sont très basses de l'ordre de 0,0125% et 0,05%. Et peu élevées (0,075% à 0,5%) pour l'**HE** de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch (Fig.51).

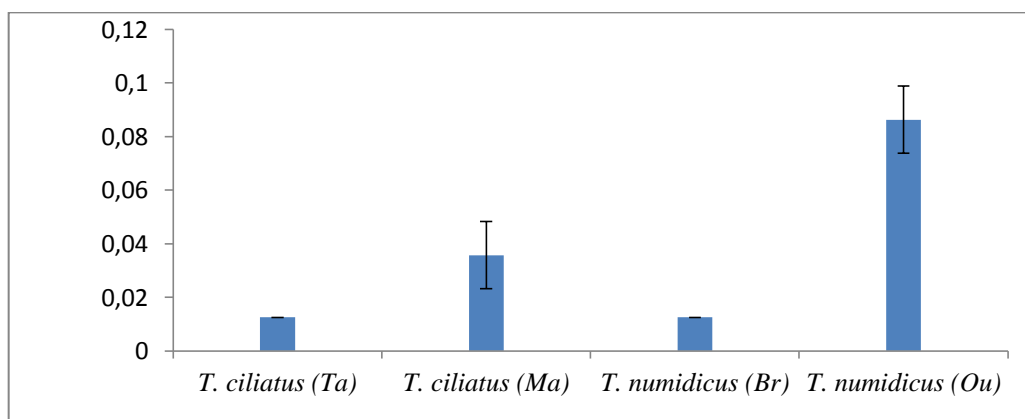


Figure 51. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches de *S. aureus*

L'activité étant inversement proportionnelle à la concentration, les résultats de l'étude quantitative de l'activité antibactérienne des huiles étudiées par détermination des CMI vient conforter les valeurs qualitatives obtenues par aromatogramme.

Notons que, les souches résistantes aux antibiotiques telles que les *S. aureus* (MRSA) et les entérobactéries (BLSE⁺) ont une sensibilité similaire par rapport à celles sensibles (MSSA) et les entérobactéries non productrices de BLSE, vis-à-vis des **HEs** testées.

Ceci nous permettent de supposé que l'apparition de la mutation au niveau des PLP n'affect en rien la perméabilité des souches aux **HEs**. Ou bien, ces dernière empruntent une autre voie et même qu'elles agissent autrement. Et que l'apparition de résistance rend les souches résistantes plus sensibles aux extraits volatiles des plantes aromatiques.

➤ Les Bacilles à Gram Positif

Les souches de *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes* sont extrêmement sensibles aux huiles testées, avec des CMI très faibles de 0,0125% et 0,025% (Fig.52).

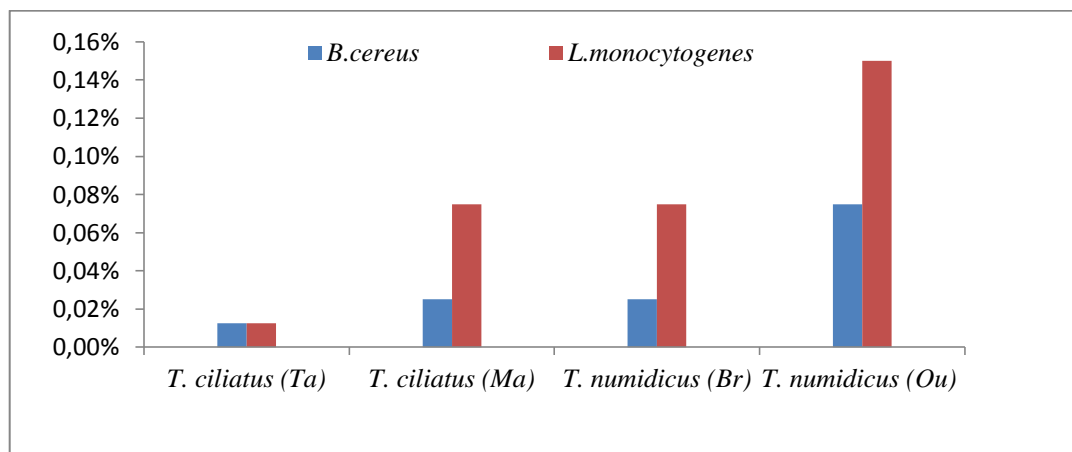


Figure 52. Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles testées sur les souches *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*

2.2. Concentrations minimales bactéricides (CMBs)

Pour la souche de référence *E. coli* ATCC 25922, la CMI moyenne des différentes huiles est de 0,1%

➤ Le groupe *K.E.S.H.*

Les CMBs moyennes sont relativement faibles et varient de 0.025% à 0,2% pour les HEs de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna, alors que celui de *T. numidicus* de Berrahel a généré des valeurs comprises entre 0,3% et 0,5% (Fig. 53).

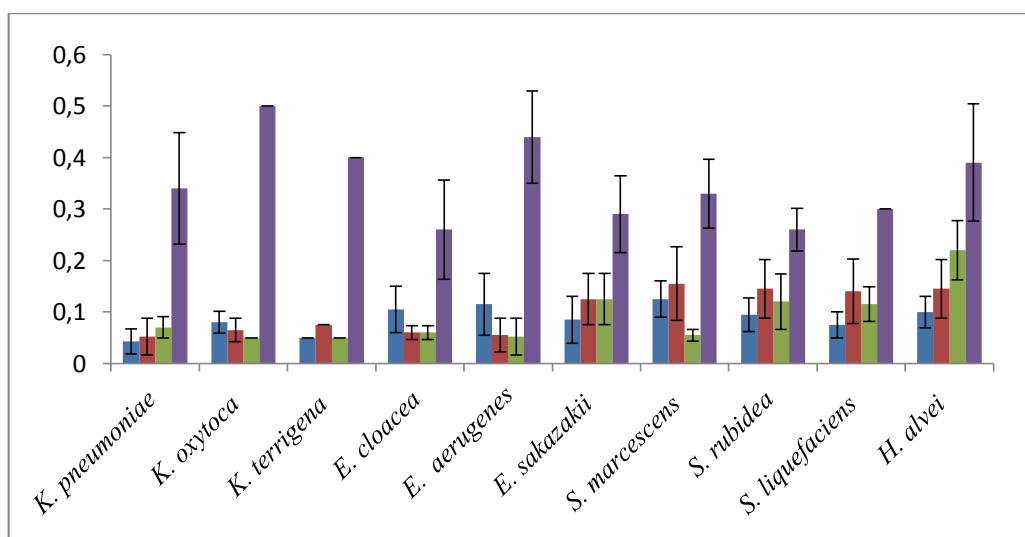


Figure 53. Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur les souches *K.E.S.H.*

➤ **Le groupe P.M.P.**

Les **HEs** de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna ont fournis des valeurs moyennes de CMBs égale aux CMI vis-à-vis des souches de *Morganella morganii* et *Providancia stuartii*. Ainsi, les CMBs moyens de l'**HE** de *T. numidicus* de Berrahel sont supérieurs aux CMI et sont de l'ordre de 0,4% et 0,5% (Fig.54).

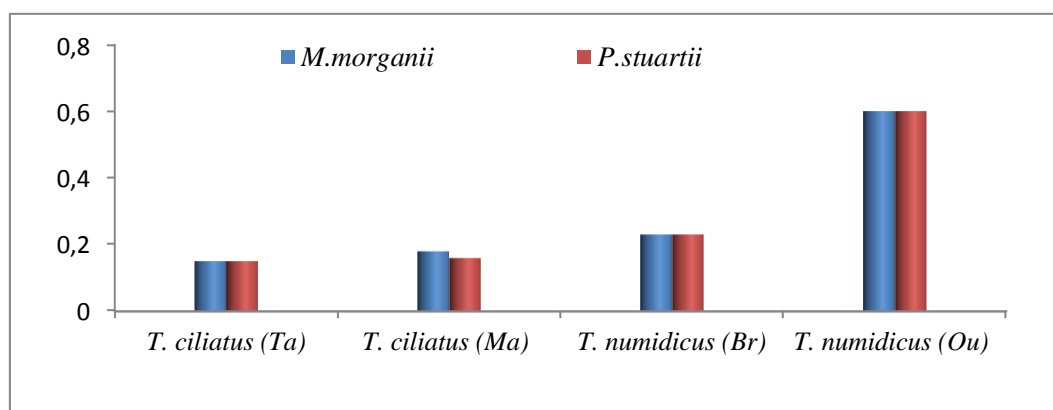


Figure 54. Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur *Morganella morganii* et *Providancia stuartii*

➤ **Le groupe E.S.S.C.**

Les CMBs moyennes engendrés par les **HEs** de *T. ciliatus* de Taoura et de la Maouna sont comprises entre 0,0125% et 0,25% ; alors que celui de *T. numidicus* de Berrahel a fourni des CMBs plus élevées allant de 0,3% à 0,5%. (Fig.55)

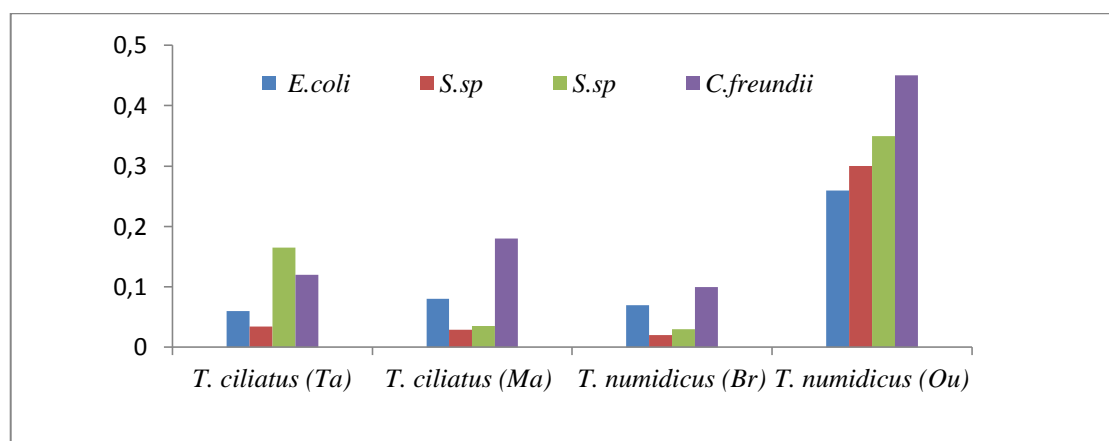


Figure 55. Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles testées sur les souches E.S.S.C.

Les CMBs des **HEs** testées vis-à-vis les souches de référence *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 *S. aureus* ATCC 29213 *S. aureus* ATCC 43300 sont différentes des CMI et sont de 0,3%, 0,08%, 0,05% et 0,075%.

Pour les souches d'*Acinetobacter baumannii*, les valeurs des CMBs sont basses (de 0,0125 à 0,025%). Ainsi, pour *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*, les valeurs des CMBs sont très faibles et égales aux CMI reflétant une meilleure activité sur les dites souches testées.

3. Bactéricidie / bactériostasie

Le calcul du rapport CMB/CMI (Oussou *et al.* 2008 ; Guinoiseau ; 2010) a permis de déceler une activité de type bactéricide sur les souches *Acinetobacter baumannii*. Les valeurs des rapports CMB/CMI sont inférieures ou égal à 4.

Ce pouvoir bactéricide est beaucoup plus significatif sur les souches *Staphylococcus aureus* et les BGP (*Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*) testées, avec des CMB égales aux CMI dans le cas des huiles de *T. ciliatus* de Taoura, de la Maouna et *T. numidicus* de Berrahel. Ainsi, l'effet de l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch, reste bactéricide avec un rapport de CMB/CMI ≤ 4 .

La bactéricidie de l'activité antibactérienne de plusieurs huiles essentielles testées sur les *Staphylococcus aureus* est démontrée par plusieurs auteurs (Bassole *et al.*, 2001 ; Oussou *et al.*, 2004 ; El Amri *et al.*, 2014 ; Heni *et al.*, 2015)

L'activité antibactérienne des huiles de thym étudiés est variable sur les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* testées. Ainsi, le type d'activité est surtout lié à l'espèce quoi que dans la plus grande part des cas elle est bactériostatique. Seule, sur les souches *Salmonella sp.*, deux souches *Hafnia alvei* et *Morganella morganii* l'activité est bactéricide pour les huiles les plus actives. Mais elle est uniquement bactériostatique pour l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch.

A partir des résultats obtenus, il ressort que les HEs de *T. ciliatus* et *T. numidicus* de Taoura, de la Maouna et de Berrahel à forte teneur en phénols monoterpéniques et hydrocarbures monoterpéniques possèdent une excellente activité antibactérienne élargie à toutes les espèces testées (à l'exception de *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*) avec des CMI relativement très faibles.

Notons que l'HE de *T. ciliatus* (Ta) et *T. numidicus* (Br) riches en dérivés phénoliques sont plus actives que celle de la Maouna situation rapportée par Burt dans son étude comparative en fonction des teneurs des huiles (Burt, 2004).

Cette activité est attribuée aux Carvacrol et Thymol (Kempf *et al.*, 2011). Le thymol étant leur composant majeur, se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité, déstabilisant l'intégrité cellulaire. Il interfère aussi avec la synthèse des constituants de structure (Trombetta *et al.*, 2005) et le métabolisme de l'énergie conduisant à la mort de la cellule (Ultee *et al.*, 2002; Nguefack *et al.*, 2004; Cristani *et al.*, 2007). Le carvacrol, ainsi présent accentue cet effet par action inhibitrice sur l'activité de l'ATPase (Gill et Holley, 2006).

Sans négliger l'activité liée aux hydrocarbures monoterpéniques notamment le p-cymène, qui sont présents en quantité suffisante dans les **HEs** sus-citées. Se sont des précurseurs de la biosynthèse du carvacrol. Ils facilitent sa pénétration intracellulaire potentialisant ainsi son action (Ultee *et al.*, 2002). Il montre une forte affinité pour les membranes cytoplasmique et peut les perturber et les affecter en provoquant leur gonflement à une plus grande mesure que le carvacrol (Burt *et al.*, 2004 ; Felomena *et al.*, 2013).

L'activité antibactérienne de s **HEs** peut aussi, être attribuée au phénomène de synergie entre tous les constituants volatiles ; les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires. (Lahlou *et al.*, 2004).

L'**HE** de *Thymus numidicus* de Djebel el Ouahch (Constantine) appartenant aux classes biochimiques des Alcools monoterpéniques (52,92%) et des Hydrocarbures monoterpéniques (33,7%). Cette huile riche en Linalool (35,47%), montre une activité moindre avec des CMI un peu plus élevées.

Les alcools monoterpéniques viennent immédiatement après les phénols en termes d'activité. Selon Peleczar, les alcools monoterpéniques notamment le Linalool agissent par dénaturation des protéines par déshydratation (Peleczar *et al.*, 1988). De cela on peut déduire que l'activité antibactérienne des **HEs** se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires (Franchomme, 1981) : Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Oxyde > Esters > Hydrocarbure.

L'activité antibactérienne dépend de la composition chimique des **HEs** et est liée aux groupes physiologiques bactériens. Le comportement des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques n'interfère en rien avec leur attitude vis-à-vis des **HEs**.

VII. Cytotoxicité des huiles essentielles

1. Effet du DMSO sur la croissance de *Paramecium sp.*

L'analyse de la courbe de la cinétique de croissance des cellules de paramécies en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) laisse apparaître une diminution du nombre d'individus par millilitre de milieu de culture allant de 4,16% à 9,51% par rapport au témoin (Fig. 56). Ce taux n'excède pas les 10% ce qui représente une perte naturelle liée à la sénescence.

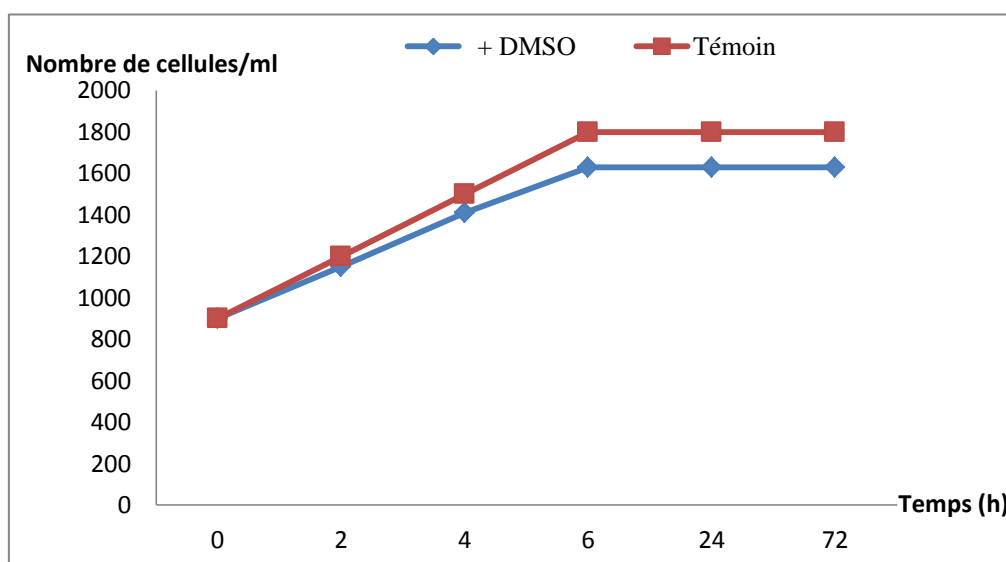


Figure 56. Cinétique de croissance des paramécies en présence du DMSO

La courbe de croissance montre que le DMSO n'a pas d'effet significatif sur l'évolution du nombre de paramécie en fonction du temps, pouvant être utilisé comme témoin. Une autre étude menée par Dominique Sud et ses collaborateurs sur l'effet du DMSO sur des cellules de branchies de coques « *Carastoderma edule* » a montré que le DMSO a montré une plus grande reproductibilité des mesures, et qu'il n'y a pas de différence significative entre le témoin et les cellules en présence du DMSO (Sud *et al.*, 1997).

2. Croissance de *Paramecium sp.* en présence d'huiles essentielles

Les courbes de croissances nous permettent d'avoir des données quantitatives et une analyse fiable de l'effet toxique d'une substance donnée.

- Effet de l'HE de *Thymus ciliatus* (Ta)

La cinétique de croissance des cellules de *Paramecium sp.* en présence de différentes concentrations croissantes de l'HE, montre que le nombre de cellules diminue progressivement jusqu'à 2 heures (de 900 à 700 cellules) pour la plus faible concentration et de 900 à 500 cellules pour la concentration la plus élevée. Puis de 2h à 3h on remarque une réduction hautement significative du nombre d'individus par rapport au témoin. Au-delà de 3 heures aucune cellule n'est viable (Fig.57).

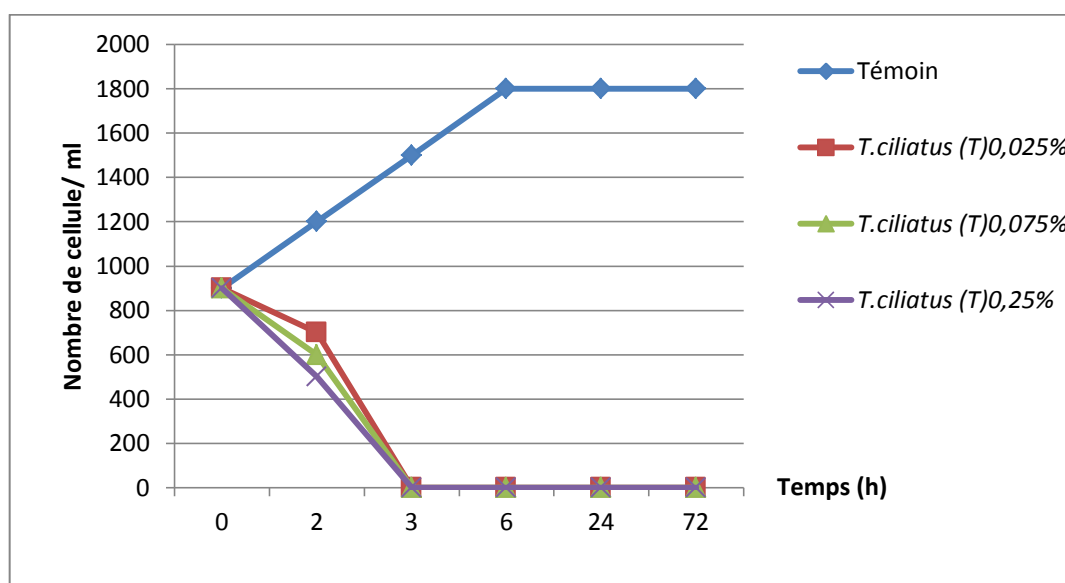


Figure 57. Cinétique de croissance des paramécies en présence de l'HE de *Thymus ciliatus*

- Effet de l'HE de *Thymus numidicus* (Ou)

L'abattement des cellules reste dépendant de la concentration. Pendant les deux premières heures le nombre passe de 900 à 500 cellules pour la petite concentration et poursuit jusqu'à 200 cellules pour la plus élevée. De 2h à 4h la réduction du nombre des cellules est très hautement significative de plus de 200 cellules jusqu'à l'inhibition totale. Au-delà de 6h aucune n'est vivante (Fig. 58).

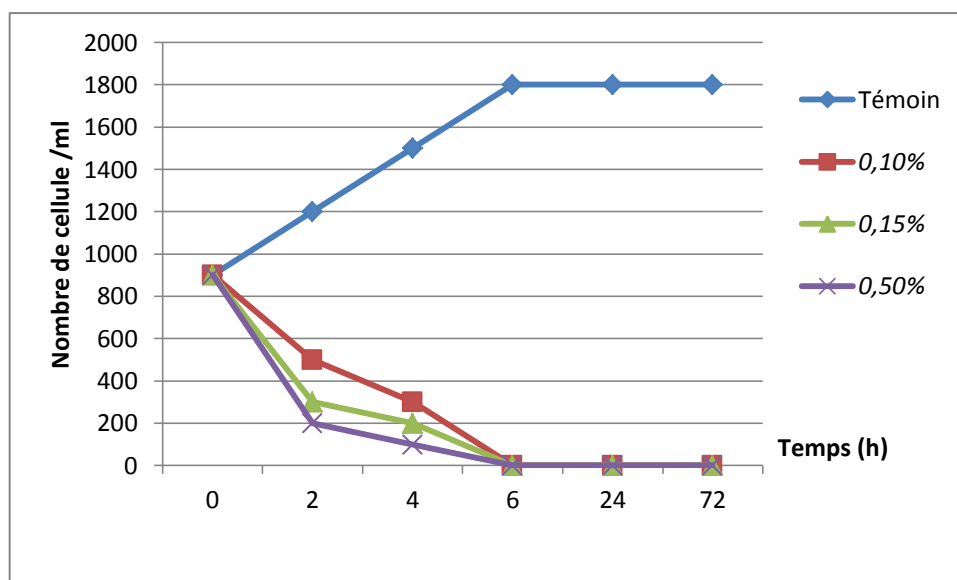


Figure 58. Cinétique de croissance des paramécies traitées aux CMI de l'HE de *Thymus numidicus*

Nous observons que dès la mise en contact avec l'HE, le nombre de paramécie diminue de manière très hautement significative et dose dépendante ($p \leq 0,01$) par rapport aux témoins. Cette diminution se poursuit en fonction du temps, elle est plus marquée pour les plus fortes concentrations.

3. Calcul du pourcentage de réponse (PR)

Le pourcentage de réponses permettant d'évaluer l'effet des HEs sur la viabilité des paramécies et confirmer ainsi l'évolution de la cinétique de croissance.

Dans le but de montrer la différence de toxicité des deux huiles testées, nous avons calculé le pourcentage de réponse de *Paramecium spp.* vis-à-vis des deux HEs testées.

Pour le DMSO, le pourcentage de réponse des paramécies est négatif (PR = -21,51%) ayant aucun effet sur *Paramecium sp.*

Concernant l'huile essentielle de *T.numidicus*, le pourcentage de réponse des paramécies est dose – dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes de cette huile (Fig. 59).

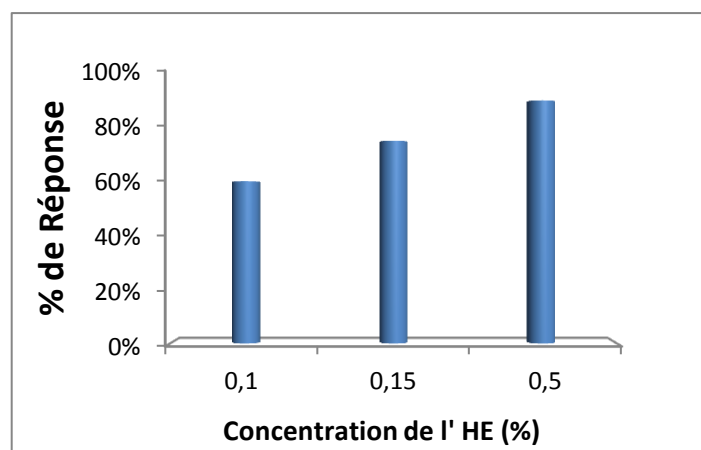


Figure 59. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de l'HE de *Thymus numidicus*

Il passe de 60% à la concentration de 0,1% et atteint 93% à la concentration de 0,25% où nous constatons une inhibition presque totale de la croissance des paramécies.

Par ailleurs, le pourcentage de réponse des paramécies est dose – dépendant et proportionnel aux concentrations croissantes de l'huile essentielle de *T. ciliatus* (Fig.60).

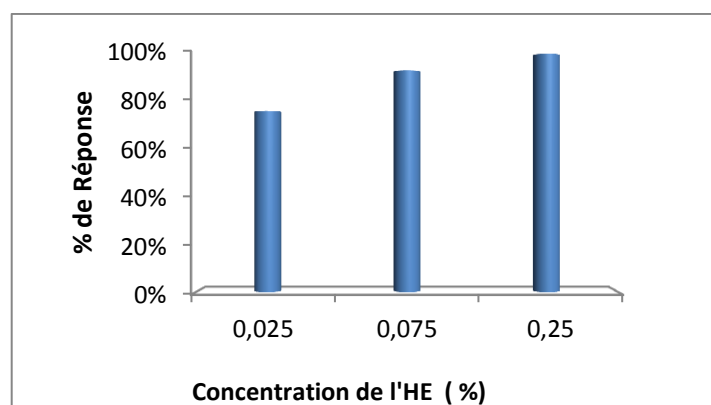


Figure 60. Evolution du pourcentage de réponse des paramécies vis-à-vis des différentes concentrations de l'HE de *Thymus ciliatus*

Il est de 78% à la concentration de 0,025 et atteint 100% à la concentration de 0,25% où nous ne percevons aucune viabilité de cellule de paramécies.

L'HE de *T. ciliatus* de Taoura, composée essentiellement de thymol (67.78%) et possède une excellente activité antibactérienne, s'est avérée la plus toxique sur le protiste cilié avec 0% de viabilité.

Cependant, l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch, de chémotype Linalool et la moins active sur les bactéries, s'est montré toxique sur le protiste cilié avec 93% de réponse

VIII. Effet synergique : Antibiotique/ Huile essentielle

L'effet d'association de l'huile essentielle de thym avec les différents antibiotiques sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aussi bien à l'huile qu'aux antibiotiques, a pu améliorer l'activité antibactérienne, où les dites souches sont devenues sensibles dans la majorité des cas (Tab.17).

Tableau 17. Effet d'association HE/ ATB sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Souches	ATB testés	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
		ATB	HE	ATB/ HE	HE / ATB
S ₁	AT	14	<6	25,4	24
	CAZ	12	<6	19,5	18
	CIP	11	<6	22	21
	PIP	13	<6	19,1	19
	TCC	17	<6	24	22
	GN	13	<6	14,8	14,3
S ₂	CAZ	6	<6	16	16,8
	AT	12	<6	25	22
S ₃	AT	10	<6	24	23,9
	PIP	17	<6	22,7	21
S ₄	AT	15	<6	19	21
S ₅	PIP	12	<6	18,5	18,9
	CAZ	11	<6	22	20
	CIP	6	<6	6	6
	AT	16	<6	25	23,9
S ₆	CAZ	16	<6	25	23,9
	PIP	17	<6	20	19
	AT	6	<6	18	17
	CIP	13	<6	13	13
	GN	15	<6	21,7	20,2
	TIC	6	<6	8	8
S ₇	TCC	16	<6	20,4	21
	AT	6	<6	18	18
S ₈	AT	6	<6	17	19,5
S ₉	CAZ	12	<6	25	25
	PIP	14	<6	18,3	19
	CIP	11	<6	12	11
	AT	15	<6	20	19
S ₁₀	AT	13	<6	25	23

ATB : antibiotique, HE : huile essentielle ; TIC : Ticarcilline (75µg), TCC : Ticarcilline/Acide Clavulanique (75µg/10µg), AT : Aztréonam (30µg), PIP : Pipéracilline (75µg), GN : Gentamicine (15µg), CIP : Ciprofloxacine (05µg), CAZ : Ceftazidime (30µg).

Sur les cinquante huit associations testées, cinquante six présentent une amélioration de l'activité. Seule dans deux cas les associations avec la Ciprofloxacine et la Ticarcilline n'ont pas montré une amélioration. Ce qui a mené dans cinq cas à un stade de sensibilité intermédiaire et dans vingt quatre cas où les souches sont devenues sensibles.

Avec les β - Lactamines : on enregistre une synergie totale dans 80% des cas d'association de l'huile essentielle avec l'Aztréonam, Ticarcilline/Acide Clavulanique, la Ceftazidime et la Pipéracilline.

Dans le cas des aminosides seule 50% des associations proposées ont permis une amélioration de l'activité lorsque l'huile est associée à la Gentamycine.

Lorsque l'huile est associée aux Fluoroquinolones (CIP) l'activité s'accroît dans 25% des cas.

Aucune amélioration n'est observée dans l'association **HE+** Ticarcilline.

- ***Les β - Lactamines***

Hormis, avec la Ticarcilline, l'association avec les bêta lactamines est la plus résultative. Ces derniers bloquent la synthèse de la paroi par inhibition de la transpeptidase via une liaison avec une PLP (Protéine de Liaison à la Pénicilline) ce qui inhibe la propriété trans-peptidase et donc la synthèse du peptidoglycane (Stratton, 2000 ; François., *et al.*, 2003). L'huile essentielle rétablirait cette propriété par création de gouttières augmentant l'activité de la transpeptidase empêche la synthèse de la paroi. La paroi est anormale, la bactérie se déforme jusqu'à sa lyse et sa mort.

- ***Les Aminosides***

Les aminosides, antibiotiques bactéricides, diffusent dans les bactéries à travers les canaux porines jusqu'à l'espace périplasmique. Leur pénétration à travers la membrane cytoplasmique est active et nécessite un apport d'énergie et la présence d'oxygène.

Les aminosides perturbent la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur les ribosomes de la sous-unité 30 S. Sans doute en raison de leur caractère polycationique, ils déplacent les ions magnésium. L'altération de la membrane bactérienne est la

conséquence de la perturbation de la synthèse protéique et de leur effet direct sur elle (Changeur Nicolas, 2009; Eric Scholar, 2009).

On peut supposer que les huiles par leur activité sur la paroi augmenteraient la perméabilité membranaire ainsi la concentration des aminosides devient conséquente et on aurait une double activité.

- ***Les fluoroquinolones***

Les fluoroquinolones agissent en se liant au complexe ADN-ADN gyrase bactérienne ce qui a pour effet d'inhiber la gyrase. Cette enzyme rajoute des supertours négatifs à l'ADN, préalable indispensable à l'ouverture de la double hélice. Cela inhibe le mécanisme de réplication de l'ADN, indispensable à la formation de nouvelles bactéries, ainsi que la transcription (Larouche Geneviève, 2001 ; François., *et al.*, 2003). L'huile essentielle ajoutée à l'antibiotique contribue à l'inhibition de l'ADN gyrase.

Ces propriétés pourraient conduire à la restauration de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, réduire la dose d'antibiotique nécessaire pour le traitement, et par conséquent permettra de réduire les effets néfastes des médicaments.

X. Usage de l'huile essentielle comme conservateur alimentaire

La viande étant une denrée périssable, à haut risque, elle a été traditionnellement considérée comme le véhicule de nombreuses maladies d'origine alimentaire chez l'Homme (Fosse *et al.*, 2006). Sa composition en eau et en protéines de haute valeur biologique fait d'elle une niche très favorable au développement des microorganismes qui peuvent atteindre un seuil dangereux (Benaïssa, 2011).

De nombreuses recherches microbiologiques ont été menées sur la viande et ont permis d'isoler par stade de production, plusieurs types de bactéries selon qu'il s'agit de la viande fraîche, de la viande hachée ou des préparations à base de viande (Benaïssa, 2011; Kpodékon *et al.*, 2013).

La détérioration de cet aliment indispensable à la croissance de l'être humain, constitue un énorme problème tant de santé que de pertes économiques, malgré les bonnes mesures entreprises et les différentes procédures utilisées pour sa préservation.

Aujourd'hui, différentes stratégies sont appliquées dans le but de contrôler les agents bactériens dans les viandes, et l'intérêt a été porté sur l'application des huiles essentielles connues pour leurs propriétés aromatisants et antimicrobiennes moins toxiques (Lacroix, 2007), comme une alternative sûre et efficace aux conservateurs chimiques ou synthétiques qui ne sont pas exempt d'effets secondaires et aux quels les microorganismes développent des résistances.

L'application de l'**HE** de thym, (plante utilisée fraîche ou sec comme épice, dans certains plats de viande, à la fois pour ses qualités de conservation et son goût savoureux) dans le contrôle des microorganismes pourrait réduire le risque d'altération et d'assurer aux consommateurs la sécurité alimentaire.

Inhiber la croissance bactérienne dans la viande additionnée d'**HE**, et déterminer le taux d'abattement de la microflore mésophile aérobie totale (*MMAT*) et de *Staphylococcus aureus*.

1. Dénombrement de la microflore mésophile aérobie totale (*MMAT*) et les *Staphylococcus aureus*

Nous avons préparé deux échantillons de 25g de viande, l'un serait additionné de 0,1mg/ml d'**HE**, et l'autre non additionné, serait considéré comme témoin ; puis nous avons recherché la *MMAT* par la méthode de colimétrie en milieu liquide (le nombre le plus probable : NPP) pour les deux échantillons, additionné d'**HE** et le témoin ; pendant les différents temps de conservation à savoir : $T_0= 0\text{min}$, $T_1= 40\text{min}$, $T_2= 24\text{h}$ et $T_3 = 48\text{h}$.

L'addition de l'huile essentielle au temps T_0 laisse apparaitre une inhibition bactériostatique immédiate au bout de 10minutes, et un effet lytique au-delà de 40 minutes et un décroissement du nombre de bactéries comparé au témoin (Fig.61 et 62).

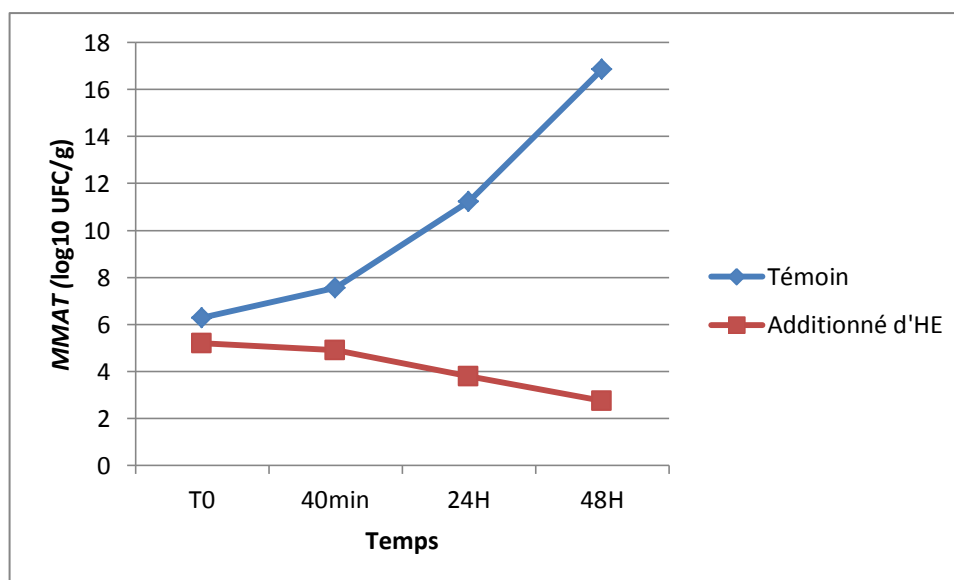


Figure 61. Evolution de la charge bactérienne (*MMAT*) en UFC/g à différents temps de conservation

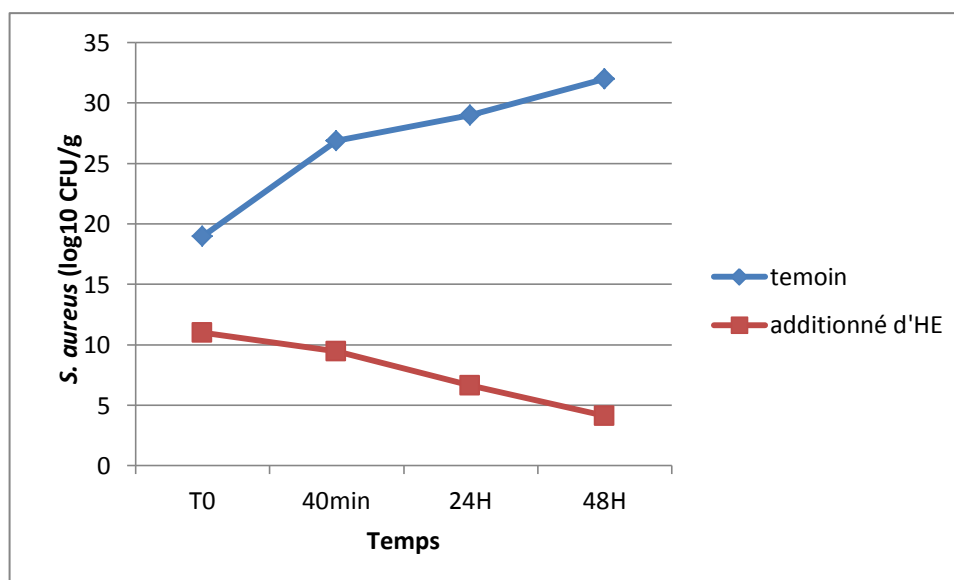


Figure 62. Evolution de la charge bactérienne (*Staphylococcus aureus*) en UFC/g à différents temps de conservation

A T_0 , la charge bactérienne de la *MAAT* et de *S. aureus* pour l'échantillon non additionné d'huile essentielle (Témoin), est de $6,3 \log_{10}$ UFC/ g et $19 \log_{10}$ UFC/ g respectivement.

L'addition de l'**HE** à l'un des échantillons, a permis une réduction légère du nombre logarithmique de la *MMAT* ($5,9 \log_{10}$ UFC/ g) et de *S. aureus* ($11 \log_{10}$ UFC/ g).

En effet, on remarque que dès l'addition de l'**HE**, la charge bactérienne de la *MMAT* diminue légèrement ; avec une réduction plus marquée pour les *S. aureus* (de $19 \log_{10}$ UFC/ g à $11 \log_{10}$ UFC/ g), alors qu'elle augmente dans l'échantillon dépourvu d'**HE**.

A partir des résultats illustrés, on peut déduire que l'**HE** exerce immédiatement son effet inhibiteur.

Après **40min** de conservation à 4°C, l'échantillon non additionné d'**HE**, présente une charge bactérienne de $7,5 \log_{10}$ UFC/ g pour la *MMAT* et de $26,3 \log_{10}$ UFC/ g pour les *S. aureus*. Concernant l'échantillon supplémenté avec l'**HE**, la charge bactérienne est de $4,9 \log_{10}$ UFC/ g pour la *MMAT*, et de $9,5 \log_{10}$ UFC/ g pour les *S. aureus*.

Ainsi, l'effet inhibiteur de l'**HE** se conserve, et la charge bactérienne de la *MMAT* diminue, avec une réduction remarquable pour les *S. aureus*, alors qu'elle augmente dans l'échantillon témoin.

Après **24h** de conservation à 4°C, la charge bactérienne devient importante pour l'échantillon dépourvu d'**HE** et atteint une valeur de $11,5 \log_{10}$ UFC/ g pour la *MMAT*, et plus importante pour *S. aureus* ($29 \log_{10}$ UFC/ g).

L'ajout de l'**HE** à l'échantillon, a permis une réduction accentuée de la charge bactérienne avec $3,8 \log_{10}$ UFC/ g pour la *MMAT* et significatif pour les *S. aureus* ($6,6 \log_{10}$ UFC/ g).

Après **48h** de conservation à 4°C, la charge bactérienne atteint des valeurs très élevées pour l'échantillon non supplémenté d'**HE**, elle est de $16,8 \log_{10}$ UFC/ g pour la *MMAT* et atteint son maximum pour *S. aureus* ($32 \log_{10}$ UFC/ g).

Pour l'échantillon enrichi d'**HE** et conservé dans les mêmes conditions, la réduction de la charge bactérienne est hautement significatif pour la *MMAT* ($2,7 \log_{10}$ UFC/ g), et pour les *S. aureus* ($4,1 \log_{10}$ UFC/ g), par rapport au témoin.

Il est évident d'après nos résultats que l'application de l'**HE** de thym à une faible concentration qui n'a pas altéré les caractéristiques organoleptiques de la matrice alimentaire (selon le test de dégustation), a permis une réduction de la charge bactérienne pour les différents temps de conservation, par rapport à l'échantillon témoin.

Il s'avère que l'effet inhibiteur de l'**HE** progresse dans le temps et se maintient jusqu'à 48h de conservation à 4°C, permettant une réduction significative ($0,1 < p < 0,5$) de

la charge bactérienne de la *MMAT* et très hautement significatif ($p \leq 0,01$) de celle des *S. aureus*, selon l'analyse statistique (test ANNOVA).

De cela, en présence de l'**HE** et à partir de T_0 jusqu'à 48h de conservation, le nombre de *S. aureus* a atteint une valeur presque nulle. Ce qui explique que l'**HE** de thym exerce une très forte activité antibactérienne contre *S. aureus* une fois qu'elle est en contact avec la bactérie cible (effet bactéricide). Ce résultat affirme ceux obtenus "in vitro".

Le progrès de l'effet inhibiteur de l'huile pourrait être dû aux conditions de la conservation (4°C). Cependant, la disponibilité d'éléments nutritifs dans la viande 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 sur l'activité de l'**HE**. Ainsi, selon Holley et Patel (2005), à pH bas, l'hydrophobicité de certains **HEs** 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, le niveau élevé d'eau et du sel faciliterait l'action des **HEs** 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.

2. Calcul du taux d'abattement

Les taux d'abattement calculés sont compris entre 16,34% et 83,92% pour la *MMAT* et entre 60,72% et 87,18% pour les *S. aureus* (Tab. 18).

Tableau 18. Résultat d'abattement de la *MMAT* et des *S. aureus*.

Temps	Abattement de la <i>MMAT</i>	Abattement des <i>S. aureus</i>
T_0	16,34%	60,72%
40 min	35,18%	71,85%
24 h	66,19%	77,06%
48 h	83,92%	87,18%

L'abattement considéré par cette étude est la différence entre la charge bactérienne de la *MMAT* et des *S. aureus* dans l'échantillon dépourvue d'**HE** et celui enrichie d'**HE**, à partir les résultats obtenus, il ressort que l'**HE** a montré des taux d'abattement allant de [16% à 84%] pour la *MMAT* et plus importants pour les *S. aureus* [60% à 88%].

Du fait que l'**HE** de thym figure parmi les mieux adaptées pour l'application dans la viande et les produits carnés (Caillet et Lacroix, 2007), et la spécificité de son activité antibactérienne. Cette étude, affirme le regain d'intérêt aux huiles essentielles qui démontre avec succès leur usage potentiel afin de réduire ou de contrôler la flore pathogène dans les produits alimentaires comme alternative aux additifs chimiques.

Conclusion

CONCLUSION

Thymus ciliatus et *Thymus numidicus* récoltées dans quatre régions du Nord- Est – Algérien : Taoura (Souk-Ahras), Djebel Maouna (Guelma), Djebel El Ouahch (Constantine) et Berrahel (Annaba), possèdent des traits morphologiques, anatomiques et physiologiques qui leur permettent de s'adapter au climat méditerranéen à longue saison sèche.

L'enquête ethnobotanique effectuée dans ces localités et autres, montre que les deux tiers des interrogés connaissent et utilisent le thym dans leurs pratiques culinaires quotidiennes. Mais aussi dans le traitement curatif ou préventif de différentes pathologies : affections des voies respiratoires supérieures, pneumonies, affections digestives cutanées etc... Ce qui témoigne de l'importance de ce végétal dans la vie quotidienne de cette population.

Les parties aériennes se caractérisent par la prépondérance de tissus cellulodiques aussi bien chez la feuille que chez la tige, ce qui dénote l'importance du facteur hydrique chez le thym. On note aussi l'abondance de poils épidermiques sécréteurs, qui libèrent des huiles essentielles (**HEs**). L'extraction par hydrodistillation de ces dernières, a donné des rendements encourageants en huiles essentielles, compris entre 1,9% et 2,9%. Ces rendements sont sous l'effet de l'ensemble des conditions climatiques des régions de provenance et les composants génétiques de la plante.

Les constituants de nos essences font partie de sept classes biochimiques représentées principalement par les phénols monoterpéniques et les hydrocarbures monoterpéniques pour les espèces de *T. ciliatus* et *T. numidicus* récoltées à Taoura, à la Maouna et à Berrahel. Par contre, les composants de l'**HE** de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch, appartiennent essentiellement à la classe des alcools monoterpéniques (52,92%) et des hydrocarbures monoterpéniques (33,7%). La composition chimique des **HEs** testées, varie suivant le biotope dans lequel elles évoluent, mais aussi de la situation géographique, du climat, de l'altitude, de la pluviométrie et de la nature du sol.

Les souches bactériennes test objet bien que pour la majorité multirésistantes (BLSE⁺, MRSA, CIP^R) sont à 95% sensible aux huiles brutes testées, à l'exception de *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Avec des diamètres moyens des zones d'inhibitions variant de [19,9mm à 45,9mm] ce qui permet de qualifier d'excellente l'activité de nos huiles sur les souches considérées.

Les **HEs** riches en phénols monoterpéniques (*Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* de Taoura, de Djebel Maouna et de Berrahel), possèdent la meilleure activité concernant un

large spectre de souches bactériennes. A degré moindre, l'**HE** de *Thymus numidicus* de Djebel El Ouahch, dominée par les alcools monoterpéniques avec des valeurs moyennes des diamètres des zones d'inhibition comprises entre 16mm et 28mm, laissant apparaître ainsi un comportement variable selon le groupe physiologique bactérien.

Par ailleurs, l'activité est de type bactéricide sur les souches *Acinetobacter baumannii*, et est beaucoup plus significative sur les Cocci à Gram positifs et les Bacilles à Gram Positifs avec des valeurs des CMI's égales aux CMB's concernant toutes les huiles testées.

Pour la famille des *Enterobacteriaceae* testées le type d'activité est surtout lié à l'espèce quoi que dans la plus grande part des cas elle est bactériostatique. Seule, sur les souches *Salmonella sp.*, deux souches *Hafnia alvei* et *Morganella morganii* l'activité est bactéricide pour les huiles les plus actives. Mais elle est uniquement bactériostatique pour l'**HE** de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch.

La variation de l'activité antibactérienne peut être due aux différentes structures qui couvrent le corps bactérien de chaque genre et aux mécanismes d'actions des constituants chimiques des **HEs** sur la paroi bactérienne. Notons que l'excellente activité est attribuée aux **HEs** riches en phénols (Thymol et Carvacrol), alors que celle riche en alcools monoterpéniques (linalool) est moindre. Il ressort que cette activité est dépendante de la composition chimique et est liée aux groupes physiologiques bactériens.

En effet, les souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) et les *S. aureus* sensibles à la méthicilline (SASM), ainsi que les entérobactéries productrices de BLSE et celles non productrice de BLSE ont montré une sensibilité similaire aux **HEs** testées. Ces espèces du même genre bactérien ont une sensibilité aux **HEs** semblable indépendamment de leur comportement vis-à-vis des antibiotiques d'une part, et que l'apparition de la mutation au niveau des protéines de transport n'affecte en rien la perméabilité des souches aux **HEs** testées, d'autre part.

L'étude « *in vivo* » de l'effet toxique des **HEs** de *T. ciliatus* (Taoura) et *T. numidicus* (Djebel El Ouahch) sur un modèle unicellulaire alternatif « *Paramecium sp.* » a montré une toxicité élevée. Indiquant une létalité dose dépendante et un pourcentage de réponse positif de 100% pour l'huile riche en phénol monoterpéniques (la plus toxique) et de 93% pour l'huile riche en alcools monoterpéniques (la moins toxique).

L'effet synergique de l'**HE** de *T. numidicus* de Berrahel (riche en phénol monoterpéniques) à des concentrations sub-inhibitrices, avec les différents antibiotiques, sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aussi bien à l'huile qu'aux antibiotiques, a révélé une amélioration de l'activité antibactérienne dans plus de 96% des cas. Ce qui a mené dans cinq cas à un stade de sensibilité intermédiaire et dans vingt quatre cas à un état de sensibilité totale.

Une synergie totale est enregistrée avec les β -Lactamines dans 80% des cas avec l'Aztréonam, Ticarcilline/Acide Clavulanique, la Ceftazidime et la Pipéracilline. Avec les aminosides seule 50% des associations proposées ont permis une amélioration de l'activité lorsque l'huile est associée à la Gentamycine. Lorsque l'huile est associée aux Fluoroquinolones (CIP) l'activité s'accroît dans 25% des cas. En effet, l'association n'améliore pas l'activité et l'effet synergique est attribué à l'ensemble des composés qui agissent en tant que molécule unique.

Sur le plan gustatif l'huile essentielle de thym est très appréciée, son addition à la « viande » a laissé apparaître une inhibition bactériostatique immédiate et un effet lytique au-delà de 40 minutes. On a enregistré ainsi un taux d'abatement hautement significatif de la microflore mésophile aérobie totale (*MMAT*) et très hautement significatif des *Staphylococcus aureus*. Cet effet inhibiteur progresse dans le temps et se maintient jusqu'à 48h de conservation à 4°C. L'abatement est tel qu'il est presque total pour *S. aureus* après 48h. Ce qui explique que l'**HE** de thym exerce sur *S. aureus* un effet bactéricide confirmant les résultats de l'aromatogramme.

Notre étude, laisse présager l'utilisation de ce type de molécules dans les aliments en substitution des conservateurs chimiques habituels, ceci ouvre la perspective de son usage pour la prévention et la lutte contre la détérioration des produits alimentaires conservés à température ambiante ou à 4°C. En plus de son impact économique, cette **HE** contribuerait à la lutte contre les toxi-infections alimentaires, et contre les bactéries multi-résistantes.

Par ailleurs, son effet bactéricide sur les pathogènes, constitue un atout quand à la perspective d'usage de cette substance comme produit de désinfection surtout pour les surfaces, ustensiles, outils médico-chirurgicaux. On pourrait l'exploiter dans l'amélioration des ambiances et la désinfection lors de fumigation des salles en milieu hospitalier.

PERSPECTIVES

Dans le but d'approfondir les aspects entrevue dans ce travail, et de mieux valoriser cette plante, nous proposons de :

- Réaliser une cartographie de l'espèce pour délimiter son aire de répartition.
- Améliorer génétiquement la plante pour obtenir un meilleur rendement en **HE**.
- Elargir le spectre des bactéries test-objet.
- Fractionner et isoler les différents constituants de l'**HE** afin de connaître la ou les molécules à l'origine des effets antibactériens et l'éventuelle synergie entre elles.
- Déterminer le mécanisme d'action exact de l'**HE** en identifiant sa cible cellulaire.
- Elargir les tests de cytotoxicité sur des cultures cellulaires.
- Elargir l'activité sur les acariens, les champignons et les moisissures.
- Protéger et cultiver à grande échelle afin de conserver cette bio- richesse et valoriser ces espèces.

Conclusion

Résumés

Résumé

Thymus ciliatus et *Thymus numidicus* récoltés dans la région de Taoura (Souk Ahras), la Maouna (Guelma), Djebel El Ouahch (Constantine) et Berrahel (Annaba) font partie du patrimoine culinaire et médicinaux des populations de ces localités. L'analyse chimique par CPG/SM des huiles essentielles extraites a montré que les composants de ces essences appartiennent à sept classes biochimiques essentiellement les phénols monoterpéniques et les hydrocarbures monoterpéniques. *T. ciliatus* et *T. numidicus* de Taoura, Djebel Maouna et de Berrahel. Les constituants de l'HE de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch, appartiennent à la classe des alcools et des hydrocarbures.

Les souches bactériennes test-objet, sont à 35% de phénotype résistant et 20% des *Enterobacteriaceae* sont productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et 88% des *Staphylococcus aureus* sont résistants à la méthicilline.

Les huiles essentielles riches en phénols (*Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* de Taoura, de la Maouna et de Berrahel) sont plus actives sur un large spectre de groupes physiologiques bactériens. Les souches bactériennes test objet bien que pour la majorité multirésistantes (BLSE⁺, MRSA, CIP^R) sont à 95% sensibles aux huiles brutes testées, à l'exception de *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Avec des diamètres moyens des zones d'inhibitions variant de [19,9mm à 45,9mm] ce qui permet de qualifier d'excellente l'activité de nos huiles sur les souches considérées.

Le type d'activité, est bactéricide sur les souches d'*Acinetobacter baumannii*, et est beaucoup plus significative sur les CGP et les BGP. Pour les *Enterobacteriaceae* testées le type d'activité est surtout bactériostatique. Seule, dans le cas de *Salmonella sp.*, *Hafnia alvei* et *Morganella morganii* l'activité est bactéricide pour les huiles les plus actives. Mais elle est uniquement bactériostatique pour l'HE de *T. numidicus* de Djebel El Ouahch.

Notons que la résistance acquise aux antibiotiques des souches productrices de β -lactamases à spectre élargi et *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline, n'interfère en rien avec la sensibilité aux huiles essentielles testées.

Les concentrations actives des huiles essentielles testées, sont d'une toxicité élevée sur *Paramecium sp.* dose dépendante surtout pour les HE riches en phénols monoterpéniques.

L'association HE/ATB a pu améliorer l'activité antibactérienne dans 96% des cas. Ce qui a mené dans cinq états à un stade de sensibilité intermédiaire et dans vingt quatre cas où les souches sont devenues sensibles. Une synergie totale est observée avec les β -Lactamines dans 80% des cas, avec les aminosides dans 50% des cas et avec les Fluoroquinolones l'activité s'accroît dans 25% des cas.

L'addition de l'huile essentielle du thym à « la viande », a permis un abattement hautement significatif de la *MMAT* et des *Staphylococcus aureus*, et augmenter nettement la durée de conservation. Ce qui nous permet de proposer l'usage de ces essences aromatiques comme source de substances conservatrices naturelles.

Mots clés : Extraits *Thymus* – Contamination microbienne – Conserves – Additifs.

ABSTRACT

Thymus ciliatus and *Thymus numidicus* harvested in the region of Taoura (Souk Ahras), Maouna (Guelma), Djebel El Ouahch (Constantine) and Berrahel (Annaba) are part of culinary and medicinal heritage of people of these localities. Chemical analysis by GC/MS of the extracted essential oils showed that components of these essences belong to seven biochemical classes, mainly monoterpene phenols and monoterpene hydrocarbons for *T. ciliatus* and *T. numidicus* from Taoura, Djebel Maouna and Berrahel. Constituents of the essential oil of *T. numidicus* harvested in Djebel el Ouahch, belong to alcohols monoterpene and hydrocarbons monoterpene classes.

About 35% of tested strains have a resistant phenotype, 20% of *Enterobacteriaceae* are producing β -lactamases expanded spectrum (BLSE) and 88% of *Staphylococcus aureus* strains are resistant to meticilline.

Essential oils that are rich in phenols (*Thymus ciliatus* and *Thymus numidicus* from Taoura, Maouna and Berrahel) are more active against an expanded spectrum of bacteria. Despite the multiresistance of tested bacterial strains (BLSE⁺, MRSA, CIP^R) these same strains are at 95% sensitive to tested essential oils, with an average inhibitory diameters between [19,9mm to 45,9mm]. *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains are however resistant to essential oils action.

Essential oil of *Acinetobacter baumannii* showed a bactericidic activity, it is more significant on CGP and BGP. *Enterobacteriaceae* strains showed a bacteriostatic activity, at the exception of *Salmonella sp.*, *Hafnia alvei* and *Morganella morganii* whose have a bactericid activity only with more active oils.

We note that antibiotic acquired resistance of BLSE and meticilline resistant *Staphylococcus aureus* strains does not interfere with the sensibility to tested essential oils

Active concentration of tested essential oils are of great toxicity against *Paramecium sp.* especially those which are rich on monoterpene phenols.

The association of EO/ATB was able to improve antibacterial activity in 96% of cases. A full synergy was observed with β -lactamines antibiotics in 80% of cases and with aminosides in 50% of cases, the activity increases with Fluoroquinolones in 25% of cases.

The addition of thyme essential oil to « meat », allowed a significant decrease of *MMAT* and *Staphylococcus aureus* strains, and increases clearly its shelf life. These results lead us to propose the use of aromatic essences in food preservation process.

Key words: *Thymus extract* – Microbial contamination– Canned food– Additives

ملخص

يعتبر *Thymus numidicus* و *Thymus ciliatus* التي تم جمعها من منطقتي تاور (سوق أهراس) و جبل الوحش (قسنطينة) و ماونة (قالمة) و برحال (عابدة) جزءا من الثروات الطبيعية و الاستعلامات الطبية لسكان المنطقة. و قد اظهر التحليل الكيميائي بواسطة تقنية CPG/SM للزيوت المستخرجة من ان مكوناتها تنتمي الى سبعة فصول بيو كيميائية و خاصة الفينولات المونوتريبينية و الهيدروكاربونات المونوتريبينية بالنسبة لـ *Thymus ciliatus* و *Thymus numidicus* لمناطق تاور و ماونة و برحال أما في ما يخص مكونات الزيوت المستخرجة من *Thymus numidicus* لمنطقة جبل الوحش فتتنتمي إلى فصيلة الكحوليات المونوتريبينية و الهيدروكاربونات المونوتريبينية.

رغم ان السلالات البكتيرية المعتبرة تعتبر في اغلب الحالات متعددة المقاومة من نمط ظاهري BLSE⁺ ; Cip^R , MRSA. إلا أنها أصبحت حساسة لهذه الزيوت المستخلصة بنسبة 95 % باستثناء *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa*. مع متوسط لقطار التثبيط متغير من 14 إلى 42 ملم هذا ما سمح بتأهيل النشاط على هذه السلالات بالامتياز.

تنوزع السلالات البكتيرية المختبرة على النحو التالي : 35% ذات النمط الظاهري المقاوم و 20% المعوية المنتجة لـ β Lactamase و 88% المكونات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين.

يتغير متوسط قطر مناطق التثبيط الزيوت الخامة المختبرة بنسبة 8,33 و هذا ما يسمح بتأهيل نشاطها بامتياز على 95% من كل السلالات المختبرة. كما تعتبر الزيوت الأساسية الغنية الفينولات المونوتريبينية *Thymus ciliatus* و *Thymus numidicus* تاور و برحال و ماونة أكثر فعالية و على طيف ممتد من المجموعات الفيزيولوجية البكتيرية.

نوع النشاط قاتل على السلالات *Acinetobacter baumannii* و هو أكثر أهمية على CGP و BGP أما بالنسبة إلى Entérobactéries فالنشاط هو من صنف مثبط للبكتيريا باستثناء *Salmonella sp* و *Hafnia alvei* و *Morganella morganii* فالنشاط هو قاتل بالنسبة للزيوت الأكثر نشاط و بالمقابل هو مثبط بالنسبة للزيوت المستخرج من *Thymus numidicus* جبل الوحش. كما نسجل أيضا أن المقاومة المكتسبة ضد المضادات الحيوية بالنسبة للسلالات المنتجة لـ β -Lactamase ذات الطيف الواسع و *Staphylococcus aureus* المقاومة للميثيسيلين, لا تتداخل مع حساسية الزيوت الأساسية المختبرة .

كما أن التركيزات النشطة للزيوت المختبرة هي ذات سمية عالية على *Paramecium sp* خاصة بالنسبة للزيوت الغنية الفينولات المونوتريبينية.

سمح الاشتراك مستخلص الزيت مع مضادات الحيوية إلى تحسين النشاط المضاد للبكتيريا بنسبة 96 % مما أدى في خمس حالات إلى حساسية متوسطة خمس و عشرون حالة أصبحت السلالات حساسة و تآزر تام مع β Lactamines و ذلك في 80 % من الحالات. 50% مع Aminosides و 25% مع Fluoroquinolones.

سمحت إضافة مستخلص الزيت إلى منتج غذائي (اللحم) بانخفاض كبير في عدد البكتيريا, إضافة إلى ذلك تبين أن مستخلص الزيت سمح بقدرة حفظ ممتازة. كما يمكن اقتراح مستخلص الزيت كمصدر طبيعي للمواد الحافظة.

الكلمات المفتاحية : مستخلص *Thymus*, التلوث الميكروبي, المعلبات, حافظ.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A. and Rebiahi S.A., (2011). Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen). *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 1 (1): pp. 33-36.

Adams R.P., (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream, IL, USA: Allured.

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F., (2006). Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turk J Biol.* 30: 239 - 242.

AFNOR., (1986). Recueil des Normes Françaises «huiles essentielles», AFNOR, Paris. P57.

AFNOR NF T 75-006., (2000). Association Française de Normalisation Recueil de normes Française "Huiles essentielles". AFNOR, Paris.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments)., (2006). Fiche de description de dangers transmissibles par les aliments : *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Agent de la yersiniose, pseudotuberculose. AFSSA. P4.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).,(2002). Fiche de description de dangers transmissibles par les aliments : *Salmonella* spp. AFSSA.P6.

Alpin., (2005). La phytothérapie de A à Z. La santé par les plantes. Ed., Alpen, Monaco. P73.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., et Chaouch A., (2010).Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. &Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1) : 141-148.

Amrouni S., Touati M., Hadeff Y., Djahoudi AG., (2014). Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase, *Phytothérapie*. 125-127.

Andre M., (1997). Cette bouffe qui nous tue. Bruxelles.

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Aprotosoiaie AC., Spac AD., Hancianu M., Miron A., Tanasescu VF., Dorneanu V. and Stanescu U., (2010). The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacologia*. 58(1): 46-54.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P., (2011). Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 253643.P8.

Atilia I., Djahoudi A., (2015). Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* (L'Hér.) cultivé en Algérie. *Phytothérapie* DOI 10.1007/s10298-015-0950-2.

Avril JL., Dabernat H., Denis F., Monteil H., (1992). Bactériologie clinique, 2^{ème} édition, Ed., Marketing. 268-276.

Azzouz Z., Berrebbah H., et Djebbar MR., (2011). Optimization of *Paramecium tetraurelia* growth kinetics and its sensitivity to combined effects of azoxystrobin and cyproconazole. *African Journal of Microbiology Research*. 5(20): 3243-3250.

B

Baba-Aïssa F. (2000), Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.

Bailly JD., Brugere H., Chadron H., (2012). Microorganismes et Parasites des Viandes : les Connaître pour les Maîtriser de l'Éleveur au Consommateur. CIV. P150.

Bakkali AB., Averbeck AD., Averbeck AM., Idaomar B., (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.

Barnes J, Anderson A, Phillipson L, David J. Herbal medicines. 2ième édition. Grande- Bretagne: *Pharmaceutical Press*; 2002.

Bartozewics M., Hansen BM., Swiecika I., (2008). The members of *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat- treated milk. *Food Microbiology*.25: 588-596.

Beal DL., and Anderson RV., (1993). Response of Zooplankton to rotenone in a small pond. *Bull. Environ. Contam.Toxicol.* 51: 551-556.

Beaumont et Cassier., (1998). Travaux Pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie, Histologie, 3ème édition DUNOD.

Beisson J., Be´termier M., Bre´ M., Cohen J., Duharcourt S., Duret L., Kung C., Malinsky S., Meyer E., Preer JR., (2010). *Paramecium tetraurelia*: the renaissance of an early unicellular model. Cold Spring Harb. Protoc, pdb. emo140.

Bellekhdar J.,(1997). Pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaire. Paris, Edit. Ibis Press. P764.

Benbouzid H., Berrebbah H., Berredjem M., Djebbar MR., (2012). Toxic effects of phosphoramidate on *Paramecium sp.* with special emphasis on respiratory metabolism, growth, and generation time. *Toxicological & Environmental Chemistry.* 655-696.

Benini C., (2007). Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux. P109.

Beniston NT., Beniston WS., (1984). Flore d'Algérie. Entreprise Nationale du Livre. Alger, P99.

Benjilali B., Hammouni M., Richard H., (1987). Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. *Sci. Aliments.* 7 : 77-91.

Benjilali B., (2004).Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Le pharmacien du Maghreb.

Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hadeif Y. and Chefrour A., (2013). Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis L.*) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences.* 7(8) : 814-819.

Benslimani A., (2011). Techniques. In : Réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries (Eds). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire, 6^{ème} édition. 23-37.

Benslimani A., (2012). Techniques. In : Réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries (Eds) Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire, 7^{ème} édition. 23-37.

Bermer PJ., Fletcher GC., (Avril 2004). Osborne, Institut Nouvelle- Zeland pour la compagne agricole et de la recherche alimentaire limite d'un institut de la recherche de la couronne.

Binstock G., (1998). Sorbate-Nitrite. Reaction in meat products. Buenos Aires University.

Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T., (1999). Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. Spectra Analysis. 207: 11-25.

Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali NS., Abrini J., (2006). Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès International de Biochimie. Agadir. 09: 12.

Boulard B. Plantes médicinales du Monde. 2002.

Bounatirou S., Smiti S., Miguel MG., Faleiro L., Rajeb MN., Nefatti M., Costa MM., Figueiredo AC., Barroso JG., Pedro LG., (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus*. *Food Chemistry*.105(1):146–155.

Bourgeois CM., (1992). Additifs conservateurs (antibactériens, antifongiques). In MultonJ.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.2ème Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris.169- 190.

Bourgeois CM., Mescle JF., Zucca J.,(1996). La microflore de la viande. In Microbiologie Alimentaire: Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité des Aliments. Lavoisier Tec & Doc, Paris. P672.

Bousbia N., (2004). Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. Mémoire de magistère. Institut National Agronomique, El Harrach, Alger. P130.

Bousmaha L., Atik Bekkara F., Tomi F., Casanova J., (2007). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 19 : 490–493.

Bruneton J., (1993). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} édition TEC & DOC- Lavoisier, Paris. 406-417.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, 3^{ème} édition, Lassay les chateaux, Europe Média Duplication S.A. 446-497.

Bruneton J., (2008). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition, Paris, Tec & Doc- Editions médicales internationales. P1188.

Brunellere Y., (2010). Décrypter les étiquettes alimentaires. Ed Paris.

Burt S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.

Burt S., Van der Zee R., Koets AP., De Graaff AM., Knapen F., Gaastra W., Aagsman HP and Veldhuizen EJA., (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology.* 73 (14): 4484–4490.

C

Caillet S. et Lacroix M., (2007). Les huiles essentielles : Leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaires. Laboratoire de Recherche en Science Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-Institut Armand Frappier, Université de Laval (Québec).

Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., Akpulat HA., (2003) Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 87: 215-220.

Cavalli S.,(2003). Application de la méthode HACCP en établissement d'abattage : modèles théoriques et essai de mise en place. Thèse de Médecine Vétérinaire, ENVL, Lyon. P132.

Chahardehi AM., Ibrahim D., and Sulaiman SF., (2010). Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of pileamicrophylla. *International Journal of Microbiology*, Article ID.826830. P6.

Chamouleau A., (1979). Les usages externes de la phytothérapie. Ed. Maloine S. A paris. P270.

Changeur Nicolas MC., (2009). Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides).

Chao SC., Young DG. et Oberg GJ., (2000). Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12 (Sep/Oct 2000): 639-649.

Chemat F., Tomao V., Et Viot M., (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In *Handbook of Food Analysis Instruments* by Semith ötles, Boca Raton, Florida, USA : CRC Press. 85 – 103.

CLSI, (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [CA-SFM ; EUCAST], (2014). Volume 2, France.

Cosentino S., Tuberoso CIG., Pisanto B.,Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F., (1999). In vitro antimicrobial Activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils- *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130-135.

Coste H. Flore descriptive et illustrée de la France, de la corse et des contrées limitrophes. Librairie Scientifique Et Technique Albert Blanchard ; 2002.

Cressy HK., Jerret AR., Osborne CM. and Bremer PJ., (2003). A novel method for the reduction of number of *Listeria monocytogenes* by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *Journal of Food Protection*. 66: 390-395.

Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., (2005). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.55 (15): 6300–6308.

Cristani M., d'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro MG., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activities. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6300-6308.

D

De Sousa AC., Alviano DS., Blank AF., Alves PB., Alviano CS., Gattass CR., (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 56:677-681.

Delmas G., Gallay A., Espié E., Haeghebaert S., Pihier N., Weill F-X., (2006). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bull Epidémiol Hebd.* 51-52 : 418-22.

Denes É., Hidri N., (2009). Synergie et antagonisme en antibiothérapie. *Antibiotiques.* 11: 106-115.

Denil, M., & Lannoye, P. (2001). Guide des additifs alimentaires: les précautions à prendre. Frison-Roche.

Derwich E., Benziane Z. et Boukir A., (2010). GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 191-198.

Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F. G., (2009). Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst. Appl. Microbiol.* 32 : 81-90.

Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C.,(2006). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*. *Journal of pharmaceutical biology* (Pharm. Bio.). 44(8): 607-612.

Donna M., (2007). Food additives and hyperactive, P. 3-7-8-9.

Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J., (2007) Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109: 458-463.

Dorman HJ., Deans SG.,(2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-316.

E

Edris AE., (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: *A review. Phytother. Res.* 21: 308-323.

EFSA., (2005), Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp* in foodstuffs. *The EFSA Journal.* 175 : 1- 48.

El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili R., et Farah A.,(2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Bot. Gallica*, 157 (2): 285-294.

Elhabazi K., Ouacherif A., Laroubi A., Aboufatima R., Abbad A., Benharref A., Ziyad A., Chait A. & Dalal A.,(2008). Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satureioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2 : 262-267.

Emberger L., et Chadeaud M., (1960). *Traité de Botanique (systématique)* édition Masson et Libraire de l'Académie de Médecine. Paris. P753.

Eric Scholar., (2008). *The Comprehensive Pharmacology.* Repère médical.

Eslava C., Villaseca J., Hernandez U., Cravioto A.,(2003). *Escherichia coli* (123-135). In *International Handbook of Foodborne Pathogens*, Miliotis MD, Bier JW (eds).

Euzeby JP.,(2007). *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.*

F

Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui NE., Pagès JM., Hassani L., (2012). Activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils

against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*. 19: 464- 471.

Faleiro ML., Miguel MG., Ladeiro F., Venâncio F., Tavares R., Brito JC., Figueiredo AC., Barroso JG. & Pedro LG.,(2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Let. Appl. Microbiol.* 36 : 35–40.

Fauchère JL., Avril JL., (2002). Bactériologie générale et médicale. Ed., Ellipse. 213-281.

F.B., (1996). Parfums Cosmétiques Actualités. 130 : 49-54.

Fellah S., Romadhane M., Abderraba M., (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de *Salvia officinalis*. L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie J.Soc.Chim.* 16(2) : 193-202.

Fernandes R.,(2009). Chilled and frozen raw meat, poultry and their products (1-52). In *Microbiology Handbook Meat Products*. Leatherhead Publishing, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, UK and Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park Milton Road: Cambridge. P 297.

Fosse J., Margas C.,(2004). Dangers Biologiques et Consommation des Viandes. Ed Lavoisier: Paris. P 220.

Franchome P., (1981). Note préliminaire sur la complexité biochimique et les potentialités thérapeutiques des huiles essentielles. *Phytomedecine*. 13-23.

Franchomme P., (1981). L'aromatologie à visée anti-infectieuse. *Phytomedecine*. 1-2, 25-47.

François, Chomar M., Weber M., Gerard A., (2003). De l'antibiogramme à la prescription. Biomerieux, 2ème édition. 8-22.

Friedman CR., Neimann J., Wegener HC., Taux RV., (2000). Epidemiology of *campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *campylobacter*, Second Edition, Nachamkin I & M.J. Blaser, eds. ASM Press, Washington DC, USA. 121-138.

From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V., Granum PE., (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus spp.* Outside the *Bacillus cereus*. Group, *Applied and Environmental Microbiology*. 71(3): 1178-1183.

G

García-López ML., Prieto M., Otero A.,(1998). The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products (1- 34). In *The Microbiology of Meat and Poultry*, Davies A, Board R (eds). Blackie Academic and Professional: London UK. P 247.

George DR., Smith TJ., Shiel RS., Sparagano OAE., Guy GH., (2009). Mode of action and variability of efficacy in plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanys susgallinae*. *Vet. Parasitol.* 161: 276-282.

Ghafir Y., Daube G.,(2007). Le point sur les méthodes de surveillance de la contamination microbienne des denrées alimentaires d'origine animale. *Ann. Méd. Vét.* 151: 79-100.

Gherman C., Culea M., Cozar O., (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. *Talanta*. 53: 253-262.

Ghorab H., Kabouche A., Kabouche Z., (2014). Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (1): 298-303.

Ghorab H., Kabouche A., Semra Z., Ghannadi A., Sajjadi EB., Touzani R., and Kabbouche Z., (2013). Biological activities and composition of the essential oil from *Thymus ciliatus* from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*. 5(1) : 28-32.

Giannella RA., (1996). "*Salmonella*". In Baron S et al (eds.). *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Baron S et al (eds.). baron de la microbiologie médicale (4 e éd.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

Gill AO., Holley RA., (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 361-379.

Goetz P. (2004) Plaidoyer pour la tisane médicinale, *Phytothérapie*, 1, 8-15.

Gouget C., (2011). Additifs alimentaires dangereux.

Gouget, Corinne. Additifs alimentaires Danger. 2008.

Granum PE., (1994). *Bacillus cereus* and its toxins, *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 23: 615-665.

Guignard JL.,(1998). Abrégé botanique. 2ème Edition Masson. Paris. P 199.

Guinebretière MH., Fagerlund A., Granum PE., Nguyen., (2006). The C. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol Lett.* 259:74-80.

Guinoiseau E., (2010). Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. P 50.

Guiraud JP.,(2003). Microbiologie alimentaire. Ed. Paris : Dunod. P 653.

H

Haddouchi F., Benmansour A., (2008). Huiles essentielles, utilisations et activité biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire, Article de synthèse. 8: 1-8.

Hadef Y., Kaloustian J., Giordan R., Regli P., Chefrou A., Abou L., Mikail C., Portugal H., (2004). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie, 6^{ème} symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France. P 5.

Hanes D., (2003). Nontyphoid *Salmonella* (137- 149). In International Handbook of Food-borne Pathogens, Miliotis MD, Bier JW (eds). Marcel Dekker: New York. P 688.

Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A.. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and Purification Technology. 54: 44-50.

Hilan C., Sfeir R., Jawish D. et Aitour S., (2006). Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des *Lamiaceae*. Lebanese Science Journal. 7 : 2.

Ho CL., Wang EIC., and Su YC., (2009). Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. 31 (2): 77-96.

Holley RA., & Patel D., (2005). Improvement of shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22: 273-292.

Hu L., Kopecko DJ.,(2003). *Campylobacter* Species (181-198). In International Handbook of Foodborne Pathogens.Marcel Dekker: New York. P 688.

Hubert S., (1997).Allergies reconnues à certains colorants et aux sulfites.

Hyltdgaard M., Mygind T., Meyer RL., (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interaction with food matrix components. *Frontier in Microbiology*. 3: 1-24.

I

Inouye S., Abe S., (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*. 1 : 2-4.

Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Ildrissi A., Camporese A., Sosa S., Altinier G., Della Loggia R. & Aquino R.,(2004). In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 91(1):31-6.

J

Jalas J.,(1971). Notes on *Thymus* L. (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.* 64: 199–215

Juiliani RH., Korach A., Simon JE., Hitimana N., Daka A., Ranarivelo L., LangenhovenP.,(2006). Quality of geranium (*Pelargonium sp.*) Case studies in Southern and Eastern Africa. *Journal of essential oil research*. 18: 116-121.

K

Kabouche N., Boutaghane S., Laggoune A., Kabouche Z., Ait-Kaki K., Benlabed., (2005).Comparative antibacterial activity of five *Lamiaceae* essential oils from Algeria. *Int J Aromather.* 15: 129–133.

Kalemba D., Kunicka A.,(2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.

Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H.,(2006). Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.*72: 1330-1334.

Karoussou R., Koureas DN.& Kokkini S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Photochemistry*. 66: 2668-2673.

Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G., Joly-Guillou ML., (2011). Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research. *Pathologie Biologie*. 59: 39-43.

Khadira., Bendahou M., Benbelaid F., Abdoune MA., Abdelouahid DE., (2013). Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie*. 11: 353-58.

Klaric MS., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. & Pepeljnak S., (2006). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (1): 36-42.

Kouch M., Bennadja S., Djahoudi AG., Aouadi S., (2014). Antipseudomonal Activity of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 25(2): 149-153.

Kraft K., Hobbs C. (2004) Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. p16.

Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg HD., Schiefer HG., Slenczka W., Vongraevenitz A., Zahner H.,(2003). Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. ASM Press: Washington. P456.

L

Labbe R., (1989). *Clostridium perfringens*. In Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle M. P. (Ed.), Marcel Dekker, New York. 191-234.

Labbé RG., García SP., (2001). *Escherichia coli* (143-162). In Guide to Foodborne Pathogens, (Eds). John Wiley and Son : New York. P 400.

Lahlou M., (2004). Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 435-448.

Langeron M., (1934). Précis de microscopie. Collect. Précis médicaux. Masson & Cie, Paris. P1205.

Larouche G., (2001). Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui. Pharmacothérapie théorique. Pharmacothérapie théorique. ed Pharmactuel.

Leveau JY., Marielle B., Larpent Jp., (2001). Sécurité microbiologique des procédés alimentaires.

Logan NA., Rodrigez-Diaz M., (2006). *Bacillus spp.* And Related Genera. In Gillespie S.H., Hawkey P.M. (Eds.) : Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2nd edition, John Wiley and Sons Ltd. 139-158.

Loziene K., Venskutonis PR., Sipailiene A., Labokas J.,(2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*. 103 : 546-559.

Lund T., De Buyser ML., Granum PE., (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol*.38:254-61.

M

Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F., (2010). Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine*. 17: 548-550.

Mantle D., Anderton JG., Falkous G., Barnes M., Jones P., Perry EK., (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis

of medicinal plant essential oils. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*121: 385-391.

Manuel terrestre de l'OIE 2005 chapitre (2.10.8).

Marie-laure André., (2013). Les additifs alimentaires. Ed jouvence.

Marin PD., Grayer RJ., Kite GC., & Veljic M., (2005). External flavones from *Thymus striatus* Vahl (*Lamiaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 1179-1182.

Martini MC., Seiller M., (1999). Actifs et additifs en cosmétologie. Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2^{ème} édition, Paris. P431.

Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Khemiss F., Chekir GL., Boukef K., (2006). Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *Journal of Food Agriculture and Environment.* 4(3-4): 61-65.

Mbarek LA., Mouse HA., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Ziad A., (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol. Res.*40: 839-847.

Mead C., (2007). Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs. Published Woodhead Limited and CRC press, ambridge CB21 6AH, LLC; England. P335.

Meynadier JM., Raison-Peyron N., (1997). Allergie aux parfums. *Re. Fr. Allergol.* 37 (5): 641-650.

Miller RE., McConville MJ., Woodrow IE., (2006). Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (*Lamiaceae*). *Phytochemistry.* 67: 43-51.

Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh ZHM., (2009). Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.* 11(1): 59-63.

Moll M., (2000). Précis des risques alimentaires. Ed Paris.

Morales R., (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup, E., Saez, F. (Eds.), *Thyme: The Genus Thymus*. Taylor & Francis, London. 1-43.

Multon JL., (1992). Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires. Collection sciences et techniques, collection sciences et techniques. « Précis des risques alimentaires » 2ème édition, Moll M, Moll N, Edition TEC et DOC, Lavoisier.

Murray PR., Baron EJ., Tenover JC., Tenover FC., (2007). *Manuel of Clinical Microbiology*, 9th edition, American Society of Microbiology Press.

N

Naghdi BH., Yazdani D., Mohammad Ali S., Nazari F., (2004). Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products*. 19: 231-236.

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

Napoli EM., Curcuruto G., & Ruberto G., (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochem. Syst. Ecol.* 38: 816–822.

Naghbi F., Mosaddegh M., Mohammadi MS., et Ghorbani A., (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2: 63-79.

Naigre R., Klack P., Roques GC., Roux I., Michel G., (1996). Comparaison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Plant med.* 62: 275-277.

Nedorostova L., Koucek P., Kokoskal L., Stolcova M., Pulkrabek J., (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against food born bacteria. *Food control*. 20: 157- 160.

Nessrien M.N.Y. and Mohamed A.T., (2007). Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1): pp. 01-09.

Nguefack J., Budde BB., Jakobsen M., (2004). Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett. Appl. Microbiol.* 39: 395-400.

Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R., (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry.* 90: 609-611.

O

Olle M., and Bender I., (2010). The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research.* 8(3): 687-696.

Ormeno E., Fernandez C., Mevy JP., (2007). Plant coexistence alters terpene emission and content of mediterranean species. *Phytochemistry.* 68: 840-852.

Oudiot C., (1992). Rôle et intérêt des additifs alimentaires en technologie alimentaire. In Multon J.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 2ème Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris. 34-45

Oudiot C.,(1999). La transformation des aliments: Génie alimentaire. Ed. Casteilla, France . P79.

Ould El Hadj MD., Hadj-mahammed M., Zabeirou H., (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir.* 03: 47-51.

Oussou KR., Yolou S., Boti JB., Guessennnd KN., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., (2004). Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research.* 24(1): 94-103.

Oussou KR., Kanko C., Guessend N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., Guessan YTN., Figueredo G., Chalchat JC., (2008). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes de Côte d’Ivoire. *C.R. Chimie.* (7) : 1081-1086.

Ozcan M., Chalchat JC., (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing in Turkey – Bulge J . *Plant Physiol.* 30(3-4): 68 -73.

P

Pascal G., (1979). Les antioxygènes alimentaires. Cahier de Nutrition et de Diététique, N°14, pp.271-290.

Patrone V., Campana R., Vittoria E. and Baffone W.,(2010). In Vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 60: pp. 237-241.

Pelczar MJ., Chan ECS., and Krieg NR., (1988). Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In *Microbiology* New York: McGraw-Hill International. 469–509.

Pibiri MC., (2006). Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. 28-52.

Piochon M., (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.

Poiret JLM.,1785 & 1786. Voyage en Barbarie, ou Lettres écrites de l'ancienne Numidie. Seconde partie : recherches sur les sciences naturelles. Libraire, rue du Hurepoix. 13 : 187.

Ponce AG., Fritz R., DE L., Valle C., Roura SI., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the vative microflora of organic Swiss chard, *Lebensm-wiss. U-technol.* 36: 679-684.

Prescott L., Harley J., Klein D., (2010). Microbiologie 3^{ème} Ed., De Boeck. 520-582.

Q

Quezel P., et Santa S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Ed., CNRS. Paris. P 565.

Quezel P., et Santa S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS. Paris. P 805.

R

Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H.S., Raherimandimby M. et Danthu P., (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. Food Chemistry. 114: 680-684.

Rasooli I., Mirmostafa S.A., (2002). Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. Fitoterapia. 73: 244-250.

Rasooli I., Rezaei M.B. & Allameh A., (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int. J. Infect. Dis. 10: 236-241.

Ray B., (2001). Indicators of bacterial pathogens (409-417). In Fundamental Food Microbiology, Ray B (ed). CRC Press: Boca Raton. P 355.

Rhayour K., (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* ; Thèse de Doctorat National. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences Dhar Mehraz -Fès-.

Robin-Browne R.M., Hartland E.L.,(2003). *Yersinia* species (323-355). In International Handbook of Foodborne Pathogens.: Marcel Dekker: New York. P 688.

Rosato A., Vitali C., Gallo D., Balenzano L., Mallamaci R., (2008). The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 15: 635–638.

Rozier J., Carlier V. et Bolnot F., (1986). Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments. É d. SAPALC. Paris. pp. 130-143.

Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordàn M.J., (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 19: 681-687.

S

Saez F., Stahl-Biskup E., (2002). Thyme, The genus *Thymus*. *Taylor and Francis*. P 331.

Sagdic O., (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thym and origano hydrosols. *LWT- Food Science and Technology*. 36(5) : 467-473.

Sallé JL. Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. (1991) Frison-roche.

Saidj F., (2006). Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus kabylica*. Thèse de Magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques ; université M'Hamed Bougara-Boumerdes.

Sandri IG., Zacaria J., Fracaro F., Delamare APL. et Echeverrigaray S., (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against food borne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*. 103: 823-828.

Sauvant MP., Pepin D., and Piccini E., (1999). *Tetrahymena pyriformis*. A tool for toxicological studies. *Chemosphere*. 38(7): 1631-1669.

Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin AC., (2007). Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. Taylor & Francis Group.

Shiota M., Saitou K., Mizumoto H., Matsusaka M., Agata N, Nakayama M., (2010). Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. *Pediatrics*. 125: 951-955.

Siani AC., Ramos MF., Menezes-de-Lima OJR., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares RO., Rosas EC., Susunaga GS., Guimaraes AC., Zoghbi MG., Henriques MG., (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol*. 66: 57-69.

Sikkema J., De Bont JAM., Poolman B., (1995). Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev*. 59: 201–222.

Silva F., Ferreira S., Duarte A., Mendonca DI., Domingues FC., (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil : its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 19: 42-47.

Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lamas T., and Arsenakis M., (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1202-1205.

Smelt JPPM., Bos AP., Kort R., Brul S., (2008). Modelling the effect of sub (lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology.* 128 : 34-40.

Société suisse pour la protection (SPE) (1987). Les agents conservateurs (luttés contre les microbes et les réactions chimiques). In Additifs alimentaires – souvent superflus parfois bienvenus-. 2ème Ed. GERG, Genève. 83-93.

Soto-Mendivil EA., Moreno-Rodriguez JF., Estarron-Espinosa M., Garcia-Fajardo JA., et Obledo-Vazquez EN., (2006). Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*- E-Gnosis [online]. 4: 16.

Souverien R.,(1992). Définitions et classements. In Multon J.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.2ème Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris. 3-31.

Stratton CW., (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J.* 48: 186-198.

T

Tepe B., Sokmen M., Akpulat HA.,Daferera D.,Polissiou M., Sokmen A., (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp .sipyleus var . sipyleus and *Thymus sipyleus* subsp . sipyleus var . rosulans. *Journal of Food Engineering.* 66: 447-454.

Thomas J., (2006). New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discovery Today.* 6 ed.

Tortora GJ., Funke BR., Case CL., (2012). Introduction à la microbiologie. 2^{ème}Ed., ERPI Science.141-145.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M., Venuti V., Cristani M., Daniel C., (2005). Mecanisme of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*49: 2474-2478.

U

Utree A., Slump RA., Steging G., et Smid EJ., (2002). Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection.* 63: 620-624.

Ultee A., Bennik MHJ., Moezelaar R., (2002). The phenolic hydroxyl group of Carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (68): 1561-1568.

Union Européenne, règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L 338/24.

Unlu M., Daferera D., Donmez E., Polissiou M., Tepe B., Sokmen A., (2002).Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.*83: 117-121.

V

Valnet J, Duraffourd C. Abc De la phytothérapie dans les maladies infectieuses. Ed Jaques Grancher ; 1998.

Valnet M., (2005).Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* intyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology.*85: 73-81.

Vincent MC., (1991). L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie. 4, Paris 6.

W

Weather Stastics: Annaba, Algeria, Sur [Www.Weatherbase.Com](http://www.Weatherbase.Com), 2011 Mars.

Wendakoon CN., Sakaguchi M., (1995). Inhibition of aminic acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Protect.* 58: 280-283.

Wichterman NR., (1953). The Biology of *Paramecium*. BIakiseon (Pa). P527.

Wichtl M, Anton R. Plantes thérapeutiques (2004) (tradition, pratique officinale, science et thérapeutique). Tec &Doc. 633 p.

Wernli D. *et al.* (2011), “A call for action: The application of the international health regulations to the global threat of antimicrobial resistance”, *PLOS Med*

Wong CK., Cheung., Ming-Ho., (1999). Toxicological assesement of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate *Dunaliella tertiolecta*. Environmental pollution. 105: 175-183.

Y

Yahi N. & Benhouhou S., (2011). Algérie. In: Zones importantes pour les plantes en Mediterranee meridionale et orientale: sites prioritaires pour la conservation (Radford E.A., Catullo G. & Montmollin B. de, eds): 38-42.

Z

Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub A. et Gharsallah N., (2011). The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*. 10: 161.

Zhiri A., Baudoux D., (2005). Les huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir development. S.A, Luxembourg. P 84.

INTRODUCTION

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments, notamment à l'abri des contaminations microbiennes qui sont les plus redoutées. Ces dernières conduisent à une diminution de la valeur nutritionnelle, par perte en vitamines, détérioration du goût et même parfois par l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979; Nessrien & Mohamed, 2007).

Pour parer à ce problème il est d'usage, en industrie agroalimentaire, d'ajouter des substances chimiques synthétiques (Patrone *et al.*, 2010). Ayant ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à un but technologique ou organoleptique. Elles peuvent devenir un composant de cette denrée.

On distingue une multitude d'additifs parmi eux les colorants, les antioxydants, les acidifiants, les émulsifiants, les épaississants, les stabilisants, les régulateurs d'acidité et les conservateurs antibactériens (Nakahara *et al.*, 2003). La question la plus préoccupante pour la santé publique reste l'impact des ces composés sur le consommateur (Burt, 2004).

En raison de leurs effets toxiques indésirables à court ou long terme, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités voir interdit dans plusieurs pays. Dans un bon nombre de cas on leur attribut des effets neurotoxiques, mutagènes voir tératogène (Ho *et al.*, 2009;Chahardehi *et al.*, 2010). Parmi eux, les antibiotiques occupent une place significative comme agents conservateurs contre les détériorations microbiennes des produits alimentaires.

Cependant, la surconsommation, l'usage excessif en agroalimentaire, en médecine humaine et vétérinaires a aidé les bactéries a se dotées d'un incroyable pouvoir d'adaptation et développer des résistances permanentes. La question se complique par la non reconnaissance de nouvelles cibles et un ralentissement de la synthèse de nouvelles molécules antibactériennes.

Tout cela justifie le regain d'intérêt porté aux extraits de plantes aromatiques et médicinales. Les pays en voie de développement sont les plus sensibles à ce problème subissant des dommages énormes, menant à des pertes économiques incommensurables et des risques sanitaires majeurs (Ownagh *et al.*, 2010).

Depuis l'antiquité l'Homme utilisait de manière empirique des extraits végétaux entre autre, les huiles essentielles. Bien que ces substances soient surtout toxiques, beaucoup d'auteurs (Rota *et al.*, 2008 ; Kempf *et al.*, 2011; Amrouni *et al.*, 2014 ; Atailia *et al.*, 2015) rapportent un effet antibactérien. Ils contribuent à l'amélioration des qualités gustatives, et

Introduction

sont classées « Généralement reconnue comme saine » (*GRAS*) et approuvée pour un usage alimentaire par l'Agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*) (Lacroix, 2007).

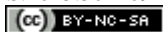
Le thym, plante spontanée, abondante dans le Nord- Est-Algérien, et faisant partie du patrimoine culinaire Algérien, constitue par ailleurs une importante source de molécules bioactives (Bruneton, 2009). Parmi ces substances, les huiles essentielles de composition chimique complexe, et riche en composés actifs, agissent sur diverses cibles cellulaires. Ce qui contribue au règlement de la question grandissante des résistances bactériennes.

En Algérie, douze espèces de Thymus colonisent le territoire, parmi elles *Thymus ciliatus* Desf. et *Thymus numidicus* Poiret. spécifiques du Nord- Est -Algérien. Cependant il n'y'a pas d'études exhaustives mettant en valeur les bienfaits des huiles essentielles de ces deux espèces.

Le présent travail se propose de faire une étude ethnobotanique élaborée sur ces deux espèces d'une part. D'autre par faire un screening chimique des huiles extraites et mettre en valeur leur probable activité antibactérienne par leur utilisation comme conservateur d'une denrée alimentaire sensible et de valeur nutritive essentielle : la viande.

Annexes

Travaux scientifiques



Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria

Sonia HENI¹, Salima BENNADJA², Abdelghani DJAHOUDI^{1,3*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

² Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

³ Laboratory of Microbiology, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 17/08/2015

Revised on: 30/09/2015

Accepted on: 19/10/2015

Available online: 27/12/2015

Key words:

Thymus ciliatus, Essential oil, Antibacterial activity, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The essential oil extracted from the aerial parts of *Thymus ciliatus* harvested in the region of Tawra (North-East of Algeria) gave a yield of 2.5%. Its analysis by GC / MS has allowed the identification of twenty- four elements, mainly phenols and terpenes. The main components were: Thymol (67.78 %), p- cymene (12.25%), pseudo-limonene (5.10 %), and γ -terpinène (4.42 %). Antimicrobial activity was evaluated on two pathogenic foodborne bacterial strains: *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. These pathogens showed high sensitivity with respect to the essential oil with respective inhibition diameters of 28.6 and 40 mm of relatively low MICs of 0.18 mg / ml. Due to these results, we may propose the use of this natural substance as a substitute for additives used in food protection.

INTRODUCTION

Bacillus cereus, a gram-positive rod has a reputation as a foodborne pathogen responsible for poisoning causing diarrheal or emetic syndromes (Tossa *et al.*, 2009). It is an opportunistic associated with certain infection which might endanger the life of immune compromised individuals, such as endophthalmitis, wounds, bacteremia, septicemia, meningitis, pneumonia, endocarditis, pericarditis. It is a ubiquitous saprophyte of the environment, especially the soil, it can be met at all stages of the food production chain. The selection by the heat retaining endospores, is an important factor in the frequency of its isolation as a contaminant. The spore causes deterioration of food after its subsequent germination (Delmas *et al.*, 2010). In Algeria, *B. cereus* is the 4th cause of foodborne outbreaks (INVS, 2004). *Listeria monocytogenes*, saprophytic ubiquitous (soil, plants, water) is an intracellular opportunistic pathogen agent.

Its ability to multiply at 4 °C allows it to reach high concentrations in foods stored in the refrigerator (Viuda *et al.*, 2011). *Listeria* has gained increasing attention as a causative agent of listeriosis, with a mortality rate of 24% (Datta *et al.*, 2003). It is also responsible for, bacteremia, meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, miscarriage, premature births, stillbirths' human births etc. Infection occurs mainly due to the occasional contamination of food products, especially meat (Bubonja *et al.*, 2011; Lauchlin *et al.*, 2004). Many efforts have been made to guard against contamination by such microorganisms by the use of various types of preservatives.

However, capacity of resistance acquisition of these bacteria, forced into a continual search for new antimicrobials. In addition to all the side effects that can generate these chemical conservative substances of synthetic origin. The plant world, presents an inexhaustible and renewable source whose traditional and medical use has been known since a long time. Among the aromatic plant species, the genus of *Thymus* offers a wide variety of natural substances with antimicrobial effects. The aim of this work is to evaluate the effectiveness of essential oil of *Thymus ciliatus*, an abundant endemic plant in the North -east of Algeria on both bacteria *Bacillus cereus* - *Listeria monocytogenes*.

* Corresponding Author

Djahoudi Abdelghani, Postal address: Faculty of Medicine, BP 205, Zaafrania Street, university Badji Mokhtar, Annaba 23000, Algeria.
E-mail: adjahoudi@yahoo.fr

This species of Thyme produces an essential oil that has a very broad spectrum of action since it inhibits the growth of bacteria. This species produces an essential oil rich in phenolic compounds: Thymol and carvacrol, the most active antimicrobial molecules described to date (Kempf *et al.*, 2011). The development of these herbs has affected several areas of the food industry (Ozkan *et al.*, 2010). Where they can be applied as an effective alternative to chemical preservatives controlling pathogens in food products such as *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. These strains are implicated in the contamination of food products stored at room temperature and the deterioration of refrigerated foods; also they are responsible for food poisoning.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

We chose two strains which are implicated, one in the contamination of food products stored at room temperature and the other in the deterioration of refrigerated foods. *Bacillus cereus* originally isolated from a meat dish, preserved and identified by API system (Bio- Mérieux). *Listeria monocytogenes* is part of ATCC, kindly made available to us by the team at the Pasteur Institute in Algiers; were used as the test object.

Essential oil

Plant material

The aerial parts (stems, leaves and flowers) of *Thymus ciliatus* of Tawra in the province of Souk Ahras (Northeastern Algeria) were harvested in full bloom period (May-June 2012). The samples thus collected were dried in the open air and in the shade.

Extraction of essential oil

The essential oil was obtained by steam distillation using a LINKENS- NICKERSON type apparatus. The distillation was carried out by boiling 100 g of dry matter in 1 liter of water in a 2 liter flask surmounted by a column of 60 cm length connected to a condenser (Bruneton, 1999). After an extraction of 2 hours, the oil is recovered in small opaque bottle and stored at 4 °C.

Chemical analysis of the essential oil

Chromatographic analysis of the extracted essential oil was performed on a gas chromatograph coupled to a type of mass spectrometer Shimadzu QP 2010. Column used is SE- 30 type 25 m in length, 0.25m in diameter internally, the film thickness is 0.25 microns. The injection mode is split. Helium was used as carrier gas at a constant pressure of 25.6KPa. The temperatures of the injector and transfer line were brought to 250 °C. The oven temperature was programmed according to the following conditions:

Initial column temperature was 60 °C, increasing the temperature of 3 °C / min to 120 °C, and is kept isothermal for 5 minutes then increased to 10 °C / min to 180 °C. The injected volume was 1µl.

The analysis was performed in mode electron impact (EI) ionization with ionization energy of 70 eV using in scan mode (45-450µ). After obtaining the chromatogram of the essential oil, identification of chromatograms was done by querying the database NIST (National Institute of Standards and Technology). The internal normalization method was used for determining the amount of each component.

Study of the Antibacterial Activity

Aromatogram

The antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* on studied strains was determined by the solid medium diffusion method using sterile filter paper discs. The principle of this method is inspired of AntibioGramas recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and those of the Committee of French Society for Microbiology (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

This test is performed by depositing two sterile discs : one is impregnated with 20µl of the crude essential oil, the other is a witness disk devoid of any substance, on medium Muller-Hinton (MH) previously inoculated by a bacterial suspension concentration equivalent to 0.5 McFarland [$10^6 - 10^8$ CFU / ml] , (CFU= Colony- Forming Unit).

These prepared dishes were incubated at 37 °C for 24h. The antibacterial activity, when present, is estimated by measuring the diameters of zones of inhibition around the discs.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC)

MICs of the oil extracted on the studied bacterial strains were determined by the medium agar incorporation method as recommended by CLSI (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

A range of dilutions of the essential oil in DMSO (dimethylsulfoxide) were prepared so as to obtain Final concentrations of 1%, 0.5 % , 0.4 % , 0.3% , 0.25 % , 0.2% , 0.15 % , 0.1% , 0.075% , 0.05% , 0.025 % and 0.012 % , essential oil per milliliter of culture medium (Djahoudi *et al.*, 2011; Amrouni *et al.*, 2014).

These dilutions are added to MH agar melted and cooled in a water bath at 45 °C. S pots of 2 µl standardized inoculum to 0.5 McFarland are deposited on agar plates using a multi-applicator; witness boxes containing only MH were used as negative control.

All dishes are incubated in an incubator at 37 °C for 24 h. The MIC is defined as the lowest concentration in the presence of which no bacterial growth is visible to the naked eye similar to the growth of the strain on the control box (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Yield of essential oil extracted

The average yield of essential oil of *Thymus ciliatus* was 2.5 %. It is more important than that obtained from *Thymus ciliatus* of Morocco, which is 1.2 % (Amarti *et al.*, 2010). Thus,

Thymus vulgaris essential oil of North America, obtained by steam distillation, gave a lower yield of about 1.8 % (Yaouba *et al.*, 2011). While essential oil *Thymus piperella* of Island of Great Comoro revealed an average yield of 1.31 % (Satrani *et al.*, 2010).

According to the study (Faleiro *et al.*, 2003) on Portuguese Thyme:essential oil of *Thymus mastichina*, established a rather low yield of about 0.5%.

Indeed, these variations in performance can be attributed, not only to the portion of the extracted plant, but also to climatic and environmental factors, the intensity of the metabolism of plants, species, age, the period of gathering and the specific geographical location of this species.

Chemical composition of essential oil extracted

Chemical analysis of the volatile essential oil components *Thymus ciliatus* GC-MS has allowed the identification of twenty four elements representing 99.87 % of total oil (Table-1). It is composed mainly of phenolic monoterpenes represented by Thymol (67.78 %) and carvacrol (2.70 %); followed by hydrogenated monoterpenes , p- cymene (12.25 %) associated to other components at relatively low levels, such as the pseudo-limonene (5.10 %) , the γ -terpinene (4.42 %).

Our results are similar to those of Cherchar *et al.*, (2014) which showed that the essential oil of *T. ciliatus* species from Tlemcen (West Algeria) consists essentially of Thymol (60.52 %) followed by p-cymene (17.2%) and γ -terpinene (8.03%), while carvacrol is (0.2%).

Indeed, the same results were obtained for the essential oil of *T. vulgaris* collected in the city of Ifran located in the Middle Atlas of Morocco which is Thymol chemotype (41.39 %), γ - terpinene (22.25 %) (El ouali *et al.*, 2013).

Thus, essential oil of *T. serpyllum* of western Himalayas (Kumaon region), has the same major compounds but with different percentages dominated by Thymol (60.1 %), followed by γ -terpinene (13.8 %) and of p-cymene (10.4 %) (El ouali *et al.*, 2013).

By cons, another Tunisian variety of *T. capitata* (Zaghouan region) has a completely different composition from that of *T. ciliatus* with comparable percentages; carvacrol (88.98 %), p- cymene (1.14 %), Thymol (0.51 %) and γ - terpinene (0.40 %) (El Abed *et al.*, 2014).

Table 1: Chemical composition of essential oil of *Thymus ciliatus*.

Compound Name	RT	Content %
α -Thugène	6.38	0.23%
IR- α -pinène	6.56	0.93%
1-octène-3-ol	7.80	0.78%
α -pinène	8.12	0.45%
β - thugène	8.79	0.01%
α - terpinolène	8.99	1.00%
p-cymène	9.30	12.25%
Limonène	9.41	0.51%
γ -terpinène	10.51	4.42%
3-carène	10.87	0.28%
Pseudo-Limonène	12.14	5.10%
5-isopropyl-2-methylbicyclo[3.1]hexan-2-ol	15.33	0.23%

Thymol methyl ether	17.74	0.93%
Thymoquinone	18.45	0.60%
Thymol	20.54	67.78%
Carvacrol	20.82	2.70%
α -Cubebène	23.73	0.007%
β -bourbonène	24.11	0.02%
Caryophyllène	25.55	0.92%
5-Murolène	27.87	0.06%
Δ -Cadinène	29.74	0.13%
Epi-Bicyclosquiphellandrène	29.37	0.03%
2,5-Dimethoxyethylbenzène	31.26	0.43%
Total:		99.87%

RT: retention time.

Antibacterial activity of essential oil

The diameters of the zones of inhibition around the discs loaded with essential oil are very important and so, class our strains, in the category of extremely sensitive microorganisms. Indeed inhibition diameters were 28.6 mm for *L. monocytogenes* and 40 mm for *B. cereus* and MICs of about 0.18mg / ml (Table-2).

Table 2: Diameter of inhibition and MIC EO of *Thymus ciliatus*.

Bacteria tested	EO of <i>T. ciliatus</i> (S. Ahras)	
	\emptyset (mm)	MIC (mg/ml)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	28.6	0.18
<i>B. cereus</i>	40	0.18

Other studies have shown that the essential oil of *Thymus capitata* harvested in Tunisia (El Abed *et al.*, 2014), has had a more importance activity on *L. monocytogenes* ATCC 19118 and *B. cereus* with an inhibition diameter of 70 to 80mm and MIC least low of 2.5 and 1.25mg/ml for the two respective strains. For this, another essential oil of France *Thymus vulgaris* (Cristani *et al.*, 2007) exerted an inhibitory effect on stem with low MIC 0,45mg / ml.

These values show excellent sensitivity of Gram-positive strains, tested, towards this essential oil. This would be attributed to the particular structure of their less complex membrane consisting of a thin layer of peptidoglycan in which proteins are related. Allowing hydrophobic molecules easily penetrate and act on the cell wall and into the cytoplasm (Burt *et al.*, 2004; Cristani *et al.*, 2007). The antibacterial action of essential oil (EO) of *T. ciliatus* is also related to its high content of phenolic derivatives (Thymol and carvacrol). These may destabilize the cytoplasmic membrane and interfere with energy metabolism and cellular integrity leading to cell death (Ultee *et al.*, 2002; Nguefack *et al.*, 2004; Cristani *et al.*, 2007).

It should be noted that Thymol, main component of our EO, is known for its broad spectrum of antibacterial activity (Dorman *et al.*, 2000). Indeed, Thymol binds to membrane proteins and increased membrane permeability of the bacterial cell.

Other studies suggest that the volatile compound is responsible for the inactivation of enzymes, including those involved in the production of energy and synthesis of Structural components (Trombetta *et al.*, 2005).

On the other hand, hydrogenated monoterpenes such as γ -terpinene and p-cymene are both precursors in the biosynthesis

of carvacrol. Present in sufficient quantity (12.25 %), p- cymene facilitates intracellular penetration of carvacrol and potentiating its action (Ultee *et al.*, 2002); it shows a high affinity for cell membranes and may disturb and affect them (Rassouli *et al.*, 2006). Logically, its activity is the first link in the destabilization of cellular integrity process. This antibacterial effect is mainly provided by carvacrol. Thus, it has ATPase inhibitory activity (Gill and Holley, 2006) inducing dissipation proton- motive force by inhibiting other enzymes in the periplasmic space after the treatment of the bacterial cytoplasmic membrane (Ultee *et al.*, 2002; Benarfa *et al.*, 2006 ; Cristani *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2008).

While other minority compounds of our EO such as terpene hydrocarbons, pseudo-limonene known for its low antibacterial activity (Vardar Vnlu *et al.*, 2003; Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008) and α -terpinolene, can exert synergistic interactions. Their target and their mode of action remain to be determined.

CONCLUSION

Listeria monocytogenes and *Bacillus cereus* are two pathogenic bacteria responsible for food poisoning can be fatal. Many efforts have been made to protect food from contamination by this type of microorganisms by the use of various types of preservatives. However, the ability of these bacteria to develop resistance forced a continual search for new antimicrobials.

In this perspective, we were interested in the EO of *Thymus ciliatus* harvested in the region of Tawra (northeastern Algeria), and the GC / MS unveiled its chemotype "Thymol". This oil showed a very good antibacterial activity against pathogenic strains of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*.

This result suggests the use of such molecules in food as a substitute for conventional chemical preservatives. Knowing that in terms of taste, Thyme is much appreciated and constitutes an ingredient in several recipes, this opens the prospect of its use for the prevention and fight against deterioration of food stored at room temperature or 4 °C.

In addition to its economic impact, this EO would contribute to the fight against food poisoning.

REFERENCES

- Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 2010 ;14 : 141-148.
- Amrouni S, Touati M, Hadeff Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase. Phytothérapie, 2014 ;125-127.
- Benarfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antibacterial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol, 2006 ; 43 : 149-154.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier. 3ème édition. 484-488.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram A. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chemistry, 2011; 127(4): 1821-1827.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94: 223-253.
- Cherchar H, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. J Mater Environ Sci, 2014; 5 (1): 298-303.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [CA-SFM ; EUCAST] ; 2014- Volume 2.
- Cristani M, d'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activities. J Agric Food Chem, 2007 ;55: 6300-6308.
- Datta AR, Miliotis MD, Bier JW. 2003. *Listeria monocytogenes*, in International Handbook of Foodborne Pathogens. New York, NY, USA. Marcel Dekker. pp. 105- 121
- Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill FX, Vaillant V, de Valk H. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 2010; 31-32; 344-348.
- Djahoudi A, Toubal O, Bouzabata A. Preliminary Studies and Antimicrobial evaluation of the Aerial Parts of *Genistanumidica ssp. Numidica*. Journal of Life Sciences, 2011;5: 954-959.
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol, 2000; 88: 308-316.
- El Abed N, Kaabi B, Smaali MI, Chabbouh M, Habibi K, Mejri M, Marzouki MN, Ben Hadj Ahmed S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014; 11.
- EL ouali Lalami A, EL-akhal F, Ouedrhiri W, Ouazzani CH, Guemmouh R, Greche H. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology, 2013; 116 (3): 403-406.
- Faleiro MF, Miguel MG, Venancio F, Taveares R, Brito GT, Figueiredo AC, Pedro LG. Antibacterial activity of the essential oils from Portuguese endemic spices of *thymus*. Letter in applied Microbiology, 2003; 36-40.
- Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol, 2006; 111: 361-379.
- INVS. 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire. http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire, Consulté en juin 2011.
- Kempf M, Eveillard M, Kowalczyk F, Rossines E, Panhelleux G, Joly-Guillou ML. Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research. Pathologie Biologie, 2011; 59: 39-43.
- McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal Food Microbiology. 2004; 92(1), 15-33.
- Nejad Ebrahimi S, Hadian J, Mirjalil MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of *thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chemistry, 2008; 110(4): 927-931.
- Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett Appl Microbiol, 2004; 39: 395-400.
- Rassouli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int J Infect Dis, 2006; 10: 236-241.
- Ozkan G, Sagdic O, Gokturk R S, Unal O, Albayrak S. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica*. LWT—Food Science and Technology, 2010 ; 43(1) : 186-190.
- Satrani B, Farah A, Talbi M. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et

Saturejaalpina du Maroc. Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol, 2006 ; 94(956) : 241-250.

Tossa P, Villeroy F, Schaefer JL, Manel J. 2009. Intoxication alimentaire par *Bacillus cereus*: à propos d'un cas d'hépatite fulminante suite à l'ingestion d'un plat de pâtes, 47ème congrès de Société de Toxicologie Clinique, STC, Toulouse, France.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M, Venuti V, Cristani M, Daniel C. Mecanisme of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother, 2005;49: 2474-2478.

Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of Carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol, 2002;68: 1561-1568.

Vardar Vnlü G, Candan F, Sokmen A. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *thymus pectinatus* Fisch ET Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). Journal of Agricultural and food chemistry, 2003;51(1): 63-67.

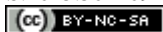
Viuda-Martos M, Mohamadyb MA, Fernandez-Lopez J. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. Food Control, 2011; 22: 1715–1722.

Yaouba A, Tatsadjieu N, Léopold and Mbofung C. Mycelia growth inhibition of some *Aspergillus* and *Fusarium* species by essential oils and their potential use as antiradical agent. Agric Biol J N Am, 2011; 2(11):1362-1367.

Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and Thymol against *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol, 2008;47: 174-179.

How to cite this article:

Heni S, Bennadja S, Djahoudia. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria. J App Pharm Sci, 2015; 5 (12): 056-060.



Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria

Sonia HENI¹, Salima BENNADJA², Abdelghani DJAHOUDI^{1,3*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

² Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

³ Laboratory of Microbiology, Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 17/08/2015

Revised on: 30/09/2015

Accepted on: 19/10/2015

Available online: 27/12/2015

Key words:

Thymus ciliatus, Essential oil, Antibacterial activity, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The essential oil extracted from the aerial parts of *Thymus ciliatus* harvested in the region of Tawra (North-East of Algeria) gave a yield of 2.5%. Its analysis by GC / MS has allowed the identification of twenty- four elements, mainly phenols and terpenes. The main components were: Thymol (67.78 %), p- cymene (12.25%), pseudo-limonene (5.10 %), and γ -terpinène (4.42 %). Antimicrobial activity was evaluated on two pathogenic foodborne bacterial strains: *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. These pathogens showed high sensitivity with respect to the essential oil with respective inhibition diameters of 28.6 and 40 mm of relatively low MICs of 0.18 mg / ml. Due to these results, we may propose the use of this natural substance as a substitute for additives used in food protection.

INTRODUCTION

Bacillus cereus, a gram-positive rod has a reputation as a foodborne pathogen responsible for poisoning causing diarrheal or emetic syndromes (Tossa *et al.*, 2009). It is an opportunistic associated with certain infection which might endanger the life of immune compromised individuals, such as endophthalmitis, wounds, bacteremia, septicemia, meningitis, pneumonia, endocarditis, pericarditis. It is a ubiquitous saprophyte of the environment, especially the soil, it can be met at all stages of the food production chain. The selection by the heat retaining endospores, is an important factor in the frequency of its isolation as a contaminant. The spore causes deterioration of food after its subsequent germination (Delmas *et al.*, 2010). In Algeria, *B. cereus* is the 4th cause of foodborne outbreaks (INVS, 2004). *Listeria monocytogenes*, saprophytic ubiquitous (soil, plants, water) is an intracellular opportunistic pathogen agent.

Its ability to multiply at 4 °C allows it to reach high concentrations in foods stored in the refrigerator (Viuda *et al.*, 2011). *Listeria* has gained increasing attention as a causative agent of listeriosis, with a mortality rate of 24% (Datta *et al.*, 2003). It is also responsible for, bacteremia, meningitis, encephalitis, meningoencephalitis, miscarriage, premature births, stillbirths' human births etc. Infection occurs mainly due to the occasional contamination of food products, especially meat (Bubonja *et al.*, 2011; Lauchlin *et al.*, 2004). Many efforts have been made to guard against contamination by such microorganisms by the use of various types of preservatives.

However, capacity of resistance acquisition of these bacteria, forced into a continual search for new antimicrobials. In addition to all the side effects that can generate these chemical conservative substances of synthetic origin. The plant world, presents an inexhaustible and renewable source whose traditional and medical use has been known since a long time. Among the aromatic plant species, the genus of *Thymus* offers a wide variety of natural substances with antimicrobial effects. The aim of this work is to evaluate the effectiveness of essential oil of *Thymus ciliatus*, an abundant endemic plant in the North -east of Algeria on both bacteria *Bacillus cereus* - *Listeria monocytogenes*.

* Corresponding Author

Djahoudi Abdelghani, Postal address: Faculty of Medicine, BP 205, Zaafrania Street, university Badji Mokhtar, Annaba 23000, Algeria.
E-mail: adjahoudi@yahoo.fr

This species of Thyme produces an essential oil that has a very broad spectrum of action since it inhibits the growth of bacteria. This species produces an essential oil rich in phenolic compounds: Thymol and carvacrol, the most active antimicrobial molecules described to date (Kempf *et al.*, 2011). The development of these herbs has affected several areas of the food industry (Ozkan *et al.*, 2010). Where they can be applied as an effective alternative to chemical preservatives controlling pathogens in food products such as *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. These strains are implicated in the contamination of food products stored at room temperature and the deterioration of refrigerated foods; also they are responsible for food poisoning.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

We chose two strains which are implicated, one in the contamination of food products stored at room temperature and the other in the deterioration of refrigerated foods. *Bacillus cereus* originally isolated from a meat dish, preserved and identified by API system (Bio- Mérieux). *Listeria monocytogenes* is part of ATCC, kindly made available to us by the team at the Pasteur Institute in Algiers; were used as the test object.

Essential oil

Plant material

The aerial parts (stems, leaves and flowers) of *Thymus ciliatus* of Tawra in the province of Souk Ahras (Northeastern Algeria) were harvested in full bloom period (May-June 2012). The samples thus collected were dried in the open air and in the shade.

Extraction of essential oil

The essential oil was obtained by steam distillation using a LINKENS- NICKERSON type apparatus. The distillation was carried out by boiling 100 g of dry matter in 1 liter of water in a 2 liter flask surmounted by a column of 60 cm length connected to a condenser (Bruneton, 1999). After an extraction of 2 hours, the oil is recovered in small opaque bottle and stored at 4 °C.

Chemical analysis of the essential oil

Chromatographic analysis of the extracted essential oil was performed on a gas chromatograph coupled to a type of mass spectrometer Shimadzu QP 2010. Column used is SE- 30 type 25 m in length, 0.25m in diameter internally, the film thickness is 0.25 microns. The injection mode is split. Helium was used as carrier gas at a constant pressure of 25.6KPa. The temperatures of the injector and transfer line were brought to 250 °C. The oven temperature was programmed according to the following conditions:

Initial column temperature was 60 °C, increasing the temperature of 3 °C / min to 120 °C, and is kept isothermal for 5 minutes then increased to 10 °C / min to 180 °C. The injected volume was 1µl.

The analysis was performed in mode electron impact (EI) ionization with ionization energy of 70 eV using in scan mode (45-450µ). After obtaining the chromatogram of the essential oil, identification of chromatograms was done by querying the database NIST (National Institute of Standards and Technology). The internal normalization method was used for determining the amount of each component.

Study of the Antibacterial Activity

Aromatogram

The antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* on studied strains was determined by the solid medium diffusion method using sterile filter paper discs. The principle of this method is inspired of Antibiogramas recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) and those of the Committee of French Society for Microbiology (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

This test is performed by depositing two sterile discs : one is impregnated with 20µl of the crude essential oil, the other is a witness disk devoid of any substance, on medium Muller-Hinton (MH) previously inoculated by a bacterial suspension concentration equivalent to 0.5 McFarland [$10^6 - 10^8$ CFU / ml] , (CFU= Colony- Forming Unit).

These prepared dishes were incubated at 37 °C for 24h. The antibacterial activity, when present, is estimated by measuring the diameters of zones of inhibition around the discs.

Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC)

MICs of the oil extracted on the studied bacterial strains were determined by the medium agar incorporation method as recommended by CLSI (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

A range of dilutions of the essential oil in DMSO (dimethylsulfoxide) were prepared so as to obtain Final concentrations of 1%, 0.5 % , 0.4 % , 0.3% , 0.25 % , 0.2% , 0.15 % , 0.1% , 0.075% , 0.05% , 0.025 % and 0.012 % , essential oil per milliliter of culture medium (Djahoudi *et al.*, 2011; Amrouni *et al.*, 2014).

These dilutions are added to MH agar melted and cooled in a water bath at 45 °C. S pots of 2 µl standardized inoculum to 0.5 McFarland are deposited on agar plates using a multi-applicator; witness boxes containing only MH were used as negative control.

All dishes are incubated in an incubator at 37 °C for 24 h. The MIC is defined as the lowest concentration in the presence of which no bacterial growth is visible to the naked eye similar to the growth of the strain on the control box (CA-SFM ; EUCAST ; 2014).

RESULTS AND DISCUSSION

Yield of essential oil extracted

The average yield of essential oil of *Thymus ciliatus* was 2.5 %. It is more important than that obtained from *Thymus ciliatus* of Morocco, which is 1.2 % (Amarti *et al.*, 2010). Thus,

Thymus vulgaris essential oil of North America, obtained by steam distillation, gave a lower yield of about 1.8 % (Yaouba *et al.*, 2011). While essential oil *Thymus piperella* of Island of Great Comoro revealed an average yield of 1.31 % (Satrani *et al.*, 2010).

According to the study (Faleiro *et al.*, 2003) on Portuguese Thyme:essential oil of *Thymus mastichina*, established a rather low yield of about 0.5%.

Indeed, these variations in performance can be attributed, not only to the portion of the extracted plant, but also to climatic and environmental factors, the intensity of the metabolism of plants, species, age, the period of gathering and the specific geographical location of this species.

Chemical composition of essential oil extracted

Chemical analysis of the volatile essential oil components *Thymus ciliatus* GC-MS has allowed the identification of twenty four elements representing 99.87 % of total oil (Table-1). It is composed mainly of phenolic monoterpenes represented by Thymol (67.78 %) and carvacrol (2.70 %); followed by hydrogenated monoterpenes , p- cymene (12.25 %) associated to other components at relatively low levels, such as the pseudo-limonene (5.10 %) , the γ -terpinene (4.42 %).

Our results are similar to those of Cherchar *et al.*, (2014) which showed that the essential oil of *T. ciliatus* species from Tlemcen (West Algeria) consists essentially of Thymol (60.52 %) followed by p-cymene (17.2%) and γ -terpinene (8.03%), while carvacrol is (0.2%).

Indeed, the same results were obtained for the essential oil of *T. vulgaris* collected in the city of Ifran located in the Middle Atlas of Morocco which is Thymol chemotype (41.39 %), γ - terpinene (22.25 %) (El ouali *et al.*, 2013).

Thus, essential oil of *T. serpyllum* of western Himalayas (Kumaon region), has the same major compounds but with different percentages dominated by Thymol (60.1 %), followed by γ -terpinene (13.8 %) and of p-cymene (10.4 %) (El ouali *et al.*, 2013).

By cons, another Tunisian variety of *T. capitata* (Zaghouan region) has a completely different composition from that of *T. ciliatus* with comparable percentages; carvacrol (88.98 %), p- cymene (1.14 %), Thymol (0.51 %) and γ - terpinene (0.40 %) (El Abed *et al.*, 2014).

Table 1: Chemical composition of essential oil of *Thymus ciliatus*.

Compound Name	RT	Content %
α -Thugène	6.38	0.23%
IR- α -pinène	6.56	0.93%
1-octène-3-ol	7.80	0.78%
α -pinène	8.12	0.45%
β - thugène	8.79	0.01%
α - terpinolène	8.99	1.00%
p-cymène	9.30	12.25%
Limonène	9.41	0.51%
γ -terpinène	10.51	4.42%
3-carène	10.87	0.28%
Pseudo-Limonène	12.14	5.10%
5-isopropyl-2-methylbicyclo[3.1]hexan-2-ol	15.33	0.23%

Thymol methyl ether	17.74	0.93%
Thymoquinone	18.45	0.60%
Thymol	20.54	67.78%
Carvacrol	20.82	2.70%
α -Cubebène	23.73	0.007%
β -bourbonène	24.11	0.02%
Caryophyllène	25.55	0.92%
5-Murolène	27.87	0.06%
Δ -Cadinène	29.74	0.13%
Epi-Bicyclosquiphellandrène	29.37	0.03%
2,5-Dimethoxyethylbenzène	31.26	0.43%
Total:		99.87%

RT: retention time.

Antibacterial activity of essential oil

The diameters of the zones of inhibition around the discs loaded with essential oil are very important and so, class our strains, in the category of extremely sensitive microorganisms. Indeed inhibition diameters were 28.6 mm for *L. monocytogenes* and 40 mm for *B. cereus* and MICs of about 0.18mg / ml (Table-2).

Table 2: Diameter of inhibition and MIC EO of *Thymus ciliatus*.

Bacteria tested	EO of <i>T. ciliatus</i> (S. Ahras)	
	\emptyset (mm)	MIC (mg/ml)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	28.6	0.18
<i>B. cereus</i>	40	0.18

Other studies have shown that the essential oil of *Thymus capitata* harvested in Tunisia (El Abed *et al.*, 2014), has had a more importance activity on *L. monocytogenes* ATCC 19118 and *B. cereus* with an inhibition diameter of 70 to 80mm and MIC least low of 2.5 and 1.25mg/ml for the two respective strains. For this, another essential oil of France *Thymus vulgaris* (Cristani *et al.*, 2007) exerted an inhibitory effect on stem with low MIC 0,45mg / ml.

These values show excellent sensitivity of Gram-positive strains, tested, towards this essential oil. This would be attributed to the particular structure of their less complex membrane consisting of a thin layer of peptidoglycan in which proteins are related. Allowing hydrophobic molecules easily penetrate and act on the cell wall and into the cytoplasm (Burt *et al.*, 2004; Cristani *et al.*, 2007). The antibacterial action of essential oil (EO) of *T. ciliatus* is also related to its high content of phenolic derivatives (Thymol and carvacrol). These may destabilize the cytoplasmic membrane and interfere with energy metabolism and cellular integrity leading to cell death (Ultee *et al.*, 2002; Nguefack *et al.*, 2004; Cristani *et al.*, 2007).

It should be noted that Thymol, main component of our EO, is known for its broad spectrum of antibacterial activity (Dorman *et al.*, 2000). Indeed, Thymol binds to membrane proteins and increased membrane permeability of the bacterial cell.

Other studies suggest that the volatile compound is responsible for the inactivation of enzymes, including those involved in the production of energy and synthesis of Structural components (Trombetta *et al.*, 2005).

On the other hand, hydrogenated monoterpenes such as γ -terpinene and p-cymene are both precursors in the biosynthesis

of carvacrol. Present in sufficient quantity (12.25 %), p-cymene facilitates intracellular penetration of carvacrol and potentiating its action (Ultee *et al.*, 2002); it shows a high affinity for cell membranes and may disturb and affect them (Rassouli *et al.*, 2006). Logically, its activity is the first link in the destabilization of cellular integrity process. This antibacterial effect is mainly provided by carvacrol. Thus, it has ATPase inhibitory activity (Gill and Holley, 2006) inducing dissipation proton- motive force by inhibiting other enzymes in the periplasmic space after the treatment of the bacterial cytoplasmic membrane (Ultee *et al.*, 2002; Benarfa *et al.*, 2006 ; Cristani *et al.*, 2007 ; Xu *et al.*, 2008).

While other minority compounds of our EO such as terpene hydrocarbons, pseudo-limonene known for its low antibacterial activity (Vardar Vnlu *et al.*, 2003; Nejad Ebrahimi *et al.*, 2008) and α -terpinolene, can exert synergistic interactions. Their target and their mode of action remain to be determined.

CONCLUSION

Listeria monocytogenes and *Bacillus cereus* are two pathogenic bacteria responsible for food poisoning can be fatal. Many efforts have been made to protect food from contamination by this type of microorganisms by the use of various types of preservatives. However, the ability of these bacteria to develop resistance forced a continual search for new antimicrobials.

In this perspective, we were interested in the EO of *Thymus ciliatus* harvested in the region of Tawra (northeastern Algeria), and the GC / MS unveiled its chemotype "Thymol". This oil showed a very good antibacterial activity against pathogenic strains of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*.

This result suggests the use of such molecules in food as a substitute for conventional chemical preservatives. Knowing that in terms of taste, Thyme is much appreciated and constitutes an ingredient in several recipes, this opens the prospect of its use for the prevention and fight against deterioration of food stored at room temperature or 4 °C.

In addition to its economic impact, this EO would contribute to the fight against food poisoning.

REFERENCES

- Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ, 2010 ;14 : 141-148.
- Amrouni S, Touati M, Hadeff Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase. Phytothérapie, 2014 ;125-127.
- Benarfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antibacterial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol, 2006 ; 43 : 149-154.
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier. 3ème édition. 484-488.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram A. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chemistry, 2011; 127(4): 1821-1827.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94: 223-253.
- Cherchar H, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. J Mater Environ Sci, 2014; 5 (1): 298-303.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [CA-SFM ; EUCAST] ; 2014- Volume 2.
- Cristani M, d'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activities. J Agric Food Chem, 2007 ;55: 6300-6308.
- Datta AR, Miliotis MD, Bier JW. 2003. *Listeria monocytogenes*, in International Handbook of Foodborne Pathogens. New York, NY, USA. Marcel Dekker. pp. 105-121
- Delmas G, Jourdan da Silva N, Pihier N, Weill FX, Vaillant V, de Valk H. Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, 2010; 31-32; 344-348.
- Djahoudi A, Toubal O, Bouzabata A. Preliminary Studies and Antimicrobial evaluation of the Aerial Parts of *Genistanumidica ssp. Numidica*. Journal of Life Sciences, 2011;5: 954-959.
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol, 2000; 88: 308-316.
- El Abed N, Kaabi B, Smaali MI, Chabbouh M, Habibi K, Mejri M, Marzouki MN, Ben Hadj Ahmed S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus capitata* essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2014; 11.
- EL ouali Lalami A, EL-akhal F, Ouedrhiri W, Ouazzani CH, Guemmouh R, Greche H. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology, 2013; 116 (3): 403-406.
- Faleiro MF, Miguel MG, Venancio F, Taveares R, Brito GT, Figueiredo AC, Pedro LG. Antibacterial activity of the essential oils from Portuguese endemic spices of *thymus*. Letter in applied Microbiology, 2003; 36-40.
- Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol, 2006; 111: 361-379.
- INVS. 2004. Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, Rapport de l'Institut de Veille Sanitaire. http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire, Consulté en juin 2011.
- Kempf M, Eveillard M, Kowalczyk F, Rossines E, Panhelleux G, Joly-Guillou ML. Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research. Pathologie Biologie, 2011; 59: 39-43.
- McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal Food Microbiology. 2004; 92(1), 15-33.
- Nejad Ebrahimi S, Hadian J, Mirjalil MH, Sonboli A, Yousefzadi M. Essential oil composition and antibacterial activity of *thymus caramanicus* at different phenological stages. Food chemistry, 2008; 110(4): 927-931.
- Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett Appl Microbiol, 2004; 39: 395-400.
- Rassouli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int J Infect Dis, 2006; 10: 236-241.
- Ozkan G, Sagdic O, Gokturk R S, Unal O, Albayrak S. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica*. LWT—Food Science and Technology, 2010 ; 43(1) : 186-190.
- Satrani B, Farah A, Talbi M. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calamintha* et

Saturejaalpina du Maroc. Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol, 2006 ; 94(956) : 241-250.

Tossa P, Villeroy F, Schaefer JL, Manel J. 2009. Intoxication alimentaire par *Bacillus cereus*: à propos d'un cas d'hépatite fulminante suite à l'ingestion d'un plat de pâtes, 47ème congrès de Société de Toxicologie Clinique, STC, Toulouse, France.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro M, Venuti V, Cristani M, Daniel C. Mecanisme of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother, 2005;49: 2474-2478.

Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of Carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol, 2002;68: 1561-1568.

Vardar Vnlü G, Candan F, Sokmen A. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *thymus pectinatus* Fisch ET Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). Journal of Agricultural and food chemistry, 2003;51(1): 63-67.

Viuda-Martos M, Mohamadyb MA, Fernandez-Lopez J. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. Food Control, 2011; 22: 1715–1722.

Yaouba A, Tatsadjieu N, Léopold and Mbofung C. Mycelia growth inhibition of some *Aspergillus* and *Fusarium* species by essential oils and their potential use as antiradical agent. Agric Biol J N Am, 2011; 2(11):1362-1367.

Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and Thymol against *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol, 2008;47: 174-179.

How to cite this article:

Heni S, Bennadja S, Djahoudia. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria. J App Pharm Sci, 2015; 5 (12): 056-060.

Ce travail a fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques :

I. PUBLICATIONS INTERNATIONALES :

1. **HENI Sonia**, ABDESSELAM Amira, KERMICHE Fella, BENNADJA Salima, DJAHOUDI Abdelghani. 2015. Sensibility of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* to Essential Oil of *Thymus ciliatus*. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 35(2), Article No. 47, Pages: 263-267.
2. **Sonia HENI**, Salima BENNADJA, Abdelghani DJAHOUDI. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus ciliatus* growing wild in North Eastern Algeria. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 5 (12), pp. 056-060.

II. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES :

1. **HENI S**, BENNADJA S, DJAHOUDI A : L'huile essentiel du Thym comme inhibiteur de *Salmonella sp / Shigella sp*. Agent de toxi- infection alimentaire (TIA). Séminaire International sur les Sciences Alimentaires (SISA) 14- 16 Octobre 2014. Constantine, Algérie.
2. **HENI Sonia**, Ouibrahim A, Kouch M, Mahfouf N, Bennadja S, Djahoudi A : Identification et caractérisation des composants volatiles de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* et *Thymus numidicus* (Nord-Est-Algérien) et étude de leur activité antibactérienne. Troisièmes Journées Internationales de Chimie Organique de Annaba-JICOA'15 ; 5, 6 et 7 Décembre 2015.
3. **HENI Sonia**, BENNADJA S, DJAHOUDI A : Effet bactéricide de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* plante endémique de l'Algérie sur les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. IXth International Congress of Physiology and Environmental Biomonitoring, 20-23 December 2015, Tabarka, Tunisia.
4. **HENI Sonia**, BENNADJA S, DJAHOUDI A: Activité antistaphylococcique de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*. 27^{ème} Forum International des sciences biologiques et de Biotechnologie de l'ATSB. Tunisie 28-31 mars 2016.
5. **HENI Sonia**, BENNADJA S, DJAHOUDI A: Etude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* vis-à-vis des agents pathogènes d'origine alimentaire. 27^{ème} Forum International des sciences biologiques et de Biotechnologie de l'ATSB. Tunisie 28-31 mars 2016.

- 6. HENI Sonia, BENNADJA S, DJAHOUDI A :** Détermination in vitro de l'aspect qualitatif et quantitatif de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* sur les *Staphylococcus aureus*. 1^{er} Séminaire International de Pharmacie de Sétif (SIPS 2016)/ Sétif 11-12 mai 2016.

III- COMMUNICATIONS NATIONALES :

- 1. HENI Sonia, BENNADJA S., DJAHOUDI A.** L'huile essentielle de Thym comme inhibiteur de *Staphylococcus aureus* Oxa^R contaminants de produits alimentaires. Deuxièmes Journées Du Département De Pharmacie (Annaba) 28-29 Mai 2014.
- 2. HENI Sonia, BENNADJA S., DJAHOUDI A.** Sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques à l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*. 5^{ème} Congrès de Biologie Médicale et Médecine de Laboratoire. 18, 19 Mai 2015. Bordj el Kiffan- Alger.
- 3. HENI Sonia, BENNADJA S, DJAHOUDI A:** Sensibilité des entérobactéries uropathogènes à l'huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret. du Nord-Est-Algérien. Journées Urologiques Nationales d'Annaba (JUNA). 13 – 14 Juin 2016. Annaba.

PARTIE I

Analyse bibliographique

Chapitre I : Le thym

La famille des Lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal (Naghbi *et al.*, 2005). Elle est la plus utilisée comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (Gherman *et al.*, 2000, Bouhdid *et al.*, 2006, Hilan *et al.*, 2006).

Cette famille regroupe plus de 258 genres et 6900 espèces, plus au moins cosmopolites, mais particulièrement répandues du bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (Miller *et al.*, 2006).

Le genre *Thymus* appartenant à cette famille, regroupe entre 250 et 350 espèces, sous-espèces et variétés de plantes sauvages (Morales 2002; Lawrence et Tucker 2002 ; Napoli *et al.* 2010). Il représente un taxon polymorphe, à la fois chimiquement et morphologiquement (Morales 2002; Saez et Stahl-Biskup 2002; Marin *et al.* 2005). Selon Jalas (1971), *Thymus* est divisé en huit sections: *Micantes*, *mastichina*, *Piperella*, *Teucrioides*, *Pseudothymbra*, *Thymus*, *serpyllum* et *Hyphodromi*.

Le nom *Thymus* vient probablement du latin "thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "thymos" qui signifie "courage" ou "force". Localement appelé « *Zaaitra* »

I. Le thym :

1. Historique

Le terme «Thym» est apparu dans la langue française au XIIe siècle, d'abord sous la forme de «Tym» selon certaines sources. Il est dérivé du latin *thymus* qui l'a emprunté du grec « *thumos* » signifiant, de façon quelque peu obscure, « grosseur ou loupe » (par référence à la glande, le *thymus*). D'autres pensent plutôt que le mot vient du grec « *thymos* » ou « *thyein* » qui signifie «fumée», par allusion au fait qu'il était jadis brûlé comme encens et qu'on lui attribuait alors le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses. D'autres enfin, font dériver le mot du grec « *thumus* », qui signifie «courage», la plante étant jadis considérée comme revigorante. Il semblerait que, pendant longtemps, le thym ait surtout été utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses usages culinaires se limitant à aromatiser le fromage et les liqueurs.

Les égyptiens s'en servaient pour embaumer leurs morts, les grecs pour parfumer les temples et l'eau des bains et les Romains pour purifier leurs appartements.

2. Caractéristiques botaniques

2.1. Description

Le thym est une plante basse sous-ligneuse, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par la rose (Soto-Mendivil *et al.*, 2006).

2.2. Classification botanique du thym

Règne :	Plantae (végétal)
Embranchement :	Spermaphytes (phanérogame)
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Lamiales
Famille :	<i>Lamiaceae</i>
Genre :	<i>Thymus</i>

3. Répartition géographique

3.1. Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Naghbi *et al.*, 2005). Selon Dob et ses collaborateurs, il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée (Dob *et al.*, 2006). C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya. Selon une étude menée par Nickavar et ses assistants, environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (Nickavar *et al.*, 2005). C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre.

3.2. En Algérie

Le *Thymus* de la famille des Lamiacées ou Labiées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Saidj *et al.*, 2006). Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Sa répartition géographique est représentée dans le Tableau 2.

Tableau. 1 : Localisation des principales espèces du thym en Algérie (Saidj *et al.*, 2006).

Espèces	Découverte	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman & Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss & Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans: Le sous secteur de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois
<i>Thymus guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans: le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

Le genre *Thymus* se présente en Algérie sous forme de plusieurs espèces, parmi lesquelles nous présentons les deux espèces qui feront l'objet de notre étude.

4. *Thymus ciliatus* Desf. (Benth.)

4.1. Description botanique (Quezel et Santa, 1962).

Thymus ciliatus Desf. Est un sous arbrisseau vivace, buissonnant, à touffe dressée très aromatique de 7-20cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre.

La tige est de couleur blanchâtre ligneuse à la base, cylindrique. Les feuilles sont de petites de taille, opposées, ovales, lancéolées, possédant un pétiole extrêmement court, blanchâtre à leurs faces inférieures. Celles de la base de 03m de largeur sur 7mm de long.

Les fleurs sont de couleur pourprée à rose pale, pédicellées, environ 7mm de long, regroupées au sommet sous forme de rosette à l'aisselle des feuilles supérieures.

La corolle tachetée de rose est bilabiée avec une lèvre inférieure formée de trois dents et une lèvre supérieure composée de deux dents. La période de floraison est limitée entre (Mai et Juin).

Le calice rougeâtre et poilu, formé de cinq sépales soudés on formant deux lèvres. Le style saillant, l'androcée didyname composé de deux étamines de grandes de tailles et deux petites.

Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés.

4.2. Position systématique

Selon Quezel et Santa (1962), *Thymus ciliatus* est classé comme suit

Règne :	Plantae
Embranchement:	Phanérogames
Classe:	Dicotylédones
Ordre:	Lamiales
Famille:	<i>Lamiaceae</i>
Genre:	<i>Thymus</i>
Espèce:	<i>ciliatus</i> Desf.

4.3. Répartition géographique

Thymus ciliatus est une espèce endémique de l'Algérie, localisée au niveau du bassin méditerranéen et dans le Nord de l'Algérie.

5. *Thymus numidicus* Poiret.

5.1. Description botanique

Thymus numidicus **Poiret.** Est une Plante buissonnante à touffe dense aromatique surtout pendant le printemps, de 8-30cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre.

La tige, marron ligneuse à la base, est herbacée cylindrique gorgée ou recouverte de poils blanchâtre, ayant des nœuds et entre nœuds.

Les feuilles opposées très petites ovales ou lancéolées à pétiole très court. Les feuilles sont recouvert par des poils tecteurs et sécréteurs sur la face inférieures.

Les fleurs de couleur rose vif, sessiles, la corole à deux lèvres inégales bilabiées protégée à sa base par le calice de coloration verdâtre denté velouté recouvert de poils blanchâtre.

Cette plante croit dans les lieux arides et pierreux, en Barbarie (**Poiret, 1785 & 1786 ; Quezel & Santa, 1962**).

5.2. Position systématique (Guignard, 1998)

Règne :	Plantae
Embranchement:	Phanérogames
Classe:	Dicotylédones
Ordre :	Lamiales
Famille :	<i>Lamiaceae</i>
Genre :	<i>Thymus</i>
Espèce :	<i>numidicus</i> Poiret.

5.3. Répartition géographique

Thymus numidicus est une espèce endémique de l'Algérie, que l'on retrouve dans le secteur de l'atlas tellien, la grande et la petite Kabylie, au niveau du Tell constantinois et de Skikda à la frontière tunisienne.

6. Propriétés du thym

Le thym est une épice mondiale très appréciée dans les habitudes culinaires, connu pour ses vertus stimulantes et toniques, il est recommandé contre les faiblesses organiques notamment celles du système nerveux (neurasthénie, dépression, apathie) et du système circulatoire.

Réputé par ses puissantes vertus thérapeutiques, il est employé aussi en décoction contre la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme (Alpin, 2005, Rasooli *et al.*, 2006, Adwan *et al.*, 2006), les maladies hépatiques, les coliques, les toux, les infections de la gorge, les gripes, les rhumes, les refroidissements.

Efficace aussi contre les aphtes et les gingivites, Il est aussi utilisé comme condiment et pour la conservation du smen (beurre fondu). (Bellakhdar 1997).

Antiseptique et antifongique, il soulage les inflammations de la sphère bucco-pharyngée, caries, soins dentaires divers, sous forme de bains de bouche.

Utilisé aussi pour ses vertus spasmolytiques, il soulager les dérèglements intestinaux tels que diarrhée, ballonnements, flatulences, colopathies diverses.

Son usage externe sur de nombreuses pathologies dermatologiques, ses vertus antivirales, antimicrobiennes et antiseptiques sont mises à profit dans le traitement des mycoses, des plaies, de la gale, de l'herpès et, globalement, d'un large panel d'affections cutanées allant jusqu'au zona (Valnet, 2005).

II. Les huiles essentielles

1. Définition

Les huiles essentielles (**HEs**) sont des produits naturels que les plantes produisent pour leurs propres besoins autres que l'alimentation (protection ou attraction). Elles sont constituées en moyenne d'une centaine de molécules actives, qui proviennent du métabolisme secondaire des plantes et sont responsables de leur odeur caractéristique.

Largement répandues dans le règne végétal, les **HEs** sont extraites à partir d'une matière première végétale botaniquement définie et est souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Pharmacopée européenne, 2008).

Les **HEs** ont des propriétés et modes d'utilisations particuliers qui ont donné naissance à une branche nouvelle de l'aromathérapie (Bruneton, 1999). A ce jour 3000 huiles essentielles sont connues, 300 d'entre elles sont commercialisées (Burt, 2004).

2. Localisation et lieu de synthèse

Les **HEs** sont synthétisées par les végétaux supérieurs, il y aurait environ 17 500 espèces aromatiques réparties dans une cinquantaine de familles comme les conifères, les lamiacées, les myrtacées, les rutacées et les ombellifères.

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle dans les végétaux sont généralement liées à l'existence de structures histologiques spécialisées (Fig.1), localisées dans certains points des tissus, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface de la plante (Bruneton, 1999). Ces structures peuvent être :

- Des cellules sécrétrices isolées (*Lauraceae*, *Zingibeaceae*); épidermiques ou internes,
- Des poils sécréteurs externes (*Lamiaceae*, *Graniaceas*) ou internes (*Myrtateae*),
- Des canaux sécréteurs (*Ombellifères*, *Conifères*).

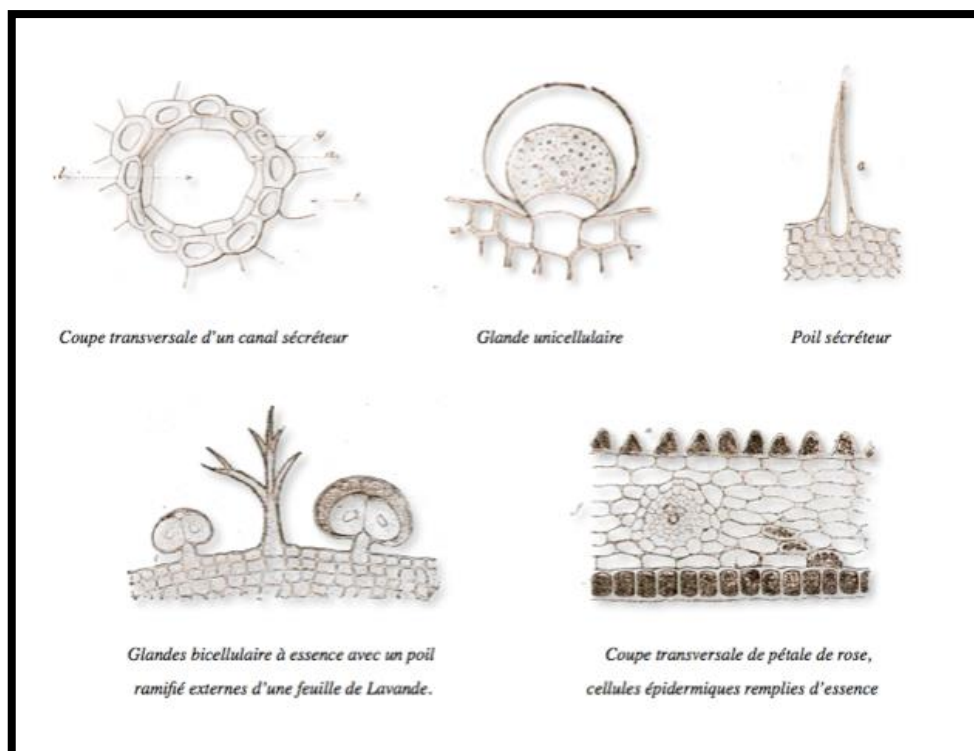


Figure 1. Différents organes sécréteurs

(<http://www.cosmovisions.com/secretionsvegetales.htm>)

3. Rôles physiologiques

La fonction biologique des **HEs** demeure le plus souvent obscure. Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont un rôle écologique, vu le rôle de certaines d'entre-elles aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteur de germination agent allelopatique) que dans celui des interactions végétales-animales (protection contre les prédateurs, insectes, champignons). Pour certains auteurs il pourrait constituer des supports de « communication » (Bruneton, 1993).

Les vapeurs aromatiques saturant l'air autour de la plante: le jour, elles empêchent la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable, facilitant ainsi certaines réactions chimiques. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques dans l'attraction de pollinisation (Ormeno *et al.*, 2007).

4. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, parmi elles:

4.1. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est une méthode affirmée pour l'obtention des huiles essentielles, cette technique ne met pas en contact direct l'eau avec la matière végétale à traiter. Durant le passage de la vapeur d'eau à travers la plante, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action des vapeurs pour former un mélange eau et huile essentielle en deux phase, une phase organique et une phase aqueuse. L'avantage de cette technique est d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant affecter la qualité des huiles essentielles (Bruneton, 1999).

4.2. L'hydrodistillation

Le principe de cette technique consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, ensuite le mélange est refroidi. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont séparés du fait de leurs différences de densité (Bruneton, 1999).

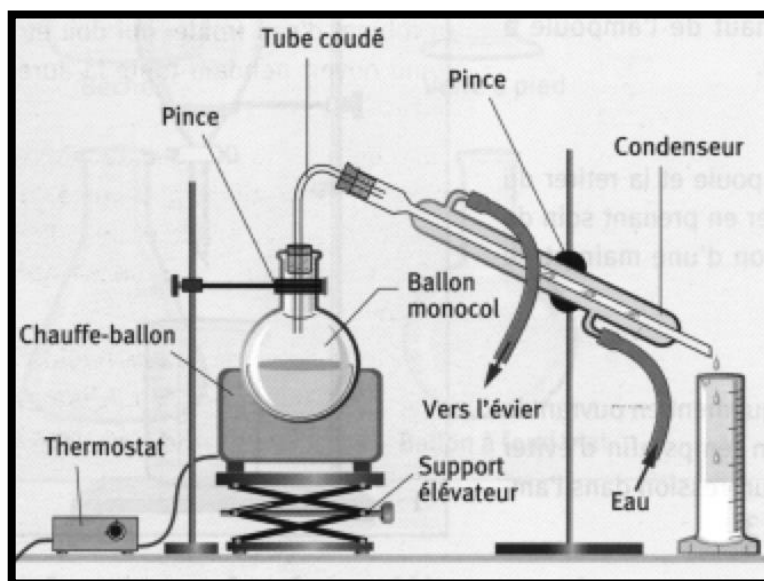


Figure 2. Schéma du dispositif de l'hydrodistillation

(<http://parfums-lumiere.skyrock.com/3072086205-II-Hydrodistillation.htm>)

4.3. L'enfleurage

Cette méthode se rapproche par son principe de l'extraction par solvant volatil, mais cette fois-ci on utilise des graisses comme solvants car elles ont aussi une forte affinité pour les composés odorants (Bruneton, 1999).

4.4. L'extraction par solvant organique

L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau ont été infructueux avec certaines plantes comme la rose, le narcisse ou encore le mimosa, qui sont trop fragiles pour supporter ces procédés, c'est ce qui a poussé les chercheurs à mettre au point de nouvelles méthodes d'extraction. Ainsi dès le XVIII^{ème} siècle, des tentatives ont été menées en utilisant un solvant ; l'éther. Cette trouvaille a été très vite abandonnée à cause des coûts de production et des risques d'explosion liés aux solvants. Ils optèrent par la suite pour l'hexane et le benzène en raison de leur volatilité et de leur grand pouvoir de solubilisation (Bruneton, 1999).

4.5. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques à savoir condensation, refroidissement, et décantation (Bruneton, 1999). Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant et l'obtention d'un rendement d'extraction élevé (Hemwimon *et al.*, 2007).

4.6. L'extraction au CO₂ supercritique

Cette méthode utilise le CO₂ pour dissoudre de nombreux composés organiques, le CO₂ doit obligatoirement se trouver entre l'état liquide et l'état gazeux, il est donc exposé à une forte pression et à une température avoisinant les 32°C. Cette technique est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel sans aucune trace de solvant. Le CO₂ a aussi l'avantage d'être inodore, incolore et ininflammable, ce qui assure des conditions de sécurité supérieures (Piochon, 2008).

5. Contrôle de la qualité des huiles essentielles

Le contrôle des **HEs** s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants.

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une **HE** reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels que les pesticides ou des produits chimiques ajoutés (Pibiri, 2005).

En aromathérapie, l'utilisation de tels profils est indispensable pour différencier dans une même espèce les variations chimiques induites par différents facteurs qui ont une influence sur la biosynthèse végétale, tels que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol (Pibiri, 2006).

6. Techniques d'analyse des huiles essentielles

L'analyse des **HEs** consiste à l'identification et à la détermination de la teneur des différents composés constituant une essence ; c'est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques, la plus couramment employée est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique.

6.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Actuellement cette technique est la plus utilisée pour la séparation des composés volatils des **HEs**. Elle consiste à injecter le mélange complexe diluée dans un solvant (non retenu par la phase stationnaire) dans une colonne, cette dernière peut être liée à un spectromètre de masse (SM) lui-même lié à un détecteur. Chaque composés de l'**HE** est caractérisé par un indice de rétention propre qui permettra de traduire les variations du soluté dans l'éluant en chromatogramme en fonction du temps (Adams, 1995).

6.2. Le couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse

Le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est très employé dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Adams, 1995).

7. Principaux constituants des huiles essentielles

Les HEs sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, elles sont un mélange, complexe et éminemment variable, de constituants qui appartiennent de façon quasi-exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distincts :

- Le groupe des terpénoïdes d'une part;
- Le groupe des composées aromatiques dérivées du phenyl-propane d'autre part (Bruneton, 1993).

7.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures formés à partir d'unités isopréniques (C_5H_8)_n. En général, seuls les terpènes de faible poids moléculaire (de 10 à 20 atomes de carbone) sont retrouvés dans les huiles essentielles. À noter les monoterpènes, composés de 2 unités d'isoprènes ($C_{10}H_{16}$) et les sesquiterpènes formés de 3 unités isopréniques ($C_{15}H_{24}$). Quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent être retrouvés dans les huiles essentielles, cela reste tout de même exceptionnel (Bakkali *et al.*, 2008 ; Bruneton, 2008).

Les terpènes retrouvés dans les huiles essentielles dérivent de l'acide mévalonique, lui-même obtenu à partir du métabolisme des sucres après formation de l'acétyl coenzyme A.

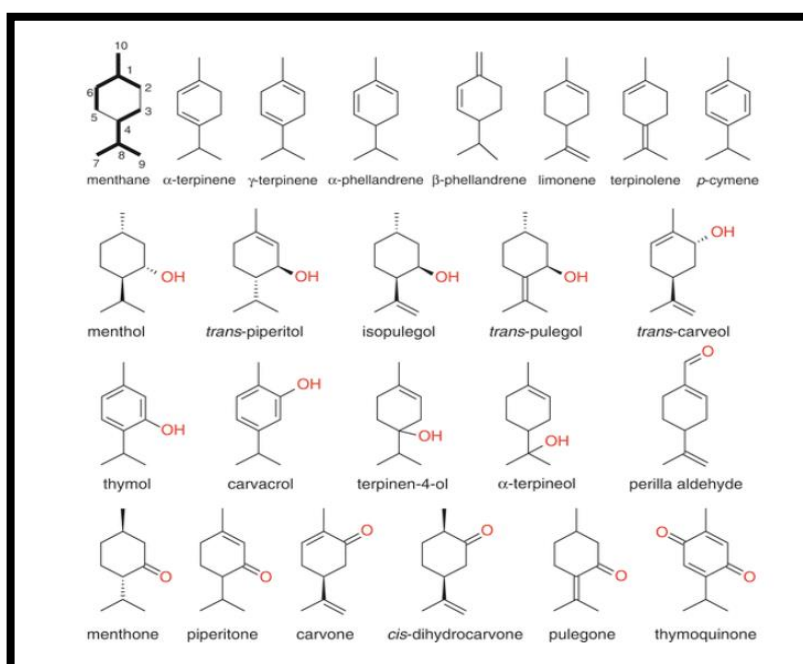


Figure 3. Terpènes et leurs dérivés oxygénés

7. 2. Phénylpropanoïdes

Les phenylpropenes constituent une famille parmi celle des phenylpropanoïdes et qui sont synthétisés à partir du phénylalanine, ils détiennent leur nom des six carbones aromatique phénol et des 3 carbones propènes produit lors de la première étape de la biosynthèse des phenylpropanoïdes. Ils représentent un petit pourcentage au sein des HEs, ceux qui ont été les plus étudiés sont l'eugénol, iso-eugénol, safrol, vanill et le cinnamaldéhyde (Hyldgaard *et al.*, 2012).

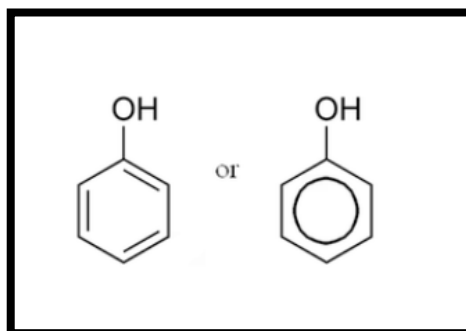


Figure 4. Présentation du cycle aromatique des Phénols

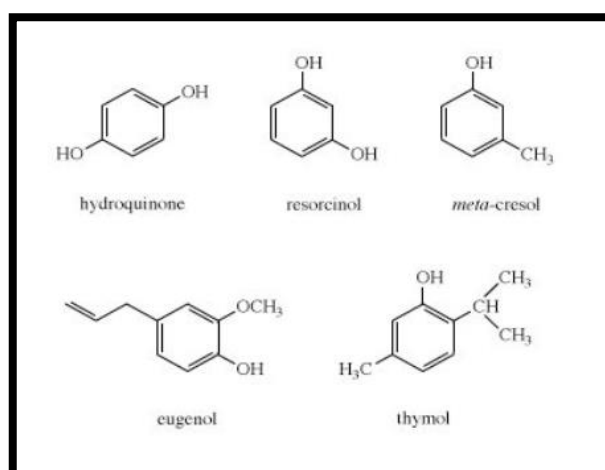


Figure 5. Dérivés phénoliques

8. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 50g/Kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan la toxicité est un peu plus élevée autour de 1,4g/Kg (observés chez l'animal) (Bruneton 1990).

Certaines molécules peuvent présenter des effets néfastes pour l'homme au même titre que certaines substances de synthèse. Les **HEs** contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses.

Les inflammations cutanées siègent de manière privilégiée sur les paupières et les aisselles ; ils vont du simple prurit (démangeaison) à l'eczéma allergique en passant par des plaques, un aspect psoriasique, voire des pigmentations ou dépigmentations locales. (Meynadier et Raison-Peyron, 1997).

Les terpènes; le camphre, menthol, la thujone et l'eucalyptol peuvent provoquer des réactions d'allergies ainsi que des manifestations neurologiques chez certains patients. Certains alcools sont non recommander : l'alcool cinnamique, l'alcool anisique.

Les **HEs** de thym et de lavande sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois (Inouye, 2003). Par ailleurs, des **HEs** d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaine dérivées de cancers (Sivropoulou, *et al* 1996).

III. L'huile essentielle de thym

1. Composition chimique

L'**HE** du thym est reportée parmi les **HEs** les plus actives (Naghdi *et al.*, 2004 ; Rassouli *et al.*, 2006). De nombreux travaux ont été réalisés sur l'**HE** de thym, nous nous limiterons dans notre étude à quelques unes, parmi les plus récentes.

Le tableau nous montre une étude comparative des principaux composés de l'**HE** de quelques espèces de *Thymus*.

Tableau 2. Composition de l'huile essentielle de quelques espèces du thym

Espèce	Pays	Composition	Référence
<i>Thymus vulgaris</i>	Turquie	p-cymène 9,9%, thymol 46,2%, linalool 4%, γ -terpinène 14,1%	(Ozcan <i>et al.</i> , 2004)
<i>Thymus vulgaris</i>	Espagne	p-cymène 18,7%, thymol 57,7%, linalool 2,1%, carvacrol 2,8%	(Rota <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thymus rosulans</i>	Turquie	γ -terpinène 4,4%, thymol 20,5%, p-cymène 4,1%, carvacrol 58,1%	(Tepe <i>et al.</i> , 2005)
<i>Thymus sipyleus</i>	Turquie	Borneol 11,2%, Murolool 9,2%, B-caryophyllen 7,6%, Geranial 7,3%	(Tepe <i>et al.</i> , 2005)
<i>Thymus zygis</i>	Espagne	p-cymène 0,5%, thymol 2,1%, linalool 82,3%, carvacrol 0,1%	(Rota <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thymus hyemalis</i>	Espagne	γ -terpinène 8,4%, thymol 43%, p-cymène 16%, carvacrol 2,4%	(Rota <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thymus capitatus</i>	Sardinia (Italy)	γ -terpinène 8,4%, thymol 29,3%, p-cymène 26,4%, carvacrol 10,8%	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<i>Thymus capitatus</i>	Tunisie	γ -terpinène 2,4%, p-cymène 5,1%, carvacrol 62,83%	(Bounatirou <i>et al.</i> , 2007)
<i>Thymus herbarone</i>	Sardinia (Nord d'Italy)	p-cymène 27,6%, thymol 50,3 Linalool 5,8%, carvacrol 2,9%, γ -terpinène 6,1%,	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<i>Thymus herbarone</i>	Ardinia (Centre de l'Italy)	p-cymène 5,2%, thymol 46,9%, linalool 3,3%, carvacrol 20,6%, γ -terpinène 4,6%,	(Cosentino <i>et al.</i> , 1999)
<i>Thymus serpyllum</i> (before floring)	Iran	p-cymène 21,12%, thymol 18,73%, linalool 1,08%, carvacrol 1,34%, γ -terpinène 21,9%,	(Rasooli <i>et al.</i> , 2002)

La variation détectée dans la composition chimique de l'HE de thym issue de différents pays est liée à plusieurs paramètres tels que : le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques variant d'un pays à l'autre, la période de récolte

et la méthode d'extraction, tous ces facteurs influent considérablement la composition chimique de l'HE (Cossentino *et al.*, 1999 ; Fella *et al.*, 2006).

2. Notion de chémotype

Le Thym est divisé en plusieurs races chimiques, appelées Chémotype ou Chimiotype. La variabilité de ce dernier est influencée par l'environnement (sol, altitude) et le climat (température et ensoleillement) permettant à la plante de vivre et d'évoluer. Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou Chimiotypes, ce phénomène a été bien étudié pour le thym, on distingue au moins 7 Chimiotypes différents en fonction des constituants principales de l'huile essentielle, Alpha-terpinéol, Carvacrol, Cinéol, Géraniol, hydrate de sabinène, Linalool, Thymol... (Wichtl et Anton ; 2004).

L'Huile Essentielle Chémotypée (H.E.C.T) doit impérativement répondre à de nombreux critères de qualité (Boulard ; 2002) :

La certification botanique ; L'origine géographique ; Le mode de culture ; Le stade de développement botanique ; L'organe distillé ; Le mode d'extraction.

Les Chémotype sont définis par les proportions fluctuantes de leurs constituants aromatiques : Carvacrol, Géraniol, Linalool, Terpinéol, Thymol et Thujanol (Sallé ; 1991).

- Le Chémotype Thymol, se trouve dans tous les types de sol où le Thym peut évoluer, des sols extrêmement chauds et secs aux sols plus humides. La spécificité Thymol est la plus répandue, mais l'est de façon moins homogène, et elle est souvent associée à d'autres chémotype (Thujanol-4, Terpinéol-4 et Linalool).
- Le Chémotype Carvacrol, se trouve surtout dans des conditions d'extrême chaleur et d'extrême sécheresse,
- Le Chémotype Linalool, se trouve dans toutes les aires du Thym, constitué de populations homogènes essentiellement en zone de moyenne montagne dans les zones à humidité atmosphérique importante,
- Le Chémotype Thujanol-4, moins abondant, c'est un intermédiaire entre le Linalool, Alpha-terpinéol et Géraniol.
- Le type Alpha-terpinéol, est lié aux mêmes facteurs climatiques que ceux qui favorisent la diffusion du type Linalool.

- Le Chémotype géraniole, peu abondant est adapté aux conditions d'altitude rudes (1000m).
- Le type Cinéole, est présent en Espagne.
- Les types Gamma-terpinène et p-cymène, sont des précurseurs de la biosynthèse végétale du Carvacrol et du Thymol (Coste ; 2002).

3. Activités biologiques et pharmacologiques de l'huile essentielle de thym

Plusieurs espèces de thym possèdent de nombreuses activités biologiques tels que analgésiques (Elhabazi *et al.* 2008), anti-inflammatoires (Ismaili *et al.* 2004), anti fongique (Haddef *et al.*, 2004), anti- oxydantes (Dorman *et al.* 2000 ; Tepe *et al.* 2004), antibactériennes (Bouhdid *et al.* 2006 ; Amrouni *et al.*, 2014) et antiseptiques (Pibiri, 2005).

4. Domaines d'utilisation

Les propriétés des **HEs** de thym sont nombreuses et variées, et sont utilisées dans différents domaines :

4.1. En Agro- alimentaire

Les huiles essentielles de thym sont largement utilisées dans le domaine agro-alimentaire, elles sont utilisées comme agent de conservation et aromatisant dans les industries alimentaires (Burt 2004).

Elles sont également employées pour assaisonner les aliments préparés comprenant de la viande, de la crème glacée, de la sucrerie, des boissons non alcooliques, etc. (Caillet et Lacroix, 2007).

Elles sont aussi utilisées en boulangeries et confiseries et rentrent même dans la composition des aliments destinés aux animaux.

4.2. En parfumerie et cosmétique

Les **HEs** de thym sont aussi exploitées par les industries cosmétiques où elles entrent dans la composition de produits cosmétiques. Cette **HE** riche en thymol, est couramment utilisée pour la confection de savons, elle est utilisée dans la fabrication de parfums, baumes, crèmes, dentifrices et produits hygiéniques, comme elle entre aussi dans l'élaboration de certains liqueurs. (Nature)

4.3. En usage thérapeutique

L'huile essentielle de thym, est un antiseptique très puissant. Il est utilisé à ce titre pour toutes les infections "difficiles" de la sphère ORL, et des systèmes génito-urinaire, respiratoire et digestif. Parmi les huiles essentielles ayant des propriétés tonifiantes, elle est réputée pour lutter contre les états grippaux et fatigues physiques et psychiques. Elle est aussi efficace contre les parasitoses cutanées.

Cette **HE** est aussi Antibactérienne puissante à large spectre d'action, **les** phénols tels que le thymol sont les molécules anti-infectieuses les plus puissantes : elles tuent directement les germes par destruction de leur membrane cellulaire. Les monoterpènes (paracymène et gamma terpinène) sont également des anti-infectieux. (Burt, 2004).

Elle est prouvée comme antiparasitaire puissante, les huiles essentielles contenant des phénols et notamment du thymol en pourcentage élevé constituent les meilleurs parasitocides aromatiques connus (George *et al.*, 2009).

Elle s'est révélée dotée de pouvoir antivirale et stimulante immunitaire, **le** thymol inactive les virus et stimule l'immunité c'est-à-dire qu'il augmente les défenses de l'organisme face aux pathogènes (Astani *et al.*, 2011).

Elle est aussi Fongicide, le thymol est actif sur les champignons (Silva *et al.*, 2011), On leur attribue également des pouvoirs antispasmodiques, diurétiques, expectorants, cicatrisants, tonique, sédatives et stimulant stimule de nombreuses fonctions de l'organisme et permet ainsi de maintenir un bon état de forme générale ; elle a également une action antitoxique, antivenimeuse et anticancéreuse (Valnet, 2005 ; Haddouchi, 2008).

I. Généralités

La détérioration des aliments constitue un problème d'une ampleur considérable si l'on considère qu'elle touche, par exemple, près du quart des fruits, légumes et céréales récoltés chaque année, sans parler des autres denrées alimentaires avariées qui doivent être jetées avant leur consommation.

Les microorganismes sont présents dans les écosystèmes naturels comme l'air, le sol et l'eau. Ils sont également présents sur l'homme lui-même et sur tous les êtres vivants animaux et végétaux. De ce fait, tous les produits alimentaires transformés ou non peuvent être contaminés par des microorganismes.

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

En effet, par rapport aux autres agents de contamination chimique ou particulaire, les microorganismes ont une propriété importante et remarquable, car ils sont capables de se reproduire, surtout, lorsque les conditions sont favorables à cette reproduction, ce qui est souvent le cas pour les microorganismes des produits naturels et alimentaires (Leveau, 2001).

II. Principaux germes de contaminations des aliments

Les aliments sont rarement stériles en profondeur et jamais en surface, souvent contaminés de façon primaire, ils le sont systématiquement de façon secondaire lors de diverses manipulations auxquelles ils sont soumis.

Certains contaminants (bactéries, champignons, levures) ne présentent aucun inconvénient, ni pour le produit ni pour ceux qui le consommeront.

En revanche, d'autres sont susceptibles de nuire gravement à la santé humaine ou de mettre en péril la vie commerciale du produit (Bourgeois ; 1996).

Les germes d'altération sont responsables d'affecter la qualité intrinsèque de l'aliment et donc sa valeur commerciale (modification de texture et d'aspect, altération de la valeur alimentaire, altération des qualités organoleptiques, dégradation du conditionnement etc...). Les microorganismes les plus souvent rencontrés appartiennent aux genres suivants :

1. Le genre *Pseudomonas*

1.1. Caractères morphologiques

Le genre *Pseudomonas* est constitué de bacilles à Gram négatifs, droits ou légèrement incurvés, ayant une taille de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de longueur, aérobies stricts, oxydase positifs, non sporulés et généralement mobiles grâce à une ciliature polaire.

Certains produisent des pigments hydrosolubles fluorescents, de couleur jaune-vert qui ont un rôle de sidérophores. La plupart des espèces sont psychrotrophe. Leur croissance est possible entre 4 °C (voire moins) et 43 °C (Euzéby, 2007).

1.2. Habitat et pouvoir pathogène

Les *Pseudomonas* sont ubiquistes et peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses. Peu virulentes, plusieurs souches sont des pathogènes opportunistes pour l'homme, et des agents d'altération organoleptiques des viandes, poissons et produits laitiers. Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* (Euzéby, 2007).

Leur présence au niveau des chaînes d'abattage et en particulier dans les chambres froides constitue une source permanente de contamination des viandes. *Pseudomonas* est principalement utilisé comme indicateur d'altération des viandes fraîches et du lait (Bailly *et al.*, 2012).

2. Le genre *Acinetobacter*

2.1. Caractères morphologiques

Les souches d'*Acinetobacter* sont des coccobacilles, Gram négatif aérobie stricte. Ils sont courts, non sporulés parfois capsulés et immobiles (mais pouvant présenter une mobilité par saccade résultant de la présence de fimbriae polaire), ils se présentent le plus souvent par paires (Avril, 1992 ; Fauchère, 2002).

2.2. Habitat et pouvoir pathogène

Acinetobacter sp. est un germe ubiquitaire, saprophyte, présent dans l'environnement (eaux et sol) et tolérant parfaitement les milieux hostiles. Cette espèce est retrouvée chez l'Homme, au niveau de la peau, des muqueuses et du tube digestif et fait

partie de la flore normale de 20 à 25 % des sujets sains, environ 30% du personnel hospitalier en est porteur (Tortora, 2012).

Les souches d'*Acinetobacter spp* sont responsables de diverses infections opportunistes attribuées à leur propriété d'adhérence et à la production de plusieurs types de toxines.

En atmosphère humide, les viandes sont envahies en quelques jours par des bacilles Gram négatif. Il s'agit essentiellement de : *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Fernandes, 2009).

3. Le genre *Aeromonas*

Le genre *Aeromonas* fait partie de la famille de *Vibrionaceae*. Il contient des espèces pathogènes pour le poisson et l'homme, l'espèce *A. hydrophila* agent des maladies diarrhéiques transmises par les aliments ubiquistes des eaux douces, saumâtres, marines. Agent principal d'altération de la viande, saumon, poisson.

Pathogène et opportuniste infectant les plaies souillées, septicémies chez les immunodéprimés.

Le germe produit une large gamme de toxines telles que l'entérotoxines, cytotoxines, des hémolysines et des inhibiteurs de canaux de sodium de type tetrodotoxines. Les toxines sont performés dans les aliments (Fauchère, 2002).

4. Les *Enterobacteriaceae*

Les *Enterobacteriaceae* ou entérobactéries appartiennent à une famille de courts bâtonnets Gram négatifs, de 0,3 à 1,0 μm de diamètre sur 1,0 à 6,0 μm de longueur, dont certains sont mobiles au moyen de flagelles péritriches et d'autres immobiles. Toutes les espèces sont anaérobies facultatifs, fermentent le glucose et sont oxydase négatives. Il s'agit d'un groupe biochimiquement et génétiquement apparenté, présentant une grande hétérogénéité du point de vue écologie, hôtes et potentiel pathogène pour l'homme, les animaux, les insectes et les plantes (Ghafir et Daube, 2007).

Cette famille inclut plusieurs genres et espèces de bactéries pathogènes intestinales (*Shigella*, *Salmonella* et les souches pathogènes de *Yersinia* et d'*E. coli*). Elle comprend également de nombreux genres présents naturellement dans l'environnement, y compris sur les plantes, sans être d'origine fécale ni associés à des maladies d'origine alimentaire (Ray, 2001). Parmi les entérobactéries, les souches qui habituellement fermentent le

lactose, avec production d'acide et souvent de gaz, sont appelées «coliformes» et comprennent des espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* et *Klebsiella*.

Cependant, certains médecins microbiologistes incluent les espèces des genres *Edwardsiella*, *Hafnia* et *Serratia*, en dépit de leur incapacité habituelle à fermenter le lactose.

Certaines souches psychrotrophes, poussent bien à des températures froides, mais montrant une faible inhibition à 37 °C (Mead, 2007). D'autres souches d'Entérobactéries par exemple, peuvent être impliquées dans l'altération de la viande rouge et la volaille, en particulier dans des conditions de durée de vie prolongée (García-López *et al.*, 1998). Un autre sous ensemble du groupe des coliformes comprend les «coliformes fécaux» qui fermentent le lactose à $44,5 \pm 0,2$ °C et qui sont parfois dénommés «thermo-tolérants». L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli* et, dans une moindre mesure le genre *Klebsiella* (Mead, 2007).

Dans les denrées alimentaires d'origine animale, les entérobactéries sont d'origine intestinale ou environnementale et indiquent un défaut d'hygiène lors des processus de fabrication.

5. *Escherichia coli*

Escherichia coli fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit de courts bâtonnets mobiles au moyen de flagelles péritriches, Gram négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm. Ils sont capables de fermenter plusieurs sucres, mais leur fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique. La multiplication à 44 °C (optimum 40 °C et extrême à 45,5 °C), la production d'indole et la présence d'une activité β-glucuronidase, sont également caractéristiques.

Les espèces de *E. coli* sont sérotypées en se basant sur leurs 173 antigènes somatiques (O), 56 antigènes flagellaires (H) et 80 antigènes capsulaires (K) (Feng, 2001 ; Eslava *et al.*, 2003). Etant l'espèce bactérienne anaérobie facultative prédominante dans l'intestin et les fèces, la présence de *E. coli* dans les aliments et l'eau est considérée comme une indication de contamination fécale et, dès lors, l'indication d'une possible présence de microorganismes pathogènes d'origine fécale. La surveillance d'*E. coli* représente le meilleur indicateur d'hygiène des procédés pour suivre la contamination fécale d'un aliment (UE, 2007).

La contamination a lieu le plus souvent lors de la production et de la transformation d'aliments crus d'origine animale, ou indirectement, via la contamination par de l'eau contaminée (Feng, 2001; Ray, 2001; Eslava *et al.*, 2003).

Dans les filières de production carnée, la principale source de contamination des denrées alimentaires par *E. coli* est le tractus intestinal des animaux. Leur présence indique un défaut de la technique d'abattage, ou une contamination croisée, mais peut également être due à une contamination par les personnes manipulant les denrées alimentaires.

III. Les bactéries impliquées dans les Toxi-infection alimentaire

Ces dernières années les problèmes liés aux bactéries responsables de Toxi-infection alimentaire (T.I.A) se sont considérablement amplifiés par l'apparition de germes résistants à une série d'antimicrobiens et menacent d'entraîner un grands problème de santé publique. Il a été estimé qu'environ 30% de personne dans les pays industrialisés souffrent de maladies transmises par les aliments.

Chaque année, des millions de cas sont signalés partout dans le monde (Nedorostova *et al.*, 2009).

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

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

La dose infectante minimale (MDI) varie considérablement entre les espèces bactériennes : MID est élevé pour *Vibrio sp.* (10^6 cellules) et très faibles pour *Salmonella sp.* et *Shigella sp.* (Bourgeois 1990).

Les microorganismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires et d'intoxication alimentaires appartiennent aux genres suivants:

1. Le genre *Salmonella*

Salmonella, présente dans le tube digestif des animaux et de l'Homme et pouvant être alors à l'origine de toxi-infections alimentaires très graves, est détruite par la cuisson.

Cependant, les nombreuses espèces de *Salmonella* diffèrent entre elles, quant à leur pouvoir pathogène. Bien que la plupart des espèces puissent se retrouver dans les aliments, il est essentiel de prendre en considération celles qui sont à l'origine de toxi-infections plutôt que celles qui sont à l'origine des maladies infectieuses graves (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes) (Fosse *et al.*, 2004).

1.1. Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Genre regroupant de petits bacilles, Gram négatif habituellement mobiles par des cils péritriches. Ces bactéries mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur et sont aéro-anaérobies facultatives, oxydase négatives et nitrate réductase positives. Elles sont mésophiles, capables de se développer à des températures comprises entre 5,2 °C et 47 °C et de manière optimale entre 35 et 37 °C, et des pH compris entre 4,5 et 9 (Fosse *et al.*, 2004).

1.2. Habitat et pouvoir pathogène

Au sein de la sous espèce *Salmonella enterica*, il existe plus de 2400 sérotypes différents parmi lesquels certains sont potentiellement pathogènes pour l'homme. Il s'agit de sérotypes ubiquistes qui peuvent être hébergés dans le tube digestif de l'homme, des animaux domestiques et sauvages, des animaux de compagnie et plus particulièrement des volailles pour *S. enteritidis*. En ce qui concerne la viande bovine, *S. dublin* est également souvent incriminée. Cette dernière peut être hébergée dans le tube digestif des bovins et de l'homme.

Les intoxications à salmonelles dues aux viandes sont sérieuses tant par le nombre de malades que par la gravité des symptômes. L'ingestion de 10¹ à 10¹¹ cellules de *Salmonella* peut déclencher une infection se manifestant par une fièvre à 39°C – 40°C, des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements et un syndrome diarrhéique caractérisé par des selles liquides et fétides (AFSSA, 2002).

Tous les sérotypes peuvent être impliqués; ils varient avec les pays et les époques. *Salmonella* non typhoïdiennes provoquent des abcès dans différents tissus, voire une septicémie. Ces germes résistent au pH acide de l'estomac, entrent en compétition avec la flore normale de l'intestin grêle et franchissent la barrière épithéliale pour proliférer dans les plaques de Peyer et envahir les ganglions mésentérique (Hanes, 2003).

2. Le genre *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus est, comme tous les staphylocoques, une bactérie sous forme Cocci à Gram positif, de 1 µm de diamètre environ, apparaissant en amas à l'examen microscopique. Immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique (Prescott, 2010).

2.1. Caractères cultureux

Staphylococcus aureus cultive facilement sur des milieux ordinaires, en aérobie comme en anaérobie, en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune doré d'où l'appellation de staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène.

Staphylococcus aureus n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de +37°C et un pH de 7,5, de grandes variations sont tolérées. Comme tous les Micrococaceae, il se multiplie dans des milieux contenant une concentration de 75 g/litre de chlorure de sodium (Na Cl) (Prescott, 2010).

2.2. Potentiel Enzymatique

Outre les enzymes nécessaires aux fonctions métaboliques décrites ci-dessus, *Staphylococcus aureus* a la capacité de synthétiser plusieurs enzymes telles que la catalase qui existe chez tous les *Micrococaceae*, la coagulase, la désoxyribonucléase, la phosphatase, la hyaluronidase, la fibrinolysine, la lipase et la protéolysine (Giannella, 1996). La présence d'une coagulase identifie, en pratique courante l'espèce *Staphylococcus aureus*. La coagulase libre est une protéine diffusible, réagissant comme la prothrombine et coagulant, en quelques heures, le plasma citraté de l'Homme ou du lapin.

La forme liée, réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination de *Staphylococcus* mis en contact avec du plasma. L'activité de toutes ces enzymes explique, en partie, la physiopathologie de l'infection staphylococcique (Prescott, 2010).

2.3. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles. L'hémolysine α ou staphylolysine α , est cytotoxique et cytolytique. Elle a un effet nécrotique sur la peau lié à son effet vasoconstricteur.

Quant à la leucocidine, elle agit sur les granulocytes, les macrophages et les basophiles et provoque leur immobilisation puis leur dégranulation et leur lyse (García-López, 1998).

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent cinq toxines protéiques responsables de toxi-infections alimentaires dites entérotoxines staphylococciques A, B, C, D, E (Fosse *et al.*, 2004, Bailly *et al.*, 2012).

La toxine du syndrome de choc toxique est une toxine pyrogène et létale dite toxine du syndrome de choc toxique ou TSST (Cavalli, 2003).

2.4. Sources de contamination et prévention

Les aliments qui sont souvent impliqués dans des intoxications alimentaires à staphylocoques sont la viande et les produits à base de viande, la volaille, les œufs, des salades, le thon, les pommes de terre et les macaronis. Sont également impliqués les produits de boulangerie (Bailly *et al.*, 2012).

2.5. Pouvoir pathogène chez l'Homme

Staphylococcus aureus est un microorganisme pyrogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses.

Il "surinfecte" souvent les plaies négligées. Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration de *Staphylococcus aureus* au niveau des annexes de la peau (follicules pilosébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime. Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hidrosadénites, panaris, onyxis, impétigo et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus, aisselle, aine). Plus rares sont les conjonctivites, les angines, les phlegmons de l'amygdale, les otites et les sinusites (Schachter, 1999 ; Fauchère, 2002 ; Prescott, 2010).

Les manifestations intestinales provoquées par les staphylocoques se présentent sous deux formes : les toxi-infections alimentaires sont les plus fréquentes : il s'agit de

troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre.

L'entérocolite aiguë pseudomembraneuse, plus rare, survenant chez des sujets ayant reçu une antibiothérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *S. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entérotoxines (Sandel et al., 2004).

3. Le genre *Campylobacter*

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli*, les espèces les plus fréquemment isolées chez l'Homme infecté ou malade, peuvent être transmis de l'animal à l'Homme, par un contact direct avec les animaux ou par le biais de la consommation ou de la manipulation de produits alimentaires d'origine animale contaminés.

3.1. Caractères cultureux

Campylobacter jejuni et *Campylobacter Coli* sont des bactéries thermotolérantes, à Gram négatif, très mobile, nécessitant pour une croissance optimale des conditions de microaérophie, à une température de +42°C (Prescott, 2012).

L'ajout d'antibiotiques sélectifs, dans les milieux d'isolement sont plus que nécessaires, à partir d'échantillons de produits alimentaires.

La sous-espèce *jejuni* et, bien plus fréquemment, isolée que la sous-espèce *doylei*. *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter Coli* sont les deux espèces pathogéniques d'intérêt majeur car ce sont des agents zoonotiques (Hu et Kopecko, 2003).

3.2. Sources de contamination et prévention

La source primaire des infections à *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli* chez l'Homme semble être la manipulation ou la consommation des aliments contaminés crus ou mal cuits, la viande de volaille, les contacts avec les animaux de compagnie et le bétail, la consommation d'eau contaminée ou de lait cru et les voyages dans les zones à forte prévalence, puisque considérés comme des facteurs de risque de la maladie humaine (Friedman, 2000).

3.3. Pouvoir pathogène

Une infection à *Campylobacter jejuni* peut engendrer, dans de rares cas, des neuropathies auto immunes sévères (syndromes de Guillain Barré et de Miller Fisher) provoquées par un mimétisme moléculaire entre les gangliosides (glycosphingolipides)

exprimés dans la cellule nerveuse et les lipooligosaccharides présents au niveau de la membrane externe de la bactérie (Friedman, 2000).

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli* causent des entérites qui sont beaucoup plus fréquentes chez l'enfant vivant dans des conditions d'hygiène précaires.

Après une incubation de 1 à 3 jours, survient une diarrhée fébrile avec parfois du sang dans les selles ; des douleurs abdominales et des vomissements sont habituels (Giannella, 1996).

4. Le genre *Clostridium*

Clostridium perfringens appartient au groupe II du genre *Clostridium* et à la famille des Bacillaceae. Il s'agit d'un bacille Gram positif sporulé, tellurique, anaérobie strict, sulfitoréducteurs, immobiles, possédant une capsule de nature polysaccharidique. Cette espèce est thermophile, sa température optimale de croissance étant comprise entre 40 et 45 °C, mais elle est toutefois capable de se développer à des températures comprises entre 15 °C et 50 °C. Le pH compris entre 5,5 et 8.

Les spores thermosensibles de *C. perfringens* résistent 5 minutes à 100 °C et produisent l'entérotoxines qui est responsable des intoxications alimentaires (Cavalli *et al.*, 2003; Fosse *et al.*, 2004). Le seuil en dessus duquel il y a intoxication est 105 UFC/g (AFSSA, 2006). C'est une bactérie tellurique largement répandue dans l'environnement, qui peut contaminer les fourrages et les ensilages. Ce germe ubiquiste est un hôte normal du tube digestif des animaux et de l'homme.

La viande peut être contaminée au moment de l'éviscération si du contenu de l'intestin entre en contact avec la carcasse (Cavalli, 2003).

L'homme se contamine en ingérant des aliments, notamment des produits carnés, contenant des bactéries. Les denrées incriminées sont les préparations à base de viande et en général cuites, conservées à l'abri de l'air (masses importantes, immersion dans un liquide, emballage étanche), refroidies lentement puis réchauffées lentement, ce qui favorise la multiplication des bactéries et la production de toxines (AFSSA, 2006). Les symptômes apparaissent entre 6 et 24 h, généralement 10 à 12 h, après l'ingestion du repas contaminé. Ils se traduisent surtout par la diarrhée et de violents maux de ventre, parfois de nausées. Le plus souvent, cette affection guérit spontanément en 2-3 jours. Toutefois, des mortalités ont été observées chez des personnes âgées et des jeunes enfants.

5. Le genre *Listeria*

Listeria monocytogenes, appartenant au genre *Listeria* et division des Firmicutes, doit son nom à Joseph Lister. Elle est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'Homme (Manuel terrestre de l'OIE 2005).

5.1. Caractères morphologiques

Listeria monocytogenes est un bacille de petite taille, non sporulé, anaérobie facultatif, ubiquitaire (sol, végétaux, eau), à Gram positif, synthétisant une catalase, mobile à +25°C. Elle est mobile, grâce à ses flagelles. Selon certaines études, 1 à 10 % des humains seraient porteurs sains de *Listeria monocytogenes* dans leur intestin (Manuel terrestre de l'OIE 2005).

5.2. Sources de contamination et prévention

Il existe plusieurs sources possibles de transmission de la maladie. Chez l'homme, la transmission de la mère au fœtus, par la voie hématogène (listériose congénitale), peut se faire par voie digestive ou par voie respiratoire (infection amniotique, aspiration des microorganismes situés au niveau du col de l'utérus ou dans le vagin).

Les infections nosocomiales sont des sources d'infections transmissibles, lors d'actes thérapeutiques. Une transmission dite directe, par un simple contact, est aussi possible. Une transmission indirecte se fait par l'intermédiaire d'un vecteur inanimé comme les produits d'origine animale (Manuel terrestre de l'OIE 2005).

5.3. Pouvoir pathogène

Listeria monocytogenes, étant une bactérie pathogène opportuniste, attaque préférentiellement les sujets dont le système immunitaire est perturbé. C'est le cas des personnes âgées, des femmes enceintes, des nouveau-nés et des personnes immunodéprimées telles que les cancéreux, les transplantés, les personnes dépendantes aux narcotiques et au tabac, les personnes diabétiques mal équilibrés et les alcooliques. En effet, la listériose est la troisième infection néonatale, après les infections à *Escherichia coli* et *Streptococcus* (Manuel terrestre de l'OIE 2005).

En effet, la bactérie ingérée dans une nourriture quelconque (viande, légume, fromage..) peut traverser la paroi intestinale et induire divers symptômes tels qu'un état pseudogrippal apparemment bénin, notamment, chez la femme enceinte. Les symptômes

sont plus importants chez le fœtus où la contamination in utero, au moment de l'accouchement, se traduit par des formes septicémiques généralisées, donnant un avortement ou des complications qui surviennent dès la naissance et/ou à des formes tardives se traduisant par une méningite. Chez les sujets fragiles, l'infection peut se traduire par des atteintes encéphalites neuroméningées. Chez les immunocompétents, peut survenir un syndrome pseudo grippal, avec fièvre, souvent inapparent.

La prévention serait la prise de précautions multiples, afin de lutter contre la listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées, d'éviter la consommation de fromages à pâte molle au lait cru, d'enlever les croûtes de fromages avant leur consommation, d'éviter la consommation de fromages vendus déjà râpés, d'éviter la consommation de poissons fumés et d'éviter la consommation de graines germées crues (soja, luzerne,...) (Cressy *et al.*, 2003).

5.4. Mode d'action

Listeria monocytogenes, capable de résister à la dégradation lysosomiale, par échappement des phagosomes (vésicule de phagocytose), produit des toxines qui désorganisent la membrane du phagosomes. Une fois dans le cytosol, *Listeria monocytogenes* peut alors détourner le cytosquelette d'actine à son profit, pour se déplacer et se propager vers d'autres cellules en répétant les mêmes actions.

Deux des ses protéines de surface (InIA et InIB), en se fixant sur des récepteurs spécifiques (E-Cadherine et Met) du placenta, permettent à la bactérie de traverser la barrière hématoencéphalique. La bactérie passe alors d'une cellule à l'autre, en se propulsant dans la cellule infectée, en crevant la membrane plasmique de l'hôte et de la cible. Elle détourne la machinerie cellulaire et le cytosquelette d'actine, pour favoriser la polymérisation des monomères d'actine en une comète qui la propulse. La protéine (Act A), activateur des facteurs de nucléation de l'actine, qui provoque le recrutement et la polymérisation d'actine (Cressy *et al.*, 2003).

6. *Bacillus cereus*

6.1. Caractères morphologiques

La morphologie du germe correspond à un grand bacille en forme de bâtonnet de 1 µm de large pour 3 à 4 µm de long, mobile grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 µm et d'un diamètre moyen de 1,4 µm et de type respiratoire aéro-anaérobie,

donnant des spores thermorésistantes, présentant une positivité à la coloration de Gram, et synthétisant deux types de toxines : une toxine thermostable et une toxine thermolabile. (Murray *et al.*, 2007).

6.2. Habitat

Les *Bacillus cereus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits "stérilisés" alimentaires ou médicamenteux à cause de la thermorésistance des spores. (From *et al.*, 2005).

6.3. *B. cereus* source de problème dans les industries agroalimentaires

Parmi les microorganismes nuisibles aux industries alimentaires, *B. cereus* occupe une place de premier plan. Sa capacité à croître rapidement, à sporuler et à former des biofilms, en a fait un outil suscitant l'intérêt des industries agro-alimentaires (Bartoszewicz *et al.*, 2008)

En effet les spores sont connus comme une des formes de vie plus résistantes et leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment (Smelt *et al.*, 2008).

6.4. *B. cereus* pathogène alimentaire

Les maladies alimentaires dues à *B. cereus* sont en fait causées par deux types distinctes de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et résistante à une large gamme de températures et de pH, et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante (Granum 1994).

6.4.1. Les Toxi-infection alimentaires Collectif (TIAC)

Les toxi-infections alimentaires doivent obligatoirement être déclarées lorsqu'elles sont collectives. Ces toxi-infections alimentaires sont souvent bénignes et celles associées à *Bacillus cereus* peuvent être confondues avec celles provoquées respectivement par *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*.

De ce fait, les TIAC à *Bacillus cereus* sont vraisemblablement sous-estimées. *Bacillus cereus* est classé comme étant la quatrième cause de TIAC en France (après

Salmonella, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*) avec 1766 cas répartis sur 94 foyers confirmés et le taux de décès le plus important (Delmas G., *et al* 2006).

6.4.2. Les atteintes gastro-intestinales

Les maladies gastrointestinales gravité vari sont les infections les plus communément associées à *B. cereus* (Didelot *et al.*, 2009).

Chez les individus en santé, les symptômes sont généralement bénins, mais les complications peuvent conduire à des maladies plus graves menant à la mort (Shiota *et al.*, 2010). Des éclosions de troubles intestinaux dues à *B. cereus* ont été signalées dans le monde entier (Logan et Rodriges-Diaz, 2006).

On lui attribue entre 1% et 33% des cas d'intoxication alimentaires (EFSA, 2005) avec des degrés de gravité variables.

✓ *Syndrome diarrhéique*

Le syndrome diarrhéique est attribué à des entérotoxines : l'hémolysine BL (Hbl) complexe à trois composantes (Hbl B, Hbl L1 et Hbl L2), l'hémolysine Nhe elle aussi composée de trois sous-unités (NheA, NheB et Nhe C) et la cytotoxine K (CytK) (Guinebretière., 2006). Ces toxines sont produites dans le tube digestif de l'hôte et, pour être actives, les deux premières doivent être composées de leurs différentes sous-unités. Les temps d'incubation après ingestion des plats contaminés varient de 6 à 15 h avec rétablissement dans les 24 à 48 h. Ce type de toxi-infection alimentaire peut facilement être confondu avec celle provoquée par *Clostridium perfringens*.

✓ *Syndrome émétique*

Le syndrome émétique est caractérisé par des nausées, des vomissements et des crampes abdominales se produisant 1 à 5 h après l'ingestion des aliments contaminés, avec rétablissement dans les 6 à 24 h. Les symptômes associés sont semblables à ceux générés par les entérotoxines staphylococciques, protéines préformées par *Staphylococcus aureus* dans les aliments. Ce type d'intoxication alimentaire est relié à la production d'un dodécadepsi-peptide cyclique, le céréulide, et nécessite l'ingestion de ce dernier.

7. *Yersinia enterocolitica*

Le genre *Yersinia* comprend 11 espèces appartenant aux Enterobacteriaceae.

7.1. Caractères morphologiques

Il s'agit de bacilles Gram négatifs, non sporulés, anaérobies facultatifs qui fermentent le glucose. Plus petites que la plupart des autres entérobactéries, elles apparaissent souvent comme des coccobacilles lorsqu'elles se multiplient à 37 °C.

7.2. Habitat et pouvoir pathogène

Y. pseudotuberculosis et *Y. enterocolitica* sont les deux agents pathogènes d'origine alimentaire. Elles atteignent le tractus gastro-intestinal de l'homme et provoquent des entérites, entérocolites, lymphadénites, et rarement des infections extra-intestinales telles que des arthrites.

Y. enterocolitica est également présente dans l'intestin d'animaux sains tels que des porcs, des bovins, des chiens et des chats (Krauss *et al.*, 2003; Robin-Browne et Hartland, 2003). *Y. enterocolitica* est psychrotrophe, sa température optimale de multiplication est cependant de 28-30 °C (Krauss *et al.*, 2003; Robin-Browne et Hartland, 2003). Elle est présente chez plusieurs espèces d'animaux, dans les aliments et dans les eaux.

7.3. Symptômes

Pour *Y. enterocolitica*, les symptômes cliniques se manifestent classiquement chez l'adulte par une entérocolite avec la triade : Fièvre, crampes abdominales, diarrhée liquide aiguë, pouvant s'accompagner de céphalées et d'anorexie ou de vomissements. Chez l'enfant, on constate plutôt une diarrhée aqueuse et muqueuse. La dose minimale infectante est de l'ordre de 10⁶ microorganismes (AFSSA, 2006). Les températures de pasteurisation détruisent les bactéries de *Yersinia entéropathogènes*.

La conservation des aliments est un combat constant contre les microorganismes d'altération et / ou les pathogènes de l'Homme. Ces bactéries sont à haut risques potentiel de résistance, parmi elles, certaines sont responsables d'intoxications alimentaires.

Introduire volontairement des substances chimiques au sein d'un produit alimentaire afin de prolonger sa durée de vie, est l'évolution de la conservation des aliments depuis la Préhistoire.

I. Les additifs alimentaires

Les additifs modernes permettent de répondre aux besoins des industriels qui veulent produire en grande quantité, stocker sur de longues périodes sans que le produit ne s'altère, ou améliorer la texture, l'aspect, le goût des produits alimentaires et les rendre ainsi conformes aux exigences des consommateurs (Chevallier, 2007).

1. Historique

L'histoire de la conservation de la nourriture remonte à la préhistoire. L'Homme préhistorique devait manger le fruit de sa cueillette et de sa chasse immédiatement pour qu'il ne soit pas impropre à la consommation. Mais lorsque qu'il tombe par hasard sur des aliments séchés, il prend conscience que ces produits peuvent être consommés avec un certain délai, ce qui lui permettait par la suite d'avoir une réserve alimentaire pendant les périodes de non-cueillette et où la chasse était impossible.

C'est la naissance du premier conservateur alimentaire, celui de séchage. Puis c'est dans la période néolithique (-6 000 à - 2 200 ans avant Jésus-Christ) que le sel fût utilisé comme conservateur.

Enfin dans l'Antiquité (-3000 avant J-C à 476 après J-C), apparaît le troisième conservateur, le froid (les Romains emballaient des poissons dans de la neige et de la glace) (Gouget ; 2008).

Avant l'ère de l'industrie agroalimentaire et des grandes surfaces, la conservation des denrées alimentaires s'effectuait avec des produits ou des processus naturels :

- La conservation par la congélation : pour tout produit.
- La conservation par le fumage : pour la viande et le poisson.
- La conservation par le séchage : ou déshydratation pour les légumes.
- La conservation par appertisation : mise en bocaux de fruits et légumes.

- La conservation par le sucre : pour les fruits (cinquante pour cent de sucre).
- La conservation par les acidifiants : pour les légumes (proportion de vinaigre à hauteur de deux pour cent).
- La conservation par la saumure : composé de sel et de nitrite, elle est utilisée pour la viande, le fromage et le poisson (conservation dans un bain de saumure).
- La conservation par le sel : pour la viande, les légumes et le poisson (processus de salaison d'une proportion de sel de huit pour cent puis séchage de l'aliment) ((Gouget ; 2008).

2. Définition

Un additif alimentaire est défini comme toute substance qui n'est pas habituellement consommée en tant que denrée alimentaire en soi, et non utilisée comme ingrédient caractéristique de l'aliment, qu'elle ait ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à la denrée alimentaire dans un but technologique ou organoleptique, à une quelconque étape de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de la dite denrée, entraîne ou peut entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée ou peut affecter d'une autre façon les caractéristiques de la dite denrée (Aboiron et Hameury ; 2004).

L'expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires dans le but d'en maintenir ou améliorer les propriétés nutritives, ou au Chlorure de sodium.

Quand un additif alimentaire est autorisé, celui-ci bénéficie d'un code qui se compose de la lettre "E" suivie d'un numéro permettant d'identifier la catégorie autorisé au niveau européen (CODEX STAN 107-1981).

3. Classification des additifs alimentaires

Les additifs alimentaires sont classés dans des catégories fonctionnelles en considérant les propriétés principales d'utilisation.

Ce type de classement a été choisi en France, à la Communauté économique européenne (CEE) et au Codex alimentarius (Souverain, 1992).

Les additifs alimentaires sont classés selon la directive n°89/107 du 21.12.1988 de la CEE en 24 catégories (Tab. 3).

La numérotation de chaque substance sera précédée d'un numéro (E..., la lettre E suivi de 3 ou 4 chiffres) si un tel numéro lui a été attribué. La commission de Codex

alimentarius (CL 1988/52-FAC Novembre 1988) établit la liste des additifs dans un ordre numérique, avec le numéro attribué à chaque substance et l'indication de la fonction technologique de celle-ci.

Environ 450 substances. Elle propose un classement fonctionnel des additifs en 21 catégories (Tab. 4).

Tableau 3. Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius.

Classement des additifs selon le cadre de la CEE	Classement des additifs selon le cadre du Codex alimentarius
1. Colorant	1. Correcteur d'acidité et du pH (tamponnant),
2. Conservateur	2. Antiagglomérant (desséchant, antiadhérant),
3. Antioxygène	3. Antimoussant,
4. Emulsifiant	4. Antioxygène (et synergiste d'antioxydation),
5. Sel de fonte	5. Agent de charge,
6. Épaississant	6. Edulcorant,
7. Gélifiant	7. Colorant (et adjuvants de coloration),
8. Stabilisant	8. Stabilisateur de couleur,
9. Exhausteur de goût	9. Emulsifiant (plastifiant, dispersant, surfactif),
10. Acidifiant	10. Sel de fonte (émulsifiant pour fromage seulement),
11. Correcteur d'acidité (et de pH)	11. Exhausteur de goût,
12. Antiagglomérant	12. Agent de traitement de farine (conditionneur de pâte),
13. Amidon modifié	13. Gélifiant,
14. Edulcorant	14. Agent de glisse (d'enrobage, lustrage, vernissage),
15. Poudre à lever	15. Conservateur (antimicrobien),
16. Antimoussant	16. Gaz propulseur (et gaz pour le stockage, emballage),
17. Agent d'enrobage (et de glisse)	17. Stabilisant (liant, séquestrant, ajusteur de densité),
18. Agent de traitement de la farine	18. Épaississant (agent de texture, gonflant),
19. Affermissant	19. Poudre à lever,
20. Humectant	20. Agent moussant
21. Séquestrant	21. Humectant (mouillant, rétenteur d'humidité)
22. Enzyme	
23. Agent de charge	
24. Gaz propulseur et gaz d'emballage	

II. Les Conservateurs

L'industrie alimentaire dispose d'une vaste gamme de procédés chimiques de conservation. Il s'agit en principe, de substances capables de retarder ou d'arrêter la fermentation, l'acidification des aliments en inhibant la prolifération de micro-organismes (conservateurs proprement dites) ou d'empêcher des réactions chimiques dues à la présence d'oxygène (antioxydants) (SPE, 1987).

D'après le règlement n°1333 / 2008 de l'E.F.S.A. (*Autorité Européenne de Sécurité des Aliments*), l'additif alimentaire nommé conservateur, est un élément chimique qui allonge la période de conservation des aliments en les défendant des altérations dues uniquement au facteur biologique (bactérie et champignon) et les immunise contre le développement de toxines.

Lorsqu'un nouveau conservateur veut être intégré dans un produit alimentaire, c'est l'E.F.S.A. qui donne son feu vert à la suite d'études de toxicité sur des animaux et sur des humains. Lorsque ce conservateur répond aux normes européennes, il est répertorié en annexe II n°1129 / 2011 et en annexe III n°1130 / 2011 du règlement européen sur les additifs alimentaires n°1333 / 2008. Un numéro unique lui est alors attribué commençant par la lettre « E » suivi de trois chiffres dont la centaine commence par le « 2 ». Enfin, suite au rapport de l'enquête, une D.J.A. (*Dose Journalière Admissible*) lui est attaché.

1. Agents conservateurs (Antibactériens)

La multiplication des micro-organismes dans les produits alimentaires entraîne des modifications indésirables de ces produits et les rend impropres à la consommation par altération du goût, de l'aspect et de l'odeur, sans forcément de risque sanitaire (Oudiot, 1999).

Certains micro-organismes sont très dangereux (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*) de point de vue sanitaire et peuvent causer des troubles graves chez le consommateur, qualifiés habituellement d'intoxications. Ces germes strictement pathogènes sont dangereux même en faible quantité et en l'absence de développement ou de dégradation induite dans l'aliment (Bousbia, 2004).

Les principaux traitements appliqués aux produits alimentaires pour les conserver de ces germes sont classés en traitements d'élimination, de destruction et de stabilisation (Guiraud, 2003).

Ces traitements ne doivent pas rendre le produit toxique et ne doivent pas avoir de conséquences néfastes au point de vue organoleptique et nutritif (Bousbia, 2004). Parmi ces traitements figure l'ajout des conservateurs aux produits non toxiques pour le consommateur aux doses utilisées (Guiraud, 2003).

Un additif conservateur est défini comme étant une substance non consommée normalement en tant que denrée alimentaire, que l'on incorpore à un aliment en vue d'accroître sa sécurité et sa stabilité microbiologique. Il faut signaler que le terme additif ne s'applique qu'à des substances utilisées à dose faibles, en principe moins de 1% (Bourgeois, 1992).

Il existe deux types de conservateurs :

- Les agents conservateurs minéraux figurent les chlorures et les phosphates, les nitrates, les nitrites, les anhydres sulfureux et les sulfites, les anhydres carboniques et les bicarbonates et le peroxyde d'hydrogène.

- Les agents conservateurs organiques (acides organiques) ont un effet conservateur primaire (acide acétique, propionique, formique, sorbique, benzoïque, etc.) et un effet secondaire (acide citrique, tartrique, lactique, ascorbique, etc.) (Oudiot, 1992).

2. Mécanismes d'action des conservateurs

On distingue deux mécanismes d'action, suivant le type de conservateur antimicrobien utilisé :

- Les conservateurs bactéricides tuent directement les bactéries ; c'est une action dite irréversible.
- Les conservateurs bactériostatiques inhibent la multiplication des bactéries ; c'est une action dite réversible car ils ne tuent pas les microorganismes.

Les conservateurs agissent sur les microorganismes de façon différente selon le conservateur considéré, à un niveau bien déterminé de la structure ou du métabolisme du microorganisme, appelé site d'action ou cible du conservateur.

L'action peut se situer au niveau de la paroi bactérienne, des membranes, au niveau ribosomal, sur la synthèse des protéines, ou au niveau des acides nucléiques et des enzymes associées (Martini *et al.*, 1999).

Les mélanges de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque éléments et par là, même les éventuelles effets secondaires, et augmenter l'efficacité par synergie (F.B., 1996).

3. Qualité requise d'un conservateur

Aucun conservateur ne remplit tous les critères d'un système idéal. En pratique, des associations de conservateurs sont utilisées. Si le conservateur idéal existait il devrait présenter les critères suivants : (Denil et Lannoye ; 2001).

3.1. Innocuité

Le conservateur doit être dénué de tout effet toxique à la concentration utilisée pour la conservation, à court et à long terme.

En pratique, les conservateurs les plus efficaces sont souvent les plus toxiques.

3.2. Spectre d'activité

Le conservateur doit présenter un large spectre d'activité, il doit être actif sur les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif, les levures et les moisissures.

De plus, un haut niveau d'activité est demandé aux concentrations les plus faibles possibles, aussi bien pour diminuer la toxicité que le coût.

3.3. Efficacité à long terme

Les conservateurs devraient maintenir leur efficacité durant toute la vie du produit. Ils doivent présenter une activité constante dans le temps. De plus, ils ne doivent pas être dégradés, évitant ainsi le risque de produire des métabolites pouvant modifier les caractéristiques du produit, ou bien néfaste à la santé du consommateur.

4. Problèmes liés à certains conservateurs alimentaires

Les conservateurs constituent un thème récurrent d'interrogation et de débats. Chaque fois que ce thème est abordé, de nombreux consommateurs associent ces substances à des produits chimiques dangereux.

Présents dans les aliments, les produits cosmétiques ou les médicaments, les conservateurs sont omniprésents, la plupart des additifs sont aujourd'hui considérés comme inoffensifs, d'autres sont plutôt douteux, voire même dangereux selon des rapports d'études (Marie-Laure Andre, 2013), mais ils ne sont pas interdits, ce qui est source d'une grande controverse autour des additifs alimentaires, accusés d'être source d'allergies, d'intolérance alimentaire ou de maladies plus graves.

5. Quelques agents conservateurs minéraux

✓ Les nitrates et nitrites

NaNO₃ (E251, nitrate de sodium), NaNO₂ (E250, nitrite de sodium), KNO₃ (E252, nitrate de potassium) et KNO₂ (E249, nitrite de potassium), sont les premiers accusés car ils peuvent former dans notre organisme des nitrosamines dont certaines sont cancérigènes par combinaison aux protéines alimentaires (Binstock, 1998).

✓ Les Sulfites

Na₂SO₃ (E221, sulfite de sodium), K₂S₂O₅ (E224, disulfite de potassium), CaSO₃ (E226, sulfite de calcium) ce sont des conservateurs présents dans la plus part des produits alimentaires, ils sont susceptibles de provoquer des allergies et ils font partie des 13 allergènes à déclaration obligatoire lorsque leur concentration atteint 10 mg/kg dans le produit alimentaire concerné (ANSES, 2011).

Ils peuvent engendrer des composés mutagènes lorsqu'ils sont associés à d'autres additifs tels que les sorbates, et leur innocuité cancérologique n'est pas encore établie (ANSES, 2011).

Les manifestations allergiques se caractérisent par des éternuements, des démangeaisons, de l'urticaire, des douleurs abdominales et de l'asthme. En cas d'allergie avérée aux sulfites, il convient donc d'éviter tous les aliments contenant cet additif (Marie- Laure Andre, 2013).

✓ L'anhydride sulfureux

SO₂ (E220, anhydride sulfureux), sont rarement utilisés dans la conservation des produits animaux (viandes) où leur rôle serait pour l'essentiel anti botulique.

On sait que les aliments traités peuvent être à l'origine d'un sifflement respiratoire, de l'asthme, de l'urticaire, de l'eczéma, de la diarrhée, de l'hypotension avec éventuelle perte de connaissance (Gouget, 2011).

La prise de conscience du phénomène a permis un abaissement des doses utilisées : Le nombre important de substances où l'emploi de SO₂ est autorisé, fait que le risque semble élevé, surtout chez les enfants présentant les plus fréquentes intolérances (Andre, 1997).

6. Quelques agents conservateurs organiques

✓ Les benzoates

Les E210, E211, E212 et E213 sont des conservateurs qui bloquent le développement de certaines levures et moisissures.

Ils sont additionnés à plusieurs produits alimentaires pour prolonger leur durée de conservation (Gouget, 2011).

Ces substances peuvent être à l'origine de manifestations allergiques cutanées ou respiratoires: asthme, eczéma et éruptions cutanées de type urticaire. Certains auteurs les accusent également de s'accumuler dans l'organisme et de provoquer des troubles neurologiques (Moll, 2000).

La présence des benzoates dans de nombreux produits et les facilités avec laquelle la DJA (Dose journalière Admissible) est atteinte, en font un additif particulièrement dangereux pour la santé, notamment pour les enfants (Gouget, 2011).

7. Effet de combinaison des additifs alimentaires

L'effet cocktail des additifs, n'est autre que les risques potentiels liés à l'ingestion simultanée d'additifs dans notre organisme. Plusieurs dizaines d'additifs différents, sont présents dans les aliments transformés industriellement (Donna, 2007).

Les effets combinés de ces substances ingérées simultanément sont encore méconnus, si bien que la réglementation actuelle n'en tient pas compte pour fixer les doses maximales d'incorporation des additifs dans les produits alimentaires.

Certains additifs peuvent être inoffensifs lorsqu'ils sont consommés isolément, et toxiques lorsqu'ils sont combinés à d'autres molécules. Dans d'autres cas, un additif dont la nocivité pour la santé est avérée pourrait bien augmenter sa toxicité lorsqu'il est absorbé avec d'autres substances (Hubert, 1997).

Une équipe de chercheurs britanniques en 2007 a démontré les effets néfastes des combinaisons d'une catégorie de conservateurs (les benzoates) avec les colorants de synthèse sur le comportement des enfants. Ces combinaisons sont susceptibles de provoquer des troubles de déficit de l'attention chez les enfants et hyperactivité.

Les sorbates, conservateurs très utilisés en industrie agroalimentaire, sont susceptibles de réagir avec d'autres additifs. D'après une étude publiée en 1998, ils pourraient réagir avec les nitrites et nitrates ; la combinaison de ces molécules perturbe les

systèmes enzymatiques et peut aboutir à la formation de composés mutagènes (risque d'altération de L'ADN). Des spécialistes mettent en garde les femmes enceintes car cette association pourrait provoquer des malformations congénitales.

En 2005, une équipe de chercheurs britanniques a publié les résultats d'une étude menée sur trois ans, portant sur les interactions de quatre additifs alimentaires. Ils ont d'abord étudié les effets isolés de E951 (aspartame), du E621 (glutamates de sodium) et de deux colorants, les E104 (jaune de quinoléine) et le E133 (bleu brillant), puis les effets des combinaisons du glutamate avec le bleu brillant et ceux de l'aspartame avec le jaune de quinoléine sur les cellules nerveuses de souris de laboratoire (Gouget, 2011).

Les résultats ont montrés que ces quatre additifs sont de puissants inhibiteurs de la croissance des cellules nerveuses mais, surtout, que ces substances, une fois combinées, décuplent leur toxicité sur les cellules nerveuses: E133+E1621:toxicité multipliée par 4 et E104+E451:toxicité multipliée par 7.

Cette étude montre que la toxicité des substances combinées n'est pas simplement le résultat de la somme additionnelle des toxicités individuelles des molécules, mais bien une multiplication des toxicités (Brunellere, 2010).

Ces quatre additifs se retrouvent dans un grand nombre de produits alimentaires et l'inquiétude porte encore une fois sur les enfants dont les cellules du cerveau sont en pleine croissance (Gouget, 2011).

Afin de réduire les pertes économiques et contrer les maladies d'origine alimentaires, il est donc possible de trouver des alternatives à l'usage d'additifs synthétiques qui ne sont pas exempt de problème de santé.

Le monde scientifique s'efforce d'élargir l'éventail des systèmes antimicrobiens applicables en industrie. On étudie de nouveaux agents de conservation, avec un net penchant pour les antimicrobiens dits « biologiques », tels que les huiles essentielles, connus à la fois par leurs propriétés aromatisantes et antimicrobienne et leur toxicité réduites comparées à celle des additifs alimentaires chimiques, ainsi que leur large spectre d'activité en réduisant l'apparition de résistance bactérienne (Dorman *et al.*, 2000).

PARTIE II
Etude expérimentale

Matériels et méthodes

Malgré l'abondance du thym dans le Nord-Est-Algérien, et son usage très répandu, peu d'études ont été consacrées à l'inventaire des espèces endémiques de cette région. D'autre part aucune étude n'a été consacrée à l'usage de l'huile essentielle de ce végétal comme un antibactérien en substitution aux additifs alimentaires.

Nous nous sommes proposé de caractériser la zone d'étude, identifier les espèces de thym endémiques, qualifier et quantifier *in vivo* l'activité antibactérienne de l'**HE** des espèces retrouvées.

I. Enquête ethnobotanique

Nous avons établie une fiche d'enquête (Annexe 5) sous forme de questionnaire validé par le Pr. BENNADJA Salima.

Cette dernière nous renseigne d'une manière globale sur la place qu'occupe le thym dans notre patrimoine culinaire. Au même moment, rassembler des informations sur l'usage de cette plante en phytothérapie par la population des régions d'enquête.

1. Lieux de l'enquête

L'enquête s'est faite dans quatre wilayas d'une population assez importante, de l'Est-Algérien, dans les agglomérations à proximité des zones d'échantillonnage à savoir: Guelma et ses localités (Héliopolis, Hammam Debegh), Annaba et ses localités (Sidi Amar, Séraïdi, Berrahel), Souk Ahras et ses localités (Taoura, Zaarouria, Machrouha), et Constantine.

La plus part de ces localités, sont des zones montagneuses, influencées par un climat doux et ensoleillé, favorable à la culture des plantes aromatiques. Caractérisées par des reliefs diversifiés d'une importante couverture forestière, et le passage des Oueds qui constituent le principal cours d'eau, elles sont à vocation agricole, et abritant une densité d'agglomération importante.

2. Fiche d'enquête

Le questionnaire constitué de 10 paramètres, est divisé en deux parties : L'une concernant des informations sur les personnes questionnées (région, âge et sexe), et l'autre concernant la connaissance du thym, la source de l'information, l'utilisation ou non de thym, les parties utilisées, les domaines d'indications, les modes de préparation et les recettes, etc.

En effet, il est très important de traduire ce savoir traditionnel en un savoir scientifique afin de le revaloriser, de le conserver et de l'utiliser d'une manière rationnelle.

3. Population enquêtée

Nous avons soumis notre fiche d'enquête à un échantillon aléatoire de 60 sujets pour chaque lieu de l'enquête, pour finalement constituer un échantillon global de 240 personnes.

Une attention particulière a été donnée à des personnes apparemment de plus de 20 ans d'âge qui se prêtent à notre requête et des deux sexes.

II. Zones d'échantillonnage

Qui mieux que les herboristes connaît les coins où pousse le thym ?

Sur la base de renseignement des herboristes locaux, nous avons retenu quatre zones géographiques du Nord-Est-Algérien, ayant le même relief et s'étalant sur quatre régions.

- Région de Taoura (wilaya de Souk Ahras)
- Région de Djebel Maouna (wilaya de Guelma)
- Région de Djebel El Ouahch (wilaya de Constantine).
- Région de Berrahal (wilaya d'Annaba).

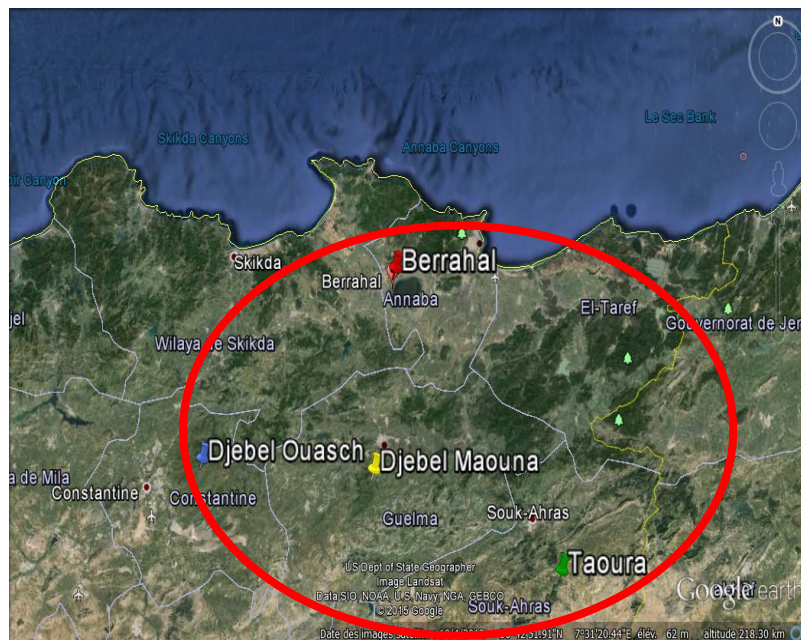


Figure 6. Situation géographique des zones d'échantillonnage (*Google Earth ; 2015*)

1. Situation géographique des zones d'échantillonnage

L'origine géographique de la plante, notamment l'altitude, est un facteur extrinsèque qui influence directement sur son développement, donc sur la composition quantitative et qualitative ainsi que sur le rendement en huile essentielle.

2. Aspect climatique

Toute espèce végétale a des exigences vis-à-vis du climat au sein duquel elle évolue. Celles-ci se traduisent par un certain nombre de besoins thermiques pour l'accomplissement de son développement et des besoins en eau pour sa croissance essentiellement.

Le facteur de compensation de l'humidité peut jouer, un rôle important dans le maintien du couvert végétal.

Pour mieux cerner les conditions climatiques, nous nous sommes intéressés aux paramètres suivants : la température moyenne, la pluviométrie et le taux d'humidité.

3. Aperçu pédologique

Le sol est un support extrêmement complexe où se déroulent simultanément une multitude d'interactions physiques, chimiques et biologiques. C'est à ce niveau que l'eau, les minéraux et les oligo-éléments essentiels à la croissance de la plante sont assimilés. Pour mieux apprécier l'environnement où l'espèce étudiée se développe, nous avons collecté les caractéristiques du sol des zones d'échantillonnage.

III. Matériel végétal

La plante choisie est une espèce spontanée appartenant au genre *Thymus*, de la famille des *Lamiaceae*, un des éléments caractéristique de la flore du Nord- Est Algérien. De part le monde, ce végétal est classé parmi les plantes les plus utilisées comme source d'épices et d'extraits à qualité médicinale intéressante.

1. Récolte de la plante

Nous avons récolté le thym en pleine période de floraison (photo1), durant les mois de Mai- Juin (2012- 2014). Les échantillons fraîchement récoltés sont soumis à l'identification botanique et à l'étude anatomique.

Les critères botaniques retenus pour la caractérisation morphologiques et macroscopiques spécifiques de chaque espèce sont :

- La tige, la feuille, la fleur, le calice et la corolle (Quezel *et al.*; 1962).



Figure 7. *Thymus numidicus* pendant la floraison (photo ; HENI. S. 2012)

2. Description anatomique

Pour rechercher des spécificités morphologiques et anatomiques de la plante, et localiser éventuellement les sites sécréteurs des essences aromatiques, nous avons accompli des coupes histologiques microscopiques au niveau de la feuille et la tige, par la technique de la double coloration (vert de méthyle - rouge Congo) (Langeron, 1934). Les échantillons sont immédiatement conservés dans l'éthanol dilué à 90% après la récolte.

➤ Principe de la technique

La technique employée est la double coloration vitale (double coloration des parois). Cette méthode a pour but de renforcer le contraste et de rendre plus évident les différents constituants tissulaires. Grâce à la réaction successive sur les coupes fines des solutions d'hypochlorite de sodium dilué, résultant la destruction des organites cellulaires et la conservation des parois cellulaires. On obtiendra la coloration en rose des membranes celluloseuses (parenchyme cellulosique, liber et collenchyme) et en vert les membranes lignifiées ou sclérifiées (bois, sclérenchyme).

➤ **Mode opératoire**

▪ **Préparation des coupes anatomique**

A l'aide d'une lame on pratique des coupes transversales minces, dans le but de déterminer les différents tissus. Ces coupes de tiges et feuilles sont disposées sur des tamis, prêtes à la coloration.

▪ **Technique**

- Traiter par l'Hypochlorite de sodium (eau de javel) à 12° pendant 15 min afin d'éliminer le contenu cellulaire et n'avoir que les parois squelettiques.
- Laver soigneusement les échantillons à l'eau distillée pour enlever l'excès d'hypochlorite, et répéter l'opération une deuxième fois.
- Traiter avec le vert de méthyle à 1% pendant 15 minutes qui colore les parois lignifiées et les tissus sclérifiés en vert, bleu ou violet.
- Laver rapidement à l'eau distillée afin d'éviter l'excès du colorant.
- Traiter au Rouge-Congo à 1% pendant 15 minutes, ce réactif en se fixant sur les glucanes, colore les tissus celluloseux en rose.
- Laver à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès du colorant.
- Mettre les échantillons traités entre lame et lamelle et observer au microscope optique au grossissement (Gx10) et (Gx40).

3. Séchage et conservation

Les parties aériennes (tige, feuille et fleur) du végétal considéré, sont délicatement trier et séché à l'air libre, et à l'obscurité pendant quinze jours.

Une fois séchée, la drogue est conservée dans des sacs en papier cellulose et mate à l'abri de l'humidité.

IV. Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs procédures d'extractions des **HEs**, parmi elles : l'Entrainement à la vapeur d'eau, l'enfleurage, l'hydrodistillation, l'extraction par gaz supercritique et le chauffage aux micro-ondes sous vide, etc.

Dans le but d'obtenir des substances volatils facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse, et afin d'éviter l'apparition des produits indésirables hydrosolubles dans l'huile recueillie. La méthode de choix reste

l'hydrodistillation, vue qu'elle est la plus employée à l'échelle industrielle pour la production d'HE, la plus simple et la moins coûteuse avec une reproductibilité facilement contrôlable (Bruneton 1993, Bendjilali *et al.*, 2004).

Ainsi, nous avons réalisé l'hydrodistillation à l'aide d'un appareil du type Clevenger au laboratoire de Botanique médicale du département de pharmacie à la Faculté de médecine de l'Université Badji Mokhtar – Annaba.

1. Méthodologie

➤ Principe

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux (Chemat *et al.*, 2009).

➤ Mode opératoire

Deux cent grammes de matériel végétal à distiller est placé dans un ballon de 2 litre avec 1 litre d'eau. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense rapidement et se retrouve dans l'ampoule à décantation qui permet la séparation immédiate de l'essence par sa densité.

Après 1h30 min à 2 heures d'extraction, l'huile essentielle a été récupérée.



Figure 8. Montage de l'appareil d'hydrodistillation (Labo. de botanique médicale UBMA. 2012)

2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement de l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité (AFNOR, 1986). Le rendement est exprimé en pourcentage :

$$R(\%) = M_{HE} / M_s \times 100$$

Sachant que :

- R : rendement en l'huile essentielle en %.
- M_{HE} : quantité de l'huile essentielle récupérée en gramme.
- M_s : quantité de la drogue utilisée pour l'extraction en gramme.

3. Conservation des huiles essentielles

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. L'instabilité relative des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation délicate (Bruneton *et al.*, 1993). Trois facteurs interviennent dans l'altération des huiles essentielles.

1. La température : obligation de stockage à basse température (entre 4 °C et 8 °C).
2. La lumière : stocker dans l'obscurité et dans un récipient opaque, brun de préférence.
3. L'oxygène : les flacons doivent être entièrement remplis et fermés de façon étanche, il est possible de recourir à l'adjonction d'antioxydants.

La durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

V. Etude analytique des huiles essentielles

A fin d'évaluer la qualité et la composition de nos extraits, nous avons réalisé une étude analytique, tout d'abord en déterminant les caractéristiques organoleptiques, les propriétés physico-chimiques, puis une analyse chimique.

Nous avons réalisé l'étude analytique des HEs extraites, au laboratoire de recherche de chimie analytique et physique de l'Université de Souk-Ahras.

1. Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Nous avons déterminé les propriétés organoleptiques des essences extraites, à savoir : la saveur, l'odeur et l'aspect.

2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles. Nous avons conduit nos essais selon des protocoles précis et obéissant à des normes édictées par l'Organisation Mondiale (I.S.O). Pour l'huile essentielle du thym c'est la norme NF ISO 4731 :2010 (NF T 75-212) qui est en vigueur.

2.1. Propriétés physiques

2.1.1. Densité relative : (Norme NF T 75 - 111)

➤ Définition

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un égal volume d'eau distillée.

➤ Principe

A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C.

La densité est donnée par la formule :

$$d_{20} = m_2 - m_0 / m_1$$

Sachant que :

- m_0 : masse en grammes du pycnomètre vide
- m_1 : masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau
- m_2 : masse en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

2.1.2. Indice de réfraction (Norme AFNOR, NF T 75 – 112)

➤ Définition

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux. De longueur d'onde déterminée, et passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

➤ Principe

Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700 ; l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée. Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700 ; l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

2.1.3. Miscibilité avec l'éthanol

Nous avons déterminé la miscibilité de l'huile essentielle à l'éthanol dans de l'éthanol à 70%.

Une huile essentielle est dite miscible à l'éthanol à 70%, lorsque le mélange d'un volume de l'huile essentielle avec (V) volume d'éthanol donne une solution limpide (AFNOR, 2010). Cette propriété est une méthode permettant l'étude de la qualité de l'**HE** falsifiée par des produits insolubles affectant la solubilité.

2.2. Propriétés chimiques

2.2.1. Indice d'acide

➤ Définition

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

➤ Mode opératoire

- Introduire dans un ballon ou une fiole, la prise d'essai ($2 \text{ g} \pm 0.05$) ;
- Ajouter 5 millilitres d'éthanol (95%) et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine (0.2%);

- Neutraliser le liquide avec la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.1 mole/l) contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose.

On peut réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester.

L'indice est donc donné par la formule :

$$IA = 5.61 V/m$$

Sachant que :

- 5,61 : correspond à 0,1mole/l de KOH ;
- V : est le volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée ;
- m : est la masse en grammes de la prise d'essai.

2.2.2. Indice d'Ester

➤ Définition

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters dans 1g d'huile essentielle.

➤ Principe

- Hydrolyser les esters par chauffage en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium.
- Doser l'excès d'alcali par une solution titrée.

➤ Mode opératoire

- Ajouter 25 millilitres d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0.5 mole/l dans le ballon,
- Adapter le réfrigérant,
- Placer sur le chauffe ballon et on laisse chauffer pendant une heure.
- Laisser refroidir, puis démonter le réfrigérant et ajouter 20 millilitres d'eau et 5 gouttes de la solution de phénolphaléine à 0.2%.
- Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0.5 mole/l) parallèlement,

- Effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution préparée de l'indice d'acide par 5 millilitres d'éthanol.

➤ **Expression des résultats**

L'indice d'ester est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{IE = 28,05/m (V_0 - V_1)}$$

Sachant que :

- 28,05 :correspond à 0,5mol/l de KOH ;
- V_0 :volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc ;
- V_1 :volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination de l'indice ;
- m:masse en grammes, de la prise d'essai.

3. Composition chimique

L'analyse chimique des **HEs** est une opération complexe nécessitant lamise en œuvre de plusieurs techniques. Parmi elles, l'utilisation d'une technique chromatographique (la chromatographie en phase gazeuse),couplée à une technique spectroscopique (la spectrométrie de masse).

Le couplage (CPG/SM), est la technique la plus utilisée dans le domaine des **HEs**, qui permet d'effectuer simultanément la séparation, l'identification et la mesure quantitative des différents constituants des essences extraites.

Nous avons déterminé lacomposition chimiques de nos **HEs**extraites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/ SM), au niveau du **C.R.D de la Société Algérienne des phytosanitaire (Alphyte Spa) ALGER.**

3.1. Principe de la technique

Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange à l'égard de deux phases, une phase stationnaire et une phase mobile. Elle est basée sur la répartition des analytes entre une phase stationnaire et une phase gazeuse. La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone qui imprègne une matière solide

inerte et granuleuse, l'ensemble est contenu dans une colonne en acier ou en verre de 1 à 3m de long généralement enroulée sur elle-même, et de 2 à 4mm de diamètre. La phase mobile est un gaz vecteur inerte comme l'azote, l'hélium ou l'argon.

La colonne est maintenue à une température élevée par l'intermédiaire d'un four. Sous l'effet de la température les analytes se volatilisent et deviennent séparables. La base de la séparation correspond à la différence des coefficients de partage des analytes volatiles entre la phase stationnaire et la phase gazeuse.

Cette méthode est réalisée de nos jours avec des colonnes capillaires faites de verre ou de métal d'un diamètre allant de 0.3 à 1mm. Un système de détection permet de créer un signal à la sortie de chaque molécule de la colonne, ce signal se traduit par l'enregistrement des pics correspondants à chaque analyte.

La CPG est couplée à un spectromètre de masse (SM), le couplage se base sur la comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence, permettant son identification. Pour que cela soit possible, il faudrait que le niveau de similitude des spectres (inconnu et référence) soit suffisant et que les indices de rétention soient identique (Bouchonnet *et al.*, 1999).

3.2. Conditions chromatographiques

- **Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**: L'appareil est de type :Hewlett Packard **Agilent6890N** piloté par Chemstation (NIST002).

Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

- Injection de 0.5 µl en mode Split 1/100.
- Température de l'injecteur : 250°C
- Colonne capillaire HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25µm)
- Programmation de température : 60°C Pendant 2min; 4°C/min jusqu'à 100°C pendant 0min ; 6°C/min jusqu'à 220 pendant 10 min.
- Débit du gaz vecteur : Hélium (1ml/min).

- **La Spectrométrie de masse (SM)**: l'appareil est d'un model **Agilent 5973**.

Les conditions opératoires sont les suivants :

- Températures : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C)
- L'énergie d'ionisation est de 70 électrons volt.



Figure 9. Appareil de la CG / SM (C.R.D. Alphyte. Spa. ALGER)

VI. Recherche de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites

La revue des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations (Burt ; 2004).

Les méthodes les plus utilisées peuvent être réalisées en milieu solide, en milieu liquide et enfin en micro-atmosphère.

Nous avons choisi la méthode de diffusion en milieu solide, appelée aromatoگرامme, méthode décrite par (Vincent, 1991). Cette méthode est la plus utilisée dans la littérature, car elle est relativement rapide, peu coûteuse facilement reproductible et ne nécessite pas un équipement de laboratoire sophistiqué.

1. Aromatoگرامme

L'aromatoگرامme est une technique inspirée de l'antibiogramme, disposant des souches bactériennes en présence d'extraits d'huile essentielle. L'effet antibactérien est déterminé en fonction des capacités d'inhibition de la croissance des bactéries par les **HEs** extraites.

C'est dans ce contexte qu'on a collecté sur une période de 24 mois (2011 à 2013), des souches bactériennes test-objet de différentes origines. Des souches collectées, d'origine humaine de pus, urine, prélèvement vaginale, coproculture et plaies

cutanées. D'autres sont incriminées dans la contamination et la détérioration des aliments, ou présente dans l'environnement y compris les eaux.

Ces souches bactériennes sont gracieusement offertes par les laboratoires de contrôle de qualité et répression des fraudes de la wilaya d'Annaba, le laboratoire régionale de la D.S.P de Guelma, le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Dorban d'Annaba et le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Ibn Zohr de Guelma.

Par ailleurs, des souches bactériennes faisant partie de la collection Américaine des culture type ATCC, et fournis par le laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Médecine d'Annaba, et d'autres mises à notre disposition par l'équipe de l'Institut Pasteur d'Alger.

Sur les 240 souches bactériennes collectées, nous avons retenus pour notre travail 157 souches multirésistantes selon les résultats de l'antibiogramme.

Les souches bactériennes test-objet sont accompagnées de fiches d'identification et résultats de l'antibiogramme. Cependant, et dans un souci de vérification, nous avons reconduit ces deux examens:

1.1. Identification et antibiogramme des souches bactériennes test-objet

1.1.1. Identification

Nous avons identifié les souches testées on se basant sur les examens microbiologiques suivants : isolement, observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram, la recherche de catalase, le test de coagulation pour les Cocci à Gram positif et le système Api [*API 20E / API 20NE / API Staph*] (Annexe 12).

1.1.2. Sensibilité aux antibiotiques

Cette technique s'est réalisée dans le but de comparer la sensibilité de nos souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques d'une part, et leur sensibilité aux **HEs** testée d'autre part (aromatogramme).

Nous avons réalisé l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller-Hinton selon les recommandations décrites par le [CLSI ; EU-CAST ; CASFM .2014]. Nous avons considéré les souches de sensibilité intermédiaire comme résistantes (I = R).

➤ **Antibiogramme**

• Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9% Na Cl et bien homogénéiser la suspension bactérienne jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0,5Mc Farland.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'inoculum doit être ensemencé dans les 15minutes qui suivent sa préparation.

• Ensemencement

- Le milieu Mueller-Hinton (MH) et MH additionné de 5% de sang de mouton pour les bactéries exigeantes, fondu et refroidi à 45°C, est coulé en boîtes de Pétri à une épaisseur de 04mm.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube sans oublier de faire pivoter, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois en tournant l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

• Application des disques d'antibiotiques

La liste des antibiotiques à tester, établie selon les souches bactériennes considérées et selon leur disponibilité.

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose ensemencée à l'aide d'une pince stérile et espacés de 24mm, centre à centre.

• Incubation

Les boîtes sont en suite incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

- Lecture

Mesurer en millimètre avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique et comparer ces résultats aux valeurs critiques, ce qui permet de classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

1.1.3. Tests complémentaires

La recherche de bêtalactamases et d'oxacillinases par des tests complémentaires, est réalisée suite aux résultats de l'antibiogramme, où nous avons noté une multirésistance à différentes familles d'antibiotiques.

- Recherche des bêtalactamases.

La détection phénotypique de β -lactamase à spectre étendue (BLSE), garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

- ✓ **Test de synergie**

Le teste de synergie permet la détection de β -lactamase à spectre étendue chez une souche donnée. Ces enzymes peuvent être mises en évidence par la méthode des disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération (cefotaxime, ceftazidime et céfepime) et l'aztréonam. Cette image dite en "bouchon de champagne" (CLSI –CASFM-EUCAST 2014).

- ✓ Technique

La recherche de β -lactamase à spectre étendue est faite dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10) et les disques de C3G (CTX 30 μ g, FEP 30 μ g, CAZ 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) à une distance de 20 à 30 mm sur les boîtes de Pétri. Incubation pendant 18 heures à 37°C \pm 1°C.

- ✓ Lecture

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

- **Recherche des oxacillinases**

La détection des oxacillinases est essentielle, tant pour la prise en charge thérapeutique que pour la prévention et le contrôle de l'infection ; les reconnaître chez un patient donné peut aider à adapter l'antibiothérapie.

- ✓ **Technique du Screening - Test à l'oxacilline pour *S. aureus***

Dans 10 ml d'eau distillée stérile, faite dissoudre 6 mg d'oxacilline, puis réalisé une dilution au dixième dans de l'eau distillée stérile. [CLSI- EU-CAST 2014].

A partir de la dilution préalablement préparée 2 ml sont disposés dans une boîte de pétri stérile de 90 mm de diamètre, auxquels on ajoute 18 ml de gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de Na Cl, fondu et refroidi à 45°C.

L'ensemble est délicatement homogénéisé par mouvement de rotation en forme de "8". Après solidification, la boîte de Pétri est divisée en trois secteurs: un est ensemencé par la souche à tester, deux par les souches de références: *S. aureus* ATCC 29213 (SASM) et *S. aureus* ATCC 43300 (SARM). Le quatrième cadran est non ensemencé.

- ✓ **Incubation**

Les boîtes sont ensuite incubées à 33°C pendant 24 heures.

- ✓ **Lecture**

La présence de plus d'une colonie suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les bêtalactamines [CLSI –CASFM-EUCAST. 2014]

1.2. Aromatogramme proprement dit

L'aromatogramme appelé aussi technique de Vincent, se fait à l'image de l'antibiogramme selon les recommandations du Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) et conforme aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie [CASFM- EUCAST ; 2014- V2], par diffusion en milieu gélosé, où les disques d'antibiotiques sont remplacés par des disques imbibés d'huile essentielle.

➤ **Principe**

La technique repose sur la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des **HEs** sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, extrêmement sensibles, ou résistantes.

➤ **Préparation des pré-cultures**

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches bactérienne est effectuée par repiquage à la surface de la gélose nutritive pré coulée en boîte de Pétri, et ensuite incubée à 37C° pendant 18 à 24h.

➤ **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure de 24h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9% Na Cl et bien homogénéiser la suspension bactérienne au vortex, jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0,5Mc. Farland (10^6 - 10^8 UFC/ml).

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

L'inoculum doit êtreensemencé dans les 15mn qui suivent sa préparation.

➤ **Ensemencement**

Le milieu MH et MH additionné de 5% de sang de mouton fondu et refroidi à 45°C, est coulé en boîtes de Pétri à une épaisseur de 04mm pour la solidification.

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube sans oublier de faire pivoter, afin de le décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois en tournant l'écouvillon sur lui-même.

- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, deux disques stériles ont été déposés à la surface de la gélose ensemencée et séchée, l'un imbibé de 20 µl d'huile essentielle pure et l'autre est un disque témoin vierge dépourvu de tout extrait.

➤ **Incubation**

Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24h.

➤ **Lecture**

L'activité antibactérienne lorsqu'elle existe est estimée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques chargés d'HE, à l'aide d'un pied à coulisse. Ce qui classe ainsi les souches bactériennes dans l'une des catégories suivante selon (Ponce *et al* 2003) :

- ✓ Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- ✓ Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- ✓ Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- ✓ Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Des souches de références de la collection américaines de cultures types (ATCC) sont incluses dans cette étude :

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible aux antibiotiques)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (sensible aux antibiotiques)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 433 00 (résistante à l'oxacilline SARM)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (sensible à l'oxacilline SASM)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible aux antibiotiques)

2. Quantification de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration des HEs, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou *et al.*, 2008; Derwich *et al.*, 2010).

L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de deux concentrations : la CMI et la CMB. Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide. Alors, nous avons déterminé la plus faible concentration active sur nos souches testées sensibles.

2.1. Concentration minimales inhibitrice (CMI)

Nous avons déterminé les *CMIs* des huiles essentielles extraites sur les souches bactériennes testées sensibles par la méthode d'incorporation en milieu gélosé selon les recommandations du CLSI, CA-SFM [EU-CAST ; 2014-V2].

Une gamme de dilution des **HEs** testées est réalisée dans de Diméthylsulfoxyde (DMSO).

Une fois obtenues, les dilutions sont additionnées de gélose MH et MH additionnées de 5% de sang pour les bactéries exigeantes, fondue et refroidie à 45°C au bain Marie, de telle manière à obtenir les concentrations suivantes : 1% ; 0,5% ; 0,4% ; 0,3% ; 0,25% ; 0,2% ; 0,15% ; 0,1% ; 0,075% ; 0,05% ; 0,025% ; 0,0125%, d'huile par ml de milieu de culture (Amrouni *et al.*, 2014).

Des spots de 2µL d'un inoculum standardisé au 0.5 Mac Farland sont déposés à la surface du milieu MH à l'aide d'une pipette Pasteur.

Toutes les boîtes sont incubées à l'étuve et à 37°C pendant 24h.

Des boîtes de culture témoins sans huile sontensemencées et incubées dans les mêmes conditions.

Les *CMIs* sont définies comme la plus petite concentration en présence de laquelle il n'y a aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu et similaire à la croissance de la même souche sur la boîte témoin (CLSI ; CA-SFM ; EUCAST ; 2014- V2 ; Guinoiseau, 2010).

2.2. Concentration minimales bactéricide (CMB)

La CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle qui détruit 99,9% de l'inoculum bactérien, ce qui correspond à un dénombrement bactérien inférieur à un

intervalle compris entre 10^4 et 10^2 UFC/ml après 24h d'incubation (l'inoculum initial étant entre 10^6 et 10^8) (Haddouchi 2009).

Les CMBs des huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes sont déterminées par repiquages par stries sur gélose nutritive sans huile à partir des traces de spots sans croissance apparente, correspondant à la CMI (Guinoiseau, 2010).

- S'il y a croissance bactérienne, l'HE a un effet bactériostatique sur les souches testées.
- S'il y a absence de croissance, l'HE présente un effet bactéricide vis-à-vis des souches testées.

3. Détermination de type d'activité : (bactéricide / bactériostatique)

On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes, une activité létale (bactéricidie) et une inhibition de la croissance (bactériostase). (Pibiri. 2006).

La détermination de type d'activité des HEs nous permet de déterminer à qu'elles concentrations ils sont actives, ainsi que leur spectre d'action. (Klaric *et al.* 2006)

Alors, nous avons déterminé le rapport CMB/CMI, afin de déterminer le type du pouvoir bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles testées.

Si le rapport $CMB/CMI \geq 4$ \longrightarrow l'HE a un pouvoir bactériostatique.

Si le rapport $CMB/CMI \leq 4$ \longrightarrow l'HE a un pouvoir bactéricide. (Oussou *et al.*, 2008).

VII. Cytotoxicité des huiles essentielles

Nous avons effectué les tests toxicologiques au niveau du laboratoire de recherche Toxicologie cellulaire (UBMA).

1. Objectif

Evaluer *in-vivo* l'effet toxique des huiles essentielles testées, sur un modèle unicellulaire, le protiste cilié : *Paramecium sp.* Comme modèle alternative au laboratoire. En suivant la cinétique de sa croissance en présence de l'huile ;

2. Choix de *Paramecium sp.* comme modèle biologique

En effet, la paramécie est connue comme un organisme unicellulaire modèle, cette espèce eucaryote, ubiquitaires dans l'environnement aquatique et terrestre, caractérisées par un court cycle de vie, et une multiplication rapide (Beal et Anderson, 1993).

Toute modification de leurs milieu pourrait affecter leurs comportement, ce qui a conduit à les utiliser comme modèles cellulaires pour l'étude de nombreuses fonctions tel que l'effet toxique des substances chimiques, dont les xénobiotique, ainsi que l'évaluation des risques pour la santé (Azouz *et al.*, 2011 ; Benbouzid *et al.*, 2012).

La paramécie est facile à cultiver, sa taille permet de suivre à faible grossissement le cycle cellulaire, la conjugaison, lecomportement, la sécrétion, la morphogenèse, etc.

L'ensemble de ces données expérimentales nous ont donc conduits à choisir *Parameciumsp.* comme modèle d'étude.

3. Rappels sur la Paramécie (*Parameciumsp.*)

C'est un genre bien connu de protozoaire cilié, et couramment étudié comme représentant type de ce groupe. La taille de la cellule varie de 50 à 300 μm de long suivant les espèces (Wichterman 1985).

La paramécie utilise des cils pour se déplacer et se nourrir, la ciliature somatique, qui recouvre la cellule et bat de façon synchronisée, lui permet de se déplacer.

Une ciliature orale distincte couvre la grande invagination ventrale en forme d'entonnoir, le péristome, qui mène jusqu'au cytostome (la bouche). Elle se nourrit essentiellement de bactéries par phagocytose.

La paramécie vit isolée en eau douce, elle apparaît en grand nombre dans les infusions de végétaux, rendant sa culture et son étude aisée (Beaumont et Cassier, 1998). Par leur grande taille et l'extrême facilité de leur culture, les paramécies constituent un matériel de choix pour l'étude morphologique, cytologique et cytochimique des Protozoaires Ciliés.

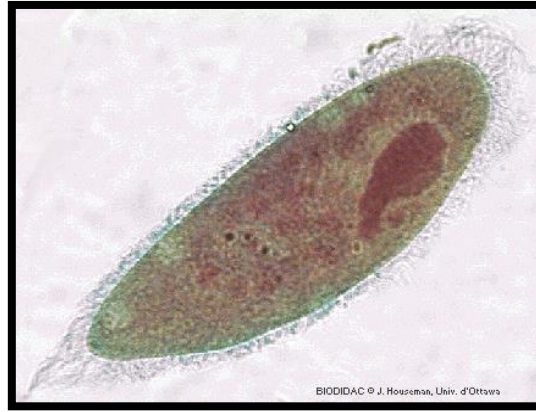


Figure 10. Structure d'une paramécie sous microscope
(<http://assouguem.com/cour-fau/>)

4. Préparation de cultures de paramécies

La méthode utilisée est celle de Beaumont et cassier (1998) et comprend :

- *Une culture mixte*

Du foin est coupé en petits morceaux et infusé dans un récipient contenant de l'eau de robinet. La préparation est laissée dans un lieu tiède, sombre et aéré. Quelques jours plus tard (3 à 4 jours) apparaît un voile bactérien sur la solution. On filtre l'infusion et on observe, sous microscope optique et sans coloration, les premiers ciliés. Ces organismes se nourrissent au dépend du voile bactérien.

- *Une culture pure*

Pour suivre pendant plusieurs semaines la descendance d'une paramécie ou pour obtenir un grand nombre de ces Protozoaires, il est nécessaire de réaliser des cultures pures. Le milieu de culture est préparé selon la méthode de (Beisson *et al.*, 2010).

Pour l'obtention des cultures pures de *Paramecium* sp, nous avons utilisé des infusions de laitue. La méthode consiste à sécher quelques feuilles de laitue dans une étuve (100°) jusqu'à ce qu'elles soient brunes et fripées. Les réduire en poudre dans un mortier. Cette poudre peut être conservée indéfiniment dans un récipient hermétiquement clos.

- Ajouter 1,5 gr de cette poudre à un litre d'eau distillée et porter à ébullition pendant 5 minutes.

- Filtrer le liquide chaud et procéder à une répartition du milieu de culture dans des flacons de 250 ml avant de les faire passer à l'autoclave.

- Laisser reposer au moins une nuit, on ensemence la souche bactérienne de *Klebsiella pneumoniae* et au fur et à mesure des besoins, le milieu est dilué. (Beaumont et Cassier, 1998).

Le milieu et la culture pure de paramécie (*Paramecium sp*), nous a été fournis par le laboratoire de Recherche de Toxicologie Cellulaire de l'Université Badji- Mokhtar – Annaba où notre travail a été effectué.

5. Traitement de *Paramecium sp* par les huiles essentielles testées

➤ Détermination des concentrations des huiles essentielles testées

A partir des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des **HEs** de *Thymus ciliatus* (la plus active) et *Thymus numidicus* (moyennement active) testées sur notre gamme de bactérie, et après plusieurs essais, nous avons pu déterminer les concentrations suivantes :

- Pour l'**HE** de *T. ciliatus* de Taoura (Ta), nous avons retenu trois concentrations croissantes : 0,025%, 0,075% et 0,25%.
- pour l'**HE** de *T. numidicus* de Djebel el Ouahch (Ou), nous avons retenu aussi trois concentrations : 0,1%. 0,15% et 0,5%.

➤ Protocole expérimental

La densité cellulaire de la paramécie est de 1000 cellules/ millilitre correspondant à la phase exponentielle de la courbe de croissance de *Paramecium sp*. atteinte au bout de 3 jours.

Les tests toxicologiques sont répétés trois fois, selon le protocole suivant :

- Nous avons rajouté les différentes concentrations sus- citées des **HEs** testées à 10ml de milieu de culture de *Paramecium sp*.
- Le diméthylsulfoxyde (DMSO) permet une bonne miscibilité des **HEs** avec le milieu de culture des paramécies, ayant aucun effet sur les paramécies, est utilisé comme témoin.

6. Cinétique de croissance des cellules

Nous avons effectué la cinétique de croissance des paramécies, par le comptage cellulaire manuel (compteur manuel) sous microscope optique en fonction du temps (Sauvant *et al.*, 1999). Le comptage est facilité par la fixation des cellules avec du lugol.

Dès la mise en contact de l'HE avec le milieu de culture, une cinétique de croissance est suivie en fonction du temps (comparer toujours au témoin).

T_{0h} → Observation microscopique + comptage de cellules

T_{2h} → Observation microscopique + comptage de cellules



T_{72h} → Observation microscopique + comptage de cellules

L'observation microscopique est réalisée sous microscope photonique (Leica DL 1000) au grossissement (x10).

7. Calcul du pourcentage de réponse

C'est un calcul qui évalue la réponse du protiste vis-à-vis des huiles essentielles, il est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de réponse} = [(N_C - N_E) / N_C] \times 100$$

-N_C : Nombre des cellules témoins

- N_E: Nombre final des cellules traitées

Les valeurs positives de pourcentage de réponse indiquent une inhibition de la croissance tandis que les valeurs négatives indiquent une stimulation de la croissance (Wong *et al.*, 1999) .

VIII. Recherche de synergies Antibiotique/ huile essentielle

Au cours de ces dernières années, l'utilisation des molécules bioactives de plantes en combinaison avec les antibiotiques standards, dans le traitement des infections bactériennes est de plus en plus reconnue, afin de surmonter les mécanismes de résistance des bactéries (Rosato *et al.*, 2008 ; Fadli *et al.*, 2012).

L'huile essentielle des espèces du genre *Thymus* a fait l'objet de plusieurs études concernant l'effet synergique, avec différentes familles d'antibiotiques, sur des bactéries de groupes physiologiques distincts.

Dans notre travail, nous avons recherché la synergie entre l'**HE** de *T. ciliatus* et les antibiotiques, sur des souches bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aussi bien aux antibiotiques qu'à l'huile essentielle.

Pour le test de synergie, nous avons appliqué la même technique du double disque décrite selon (CA-SFM, CLSI, 2011).

➤ **Technique**

On procède de la même manière que la technique d'antibiogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis à la surface de la gélose, on dépose deux disques placés côte à côte: un disque d'antibiotique et un disque imbibés de 5µl d'**HE** (volume convenant à la sub-CMI pour s'assurer que l'effet observé n'est pas dû uniquement à l'effet de l'**HE** seule).

On laisse diffuser pendant une heure de temps, à la température ambiante du laboratoire, puis on remplace le disque d'antibiotique par un disque imbibé d'**HE**, et ce dernier par celui de l'antibiotique.

On incube pendant 24h à 35°C.

➤ **Lecture**

On mesure les zones d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse, puis on compare les résultats obtenus avec ceux de l'antibiogramme et de l'aromatogramme.

X. Usage de l'huile essentielle comme conservateur alimentaire

Les produits alimentaires sont souvent exposés aux problèmes de contamination par les micro-organismes, menant à des pertes économiques considérables et des risques sanitaires pouvant mettre en danger la vie humaine. La viande rouge est sans aucun doute l'un des aliments les plus exposés à ce fléau.

Pour des raisons nutritionnelles la viande rouge occupe une place de choix dans l'alimentation de l'homme. De ce fait elle fait l'objet d'une préoccupation croissante de la société moderne. Sa préservation se faisait autrefois, par séchage, salaison ou par fumaison. Sa haute valeur biologique, la rend un terrain favorable à la prolifération microbienne en outre les bactéries potentiellement pathogènes. Ces dernières peuvent être à l'origine d'infection ou de toxi-infection lorsqu'elles produisent des entérotoxines.

La préservation de la contamination menée par la réfrigération ou par l'addition de conservateurs antibactériens montre beaucoup de limites. Elles sont sources de problème de santé allant jusqu'à des effets toxicologiques et tératogènes (Ho *et al.*, 2009; Chahardehi *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs bactéries ont acquis la capacité de se multiplier à 4°C, telle que, *Listeria monocytogenes* et *Francisella tularensis*.

Pour remédier à ce problème plusieurs auteurs ont recours à des substances naturelles d'origine végétale. Nous proposons l'usage de l'**HE** du thym par recherche d'effet conservateur (appliquée à une faible concentration) de la viande rouge.

Nous avons recherché l'effet inhibiteur de l'huile essentielle additionnée à une denrée alimentaire sensible et de valeur nutritive essentielle : la viande. Et déterminer le taux d'abattement de la microflore mésophile aérobie totale (*MMAT*) et de *Staphylococcus aureus*.

1. Test de dégustation

Selon Burt (2004), les valeurs des CMI obtenus « *in vitro* » devraient être affectées d'un coefficient correcteur allant de 2 et 100, pour qu'elles aient le même effet dans une matrice alimentaire.

L'utilisation des **HEs** dans les produits alimentaires est souvent limitée par des effets indésirables (odeur forte, changement du goût) qu'elles peuvent engendrer dans l'aliment.

Pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la CMI de l'**HE**, capable d'inhiber la croissance bactérienne sans altérer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment, à savoir le goût et l'odeur.

Nous avons procédé à des tests préalables de dégustation de la viande additionnée de 0,025% d'**HE**. Cette concentration est la CMI modale (CMI_m) de l'**HE** testée « *in vitro* » qui correspond à 0,2mg/ml. La CMI_m est multipliée par un des coefficients (2, 4 et 8), afin de choisir celle qui n'altère pas le goût ni l'odeur.

- Les steaks additionnés de [CMI x2, CMI x 4 et CMI x 8] sont cuits dans les mêmes conditions.
- Les attributs sensoriels déterminés sont le goût et l'odeur, ainsi, le critère de l'odeur est structuré sur deux valeurs : odeur forte, et odeur inaperçue.
- Par contre le critère du goût a été structuré sur trois valeurs : bon, piquant et désagréable.
- D'après les résultats de la dégustation des steaks, et dont le goût est jugé bon et l'odeur inaperçue, nous avons pu déterminer la CMI d'**HE** additionnée à la viande.

C'est pourquoi des tests préalables de dégustation dans ce genre de travail sont indispensables.

- Alors, nous avons jugé utile de multiplier la valeur de CMI, par un coefficient correcteur de 4.

2. Protocole expérimental

- Additionner 0,1% d'**HE** à quatre échantillons de 25g de viande ;
- Analyser le premier échantillon à un temps de $T_0=0\text{min}$ (directement après l'addition de l'huile ;
- Conserver les 3 autres échantillons à 4°C, pour dénombrer la charge bactérienne à différents temps: $T_1=40\text{min}$, $T_2=24\text{h}$, et $T_3=48\text{h}$.
- Suivre le même protocole, pour les échantillons non additionnés d'**HE**(Témoins) et conservés dans les mêmes conditions.

3. Dénombrement des bactéries

3.1. Dénombrement de la microflore mésophile aérobie totale (MMAT)

Nous avons recherché la *MMAT* par la méthode de colimétrie en milieu liquide (le nombre le plus probable : NPP), pour les deux échantillons, additionné d'**HE** et le témoin; pendant les différents temps de conservation à savoir : $T_0=0\text{min}$, $T_1=40\text{min}$, $T_2=24\text{h}$ et $T_3=48\text{h}$.

➤ *Ensemencement*

- A partir des dilutions (10^{-1}), (10^{-2}) et (10^{-3}), introduire 1ml de l'inoculum dans des tubes contenant 7ml de bouillon nutritif (une série de 4 tubes pour chaque dilution).
- Bien homogénéiser les tubes à l'aide d'un agitateur.

➤ *Incubation*

Les séries de tubesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h.

➤ *Lecture*

- Sont considérés comme positifs, les tubes présentant un trouble du milieu de bouillon nutritif.
- La lecture finale, ainsi que le dénombrement de bactéries par la recherche du nombre le plus probable (NPP) sont effectuées selon les prescriptions de la table de Mac Grady.

3.2. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

➤ *Ensemencement*

Des boîtes de Pétri contenant le milieu sélectif Chapman ont été ensemencées avec 0.1ml de la dilution (10^{-1}) à la surface par râteau.

➤ *Incubation*

Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48h.

➤ *Lecture*

Les *Staphylococcus aureus* sont pigmentées en jaune, entourés d'un halot claire. Les staphylocoques non pathogènes se caractérisent par des colonies transparentes et visqueuses. Le nombre de *Staphylococcus aureus* est déterminé en Log_{10} UFC/g d'échantillon.



Figure 11. Schéma simplifié du protocole expérimental

4. Calculer le taux d'abattement

L'abattement des bactéries a été étudié sur les deux matrices alimentaires : la viande additionnée d'huile essentielle (traitée) et celle non additionnée d'**HE** (Témoin). L'abattement considéré par cette étude est la différence entre le nombre de bactéries recherché dans la viande non additionnée d'**HE** (Témoin), et le nombre de bactéries recherché dans la viande additionnée d'**HE**, pour la microflore mésophile aérobie totale (*MMAT*) et pour les *S. aureus* dénombrés pendant les quatre temps (0h, 2h, 24h et 48h).

L'abattement est exprimé en pourcentage, on le calcule selon la formule suivante :

$$\text{Abattement} = [(NA - N) / NA] \times 100$$

NT : c'est le nombre de bactéries calculé dans la viande non additionnée

N : c'est le nombre de bactéries calculé dans la viande additionnée

5. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont approuvés par calcul des moyennes et comparaison par rapport au témoin par le logiciel *Minitab 16* en utilisant le *test e*. L'analyse de la variance à un seul facteur (*one-way ANOVA*) associé à la méthode de *Tukey* par calcul du degré de signification. Le niveau de confiance est de 95.00% et la différence entre les moyennes est considérée : très hautement significative si $p \leq 0,01$, hautement significative si p est compris entre 0,01 et 0,1 ; il n'y a pas de différence significative si $p \geq 0,5$.