



**UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAADI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES - Tanger**

**Centre d'Etudes Doctorales: Sciences et Techniques de l'Ingénieur
Formation Doctorale: Sciences et Techniques de l'Ingénieur**

THESE DE DOCTORAT

Présentée

Pour l'obtention du

DOCTORAT EN Sciences et Techniques de l'ingénieur

Par: Melle CHERRAT Lamia

Discipline: Biotechnologie

Spécialité: Microbiologie

Titre de la Thèse:

Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques et médicinales du Maroc et évaluation de leurs effets combinés avec des méthodes de conservation alimentaire.

Soutenue le 11/05/2013 devant le Jury

<i>Pr. PAGAN Tomas Rafael (Université de Saragosse)</i>	<i>Président</i>
<i>Pr. EL HASSOUNI Mohammed (Université Mohamed Ben Abdellah)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. FILALI-MALTOUF Abdelkrim (Université Mohamed V)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. OULAHAL Nadia (Université de Lyon)</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Pr. ARAKRAK Abdelhay (Université Abdelmalek Essaâdi)</i>	<i>Examineur</i>
<i>Pr. DEGRAEVE Pascal (Université de Lyon)</i>	<i>Examineur</i>
<i>Dr. El MZIBRI Mohamed (CNESTEN Rabat)</i>	<i>Invité</i>
<i>Pr. LAGLAOUI Amin (Université Abdelmalek Essaâdi)</i>	<i>Co-encadrant</i>
<i>Pr. BAKKALI Mohammed (Université Abdelmalek Essaâdi)</i>	<i>Directeur</i>

Structure de recherche accréditée d'accueil:

Références: UAE/ FST: Equipe de la FST de Tanger

A dieu qui m'a donné la force d'affronter chaque jour

A mes parents pour m'avoir soutenue et motivée

A ma sœur et mes frères

A toute ma famille

Remerciements

Ce travail de recherche marque l'aboutissement d'années de travail fastidieux et enrichissant, qui n'aurait pu aboutir sans la participation et la collaboration de près ou de loin de nombreuses personnes que je tiens à remercier sincèrement.

Je souhaite remercier tous d'abord tous les membres du jury, Mme OULHAL Nadia, M. DEGRAEVE Pascal, M. ARAKRAK Abdelhay, M. EL Mzibri Mohamed, M. FILALI Maltouf Abdelkrim et M. HASSOUNI Mohamed, qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Mes remerciements vont à Monsieur Rafael Pagán d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de cette thèse. Qu'ils soient assurés de ma respectueuse considération et ma sincère gratitude.

Mes remerciements vont particulièrement à mon directeur de recherche Monsieur Bakkali Mohammed et à mon co-directeur Monsieur Laglaoui Amin, pour m'avoir accueillie dans leur équipe, encadrés et guidés tout au long de l'accomplissement de ce travail. Je les remercie vivement pour leur soutien ainsi que leurs conseils. Je désire également exprimer ma reconnaissance à Monsieur Pagán Rafael de la Faculté vétérinaire de Saragosse pour son accueil au laboratoire de technologie alimentaire, pour les moyens et aide scientifique mis à ma disponibilité. Je tiens aussi à exprimer ma vive reconnaissance à Mme Oulahal Nadia et Mme Dumas Emilie du laboratoire de BioDyMIA de l'Université de Lyon 1 pour leurs accueils au laboratoire et leurs conseils judicieux. Ce travail n'aurait pu aboutir sans la précieuse collaboration de toutes ces personnes.

Je profite de l'occasion pour adresser un immense merci à tous les membres du laboratoire de Biotechnologie et Génie des Biomolécules. Merci à l'ensemble de mes collègues et amis de travail qui, par leur amitié, m'ont épaulée tout au long des années, pour l'amitié qu'ils m'ont témoigné et tous les moments passés ensemble, plus particulièrement à mes chères Amina et Sara pour leurs amitiés et écoute attentive, sans oublier Saida, les deux Chaymae, Nadira, Nabila

et Sanae. Une pensée encore plus particulière envers ma chère Ouiam pour sa sympathie, son soutien et sa présence durant mes débuts au laboratoire.

Je souhaite aussi exprimer mes sincères remerciements à tous les enseignants du Département du Biologie de la Faculté de Sciences et Techniques de Tanger.

Mes plus sincères et profondes pensées s'adressent à toute ma famille. Merci à mes parents, en témoignage de ma profonde affection, pour avoir été là en toutes circonstances, pour m'avoir toujours soutenue et pour m'avoir donné la force de réaliser ce travail. Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et toute ma gratitude.

Le candidat a bénéficié d'une bourse d'excellence octroyée par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique et ce dans le cadre du programme des bourses de recherche initié par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique.

Résumé

La demande croissante de la part des consommateurs à avoir des aliments de haute qualité, plus naturels et faiblement traités a poussé au développement de nouvelles méthodes de conservation qui permettront de garantir la sécurité sans altérer la qualité des aliments. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles molécules actives a reçu une grande importance pour une éventuelle application dans le domaine agro-alimentaire ainsi que médicale, spécialement les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques et médicinales qui présentent des sources potentielles très riches en molécules bioactives. Le but de notre travail de recherche est d'évaluer les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de 5 huiles essentielles du Nord du Maroc (*Mentha pulegium*, *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis* et *Satureja calamintha* Scheele), leur mode d'action antibactérien ainsi que de développer des processus de préservation alimentaires combinés. On a tout d'abord déterminé la composition chimique des 5 huiles essentielles et on a évalué leur activité antioxydante par trois tests différents. Les résultats obtenus ont révélé que l'huile de *L. nobilis* s'avère la plus efficace alors que les huiles de *S. calamintha* et *M. communis* expriment la plus faible activité antioxydante. Les huiles essentielles ont fait aussi l'objet d'une évaluation de leur activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes ou d'altération par la méthode de diffusion en agar et la méthode de micro-dilution. Les souches bactériennes ont montré divers degrés de sensibilité ; Les Gram-négatives étant généralement plus résistantes. Parmi ces huiles, celles de *L. nobilis* et *M. pulegium* étaient les plus actives. Les huiles de *L. stoechas* et *S. calamintha* ont montré une bonne activité antibactérienne mais sont non bactéricides contre certaines souches, tandis que *M. communis* était l'huile la moins active avec une résistance de toutes les souches testées à son effet bactéricide. Toutes les huiles essentielles étaient capables d'inhiber la croissance mycélienne des deux souches de champignons filamenteux (*A. flavus*) mais à des degrés variés. Dans le but de comprendre le mode d'action de ces huiles essentielles, nous avons évalué l'effet de 3 huiles sur la viabilité cellulaire, l'intégrité membranaire ainsi que la fluidité membranaire par le kit LIVE/DEAD® BacLight™ et par anisotropie de fluorescence. Les 3 huiles induisent une réduction de la viabilité cellulaire. Les analyses par microscopie à épifluorescence ont montré qu'elles provoquent des dommages aux membranes des cellules bactériennes altérant ainsi leur intégrité membranaire. Les cellules de *L. innocua* et *E. coli* en présence des 3 huiles restent en état viable mais non cultivable (VNC). L'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH en présence des huiles essentielles confirme que la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes a été la cible de leurs effets entraînant une altération de la fluidité des membranes par fluidisation ou rigidification selon l'huile essentielle. Ce travail étudie également les effets synergétiques possibles de la combinaison de faibles concentrations de chaque huile essentielle (0,2 µl/ml) avec un traitement thermique modéré (54°C/10min), un traitement de hautes pressions hydrostatiques (HPH) (175-400 MPa/20 min) ou un traitement de champ électrique pulsé (30 kV/cm/25 pulsations). De hauts degrés d'inactivation ont été atteints avec des effets synergétiques effectifs (jusqu'à 5 cycles d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 et de *L. monocytogenes* EGD-e) lorsque les huiles ont été combinées avec la température ou les HPH. Tandis que la combinaison avec le champ électrique pulsé était nettement moins efficace ne montrant presque pas d'effets synergétiques ou additifs. Ces traitements combinés permettent la diminution des concentrations en huiles essentielles tout en réduisant l'intensité de chaque traitement et par conséquent on pourrait améliorer la qualité des aliments traités. Finalement, une évaluation de l'efficacité anti-biofilm d'huiles essentielles sélectionnées apparaît intéressante contre les contaminations des surfaces dans les industries

alimentaires. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *L. nobilis* a montré un effet antibiofilm intéressant contre un biofilm (de 6 h et 48 h) des cellules de *L. innocua* adhérentes sur des aciers inoxydables.

Mots clés: Huile essentielle, activité antibactérienne, activité antioxydante, microscopie à épifluorescence, fluidité membranaire, processus combinés, activité antibiofilm.

Abstract

The increasing demand from consumers to have high quality, more natural and minimally processed food has led to the development of new preservation methods that will ensure security without altering their quality. In this context, the search for new active molecules has been of great importance especially essential oils extracted from aromatic and medicinal plants that are potential rich sources of bioactive compounds. The aim of this investigation is to evaluate the antimicrobial and antioxidant properties of five essential oils from Morocco (*Mentha pulegium*, *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis* and *Satureja calamintha* Scheele), their mode of action and to develop combined preservation methods that will minimize the intensity of each treatment while improving their lethal efficiency. We first identified the chemical composition of the five essential oils and evaluated then their antioxidant activities by three different tests. The results showed that *L. nobilis* oil was the most effective, while *S. calamintha* and *M. communis* oils reveal the lowest antioxidant activity. Essential oils have also been subject to evaluation of their antibacterial activity against pathogenic or deterioration microorganisms by disc diffusion and micro-dilution methods. Bacterial strains showed varying degrees of sensitivity and Gram-negative bacteria were generally more resistant to tested essential oils. Among these oils, *M. pulegium* and *L. nobilis* were the most actives. *L. stoechas* and *S. calamintha* showed good antibacterial activities but were not bactericidal against some strains while *M. communis* oil was the least active with the resistance of all tested strains to its bactericidal effect. All assayed essential oils have shown capacity to inhibit the mycelial growth of two fungi strains but at varying degrees. To understand the mode of action of essential oils; we evaluated their effect on cell viability, membrane integrity and membrane fluidity by LIVE/DEAD® BacLight™ kit and anisotropy of fluorescence. The 3 oils induce a reduction in cell viability. Analysis by epifluorescence microscopy showed that the oils cause damage to bacterial cell membranes thereby altering their membrane integrity. Cells of *L. innocua* and *E. coli* in presence of essential oils enter into viable but non-culturable state (VBNC). The anisotropy of fluorescence of TMA-DPH and DPH in presence of essential oils confirms that the cytoplasmic membrane of the bacterial cells has been the target of their effects causing fluidization or rigidification of the membrane. *M. pulegium* oil acts differently on membrane fluidity of bacterial cells in comparison with *L. nobilis* and *S. calamintha* oils. This work also examines the possible synergistic effects of the combination of low concentrations of each essential oil (0.2 µl/ml) with moderate heat treatment (54°C/10min), high hydrostatic pressure treatment (175-400 MPa/20 min) or pulsed electric field treatment (30 kV/cm/25 pulses). High levels of inactivation were achieved with effective synergistic effects (up to 5 cycles of inactivation of *E. Coli* O157: H7 and *L. monocytogenes* EGD-e) when the oils were combined with heat or HPH treatments. While, the combination of essential oils with pulsed electric field was less effective showing almost no synergistic or additive effects. Combined treatments allow the application of low concentrations of essential oils, to reduce the intensity of each treatment and therefore enhance the quality of processed foods. Finally, The essential oil of *L. nobilis* has shown antibiofilm effect against *L. innocua* biofilm (6h and 48h) adhered on stainless steels.

Keywords: Essential oil, antibacterial activity, antioxidant activity, epifluorescence microscopy, membrane fluidity, combined process, antibiofilm activity.

ملخص

الطلب المتزايد من قبل المستهلكين من أجل الحصول على أغذية ذات جودة عالية أكثر طبيعية ومعالجة بطريقة أقل ، أدت إلى تطوير أساليب حفظ جديدة من شأنها أن تضمن الأمن دون التأثير على نوعية الطعام .

في هذا السياق كان البحث عن جزيئات جديدة نشطة ذا أهمية كبيرة خصوصا الزيوت الأساسية المستخرجة من النباتات العطرية والطبية التي تعتبر مصادر غنية بجزيئات نشطة بيولوجيا . هذا البحث يهدف الى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا لخمسة زيوت اساسية من شمال المغرب، أيضا تم دراسة آلية النشاط المضاد للبكتيريا و كذلك تطوير تقنيات حفظ مجتمعة للأغذية . أولا تم تحديد التركيب الكيميائي لخمسة زيوت اساسية ثم تقييم النشاط المضاد للأكسدة . أظهرت النتائج أن *Laurus* هو الأكثر فعالية بينما زيوت *Satureja* و *M. COMMUNIS* هي الأقل فعالية .

تقييم النشاط المضاد للبكتيريا أظهر درجات متفاوتة من الحساسية من طرف البكتيريا المدروسة . البكتيريا السالبة الجرام كانت أكثر مقاومة لهذه الزيوت . من ضمن هذه الزيوت، أظهر زيت *Laurus* الفعالية الأكبر في منع نمو البكتيريا . جميع الزيوت الخمسة المدروسة أثبتت قدرتها على تثبيط نمو سلالاتي الفطريات المدروسة ولكن بدرجات متفاوتة .

من أجل دراسة آلية عمل هذه الزيوت، قمنا بتقييم تأثير ثلاثة زيوت على بقاء الخلية وسلامة الغشاء و سيولته . النتائج المحصل عليها أظهرت أن هذه الزيوت تؤدي إلى خفض نسبة الخلايا الحية، التحليل المجهرى بواسطة epifluorescence أظهر أنها تسبب ضررا على أغشية الخلايا البكتيرية وبالتالي تغيير الغشاء الخارجي للخلية . أبانت الدراسة أيضا أن نسبة من الخلايا البكتيرية في وجود الزيوت تبقى حية و لكنها تفقد القدرة على النمو على أجار . هذه الزيوت تؤثر أيضا على تغيير سيولة الغشاء الخارجي للخلايا البكتيرية .

هذا العمل يتناول أيضا الآثار المحتملة على تثبيط البكتيريا للجمع بين تركيزات منخفضة من الزيوت مع المعالجة الحرارية المعتدلة، علاج ارتفاع الضغط الهيدروليكي أو علاج الحقل الكهربائي وحققت مستويات عالية من تثبيط الخلايا البكتيرية . هذه العلاجات مجتمعة تسمح تركيزات أقل من الزيوت الأساسية مع تقليل كل معالجة وبالتالي يمكن أن تحسن جودة الأطعمة المعالجة . وأخيرا قمنا بإجراء تقييم لفعالية الزيوت في مكافحة بيوفيلم المسبب لتلوث الأسطح في صناعة الأغذية .

كلمات مفتاح: الزيوت الأساسية، المضادة للأكسدة ، المضادة للبكتيريا، آلية عمل، تطوير تقنيات حفظ مجتمعة للأغذية، بيوفيلم.

Sommaire

RÉSUMÉ

ABSTRACT

ملخص

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

1

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

5

1. Les plantes et les substances actives	5
1.1. Historique	5
1.2. Généralités sur les huiles essentielles	5
1.2.1. Définition et méthodes d'extraction	5
1.2.2. Composition chimique.....	6
1.2.2.1. Terpènes et terpénoïdes.....	7
1.2.2.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	8
1.2.3. Activités biologiques et domaines d'application	10
1.3. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles	11
1.3.1. Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne.....	12
1.3.2. Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens naturels.....	13
1.3.3. Activités antifongiques des huiles essentielles	14
1.3.4. Mécanisme d'action des huiles essentielles	17
1.3.5. Application des huiles essentielles dans l'industrie agroalimentaire	19
1.4. Activité antioxydante des huiles essentielles.....	21
1.4.1. Le stress oxydatif.....	21
1.4.1.1. Les radicaux libres	21
1.4.1.2. Les conséquences du stress oxydatif.....	22
1.4.2. Les antioxydants	22
1.4.3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	23
1.4.3. Le potentiel antioxydant des huiles essentielles	24
2. Conservation alimentaire	24
2.1. Stratégies et méthodes générales de conservation des aliments	25
2.1.1. Les traitements thermiques	26
2.2. Nouvelles stratégies de conservation alternatives	27
2.2.1. Méthodes non thermiques de conservation	27
2.2.1.1. Le champ électrique pulsé.....	27
2.2.1.2. Les hautes pressions hydrostatiques	29
2.3. Processus combinés de conservation	31
3. Les biofilms	32
3.1. Définition	32
3.2. Les biofilms dans les divers environnements	32

3.3. Formation d'un biofilm	33
3.4. Contrôle des biofilms	34
3.4.1. Les mesures de contrôle conventionnelles	35
3.4.2. Mesures de contrôle alternatives des biofilms	35
DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES	38
1. Matériel biologique	38
1.1. Matériel végétal	38
1.1.1. Collecte de plantes	38
1.1.2. Extraction des huiles essentielles	40
1.2. Caractéristiques des microorganismes testés	41
1.2.1. Les souches bactériennes	41
1.2.2. Les souches fongiques	41
2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS)	42
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	43
3.1. Activité antimicrobienne	43
3.1.1. Obtention des suspensions bactériennes	43
3.1.2. Technique de diffusion en gélose	43
3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)	44
3.2. Activité antifongique	46
4. Evaluation de l'activité antioxydante	47
4.1. Activité du piégeage du radical DPPH	47
4.2. Test de blanchissement du β -carotène	47
4.3. Pouvoir réducteur	48
5. Etude du mode d'action des huiles essentielles	49
5.1. Etude de la fluidité membranaire des bactéries par spectrofluorimétrie	49
5.1.1. Equipement utilisé	49
5.1.2. Marqueurs utilisés	50
5.1.3. Méthodologie	51
5.2. Etude de la viabilité et de l'état physiologique des bactéries par microscopie à épifluorescence	51
5.2.1. Principe du microscope à épifluorescence	51
5.2.2. Principe du kit Live/Dead®Baclight™	52
5.2.3. Méthodologie	53
6. Evaluation de l'inactivation microbienne à travers les processus de conservation combinés	55
6.1. Obtention des suspensions microbiennes	55
6.2. Evaluation de l'inactivation microbienne en présence de faibles doses d'huiles essentielles	56
6.3. Evaluation de l'inactivation microbienne par le traitement thermique modéré en combinaison avec les huiles essentielles	56

6.4. Evaluation de l'inactivation microbienne par le champ électrique pulsé à haute intensité en combinaison avec les huiles essentielles	56
6.5. Evaluation de l'inactivation microbienne par les hautes pressions hydrostatiques en combinaison avec les huiles essentielles.....	58
6.6. Incubation et dénombrement des cellules survivantes.....	59
6.7. Evaluation de la présence de dommages sublétaux	60
7. Etude de l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i>.....	60
7.1. Préparation des supports solides et protocole de nettoyage.....	60
7.2. Adhésion et formation de biofilms	61
7.3. Traitement des cellules adhérentes avec l'huile essentielle de <i>L. nobilis</i>	62
7.4. Dénombrement des cellules bactériennes adhérentes	62
TROISIEME PARTIE: RESULTATS	65

Chapitre 1: Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles.

1. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	65
2. Activité antioxydante des huiles essentielles	68
2.1. Piégeage du radical DPPH.....	69
2.2. Inhibition de l'oxydation du β -carotène	70
2.3. Pouvoir réducteur	71
2.4. Efficacité antioxydante des huiles essentielles	72
3. Conclusion.....	73

Chapitre 2: Activité antimicrobienne des huiles essentielles.

1. Evaluation de l'activité antibactérienne	74
1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en agar	74
1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles étudiées	76
2. Activité antifongique des huiles essentielles	80
3. Conclusion.....	83

Chapitre 3: Impact des huiles essentielles sur la viabilité cellulaire, l'intégrité et la fluidité membranaire des bactéries.

1. Evaluation de la viabilité cellulaire et de l'intégrité membranaire des microorganismes	83
2. Impact des huiles essentielles sur la fluidité membranaire.....	91
3. Conclusion.....	93

Chapitre 4: Inactivation microbienne par les processus de conservation combinés aux huiles essentielles.

1. Evaluation de l'inactivation microbienne par application des barrières séparément.....	94
1.1. Inactivation microbienne en présence de faibles doses d'huiles essentielles	94
1.2. Inactivation microbienne par un traitement thermique modéré	97
1.3. Inactivation microbienne par un traitement au champ électrique pulsé.....	97
1.4. Inactivation microbienne par un traitement de haute pression hydrostatique	100
2. Evaluation de l'inactivation microbienne par les processus de préservation combinés avec les huiles essentielles.....	100
2.1. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement thermique modéré.....	100
2.2. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement au champ électrique pulsé	103
2.3. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement aux hautes pressions hydrostatiques.....	106
3. Conclusion.....	110

Chapitre 5: Etude de l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.

1. Développement et désinfection d'un biofilm en phase d'adhésion.....	111
2. Développement et désinfection d'un biofilm mature de 48h	112
3. Conclusion.....	113

QUATRIEME PARTIE: DISCUSSION **115**

1. Caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles	115
2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles	118
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	121
4. Evaluation de l'activité antifongique	124
5. Mode d'action antibactérienne des huiles essentielles de <i>L. nobilis</i>, <i>M. pulegium</i> et <i>S. calamintha</i>.....	125
6. Evaluation de l'efficacité létale de processus combinés de traitement thermique, du champ électrique pulsé ou les hautes pressions hydrostatiques avec les huiles essentielles	129
7. Effet anti-biofilm de l'huile essentielle de <i>Laurus nobilis</i>	134
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	140
ANNEXES.....	167

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique
ATP: Adénosine Triphosphate
BHA: hydroxyanisole butylé
BHI: Bouillon Cœur Cerveille
BHT: Hydroxytoluène butylé
CECT: Collection Espagnole de Culture Type
CMB: Concentration minimale bactéricide
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse
DMSO: dimethylsulfoxyde
DO: Densité Optique
DPH: 1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène
DPPH: 1,6-DiPhényl-1,3,5- picrylhydrazyl
EPS: ExoPolySaccharide
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
FDA: Food and Drug Administration
GRAS: Generally Recognized As Safe
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HPH: Hautes Pressions Hydrostatiques
IP: Iodure de Propidium
MHA: Muller Hinton Agar
MHB: Muller Hinton Broth
MRD: diluant de récupération maximale
PAMs: Plantes Aromatiques et Médicinales
PDA: Potato Dextrose Agar
SM: Spectrométrie de Masse
TBHQ: butyle hydroquinone tertiaire
TMA-DPH: 1-[4-(TriMéthyl-Amino)-phényl]-6-PhénylHexa-1,3,5-triène
TSA: Tryptone Soy Agar
TSB: Bouillon Tryptone Soja
UFC: Unité Formant Colonie
VNC: Viable mais Non Cultivable
YE: Yeast Extract

Liste des Figures

- Figure 1.** Structures chimiques de certains composants des huiles essentielles.
- Figure 2.** Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs composants dans la cellule bactérienne.
- Figure 3.** Schéma de base d'un système de génération du champ électrique pulsé.
- Figure 4.** Mécanisme d'inactivation par les pulses électriques de haute intensité. "E": Champ électrique. "Ec": Champ électrique critique.
- Figure 5.** Processus de développement d'un biofilm (1) Attachement réversible, (2) Attachement irréversible, (3) Maturation (4) Maturation et (5) dispersion.
- Figure 6.** Représentation photographique des plantes aromatiques et médicinales étudiées.
- Figure 7.** Photo de l'appareil d'entraînement à la vapeur.
- Figure 8.** Illustration de la méthode de diffusion en agar.
- Figure 9.** Réduction du résazurine en résorufine par les enzymes oxydoréductases des cellules viables.
- Figure 10.** Exemple d'une plaque de micro-titration pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles par la méthode de microdilution.
- Figure 11.** Positionnement des sondes DPH et TMA-DPH dans la bicouche phospholipidique.
- Figure 12.** Mode de fonctionnement des 2 fluorochromes du kit Live/Dead[®] BacLight[™].
- Figure 13.** Protocole de coloration des cellules pour l'étude de leur viabilité après contact avec les huiles essentielles en milieu liquide (utilisation du kit Live/Dead[®] BacLight[™], Invitrogen, France).
- Figure 14.** Procédure de mise en culture des souches.
- Figure 15.** Equipement du champ électrique pulsé utilisé dans cette investigation.
- Figure 16.** Photo représentatif d'une chambre de traitement.
- Figure 17.** Equipement des hautes pressions hydrostatiques.
- Figure 18.** Support solide d'acier inoxydable.
- Figure 19.** Appareil à ultrasons.
- Figure 20.** Activité du piégeage du radical libre DPPH des huiles essentielles de *M. communis*, *S. calamintha*, *M. pulegium*, *L. stoechas* et *L. nobilis* comparée à celle du BHT à des concentrations allant de 1,25 à 10 µl/ml. (n=3).

- Figure 21.** Activité antioxydante des huiles essentielles de *M. communis*, *S. calamintha*, *M. pulegium*, *L. stoechas* et *L. nobilis* déterminée par la méthode de blanchissement du β -carotène comparée à celle du BHT à des concentrations allant de 1,25 à 10 μ l/ml. (n=3).
- Figure 22.** Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *M. communis*, *S. calamintha*, *M. pulegium*, *L. stoechas* et *L. nobilis* comparée à celui du BHT à des concentrations allant de 1,25 à 10 μ l/ml. (n=3).
- Figure 23.** Clichés d'observations au microscope à épifluorescence de *L. innocua* LRGIA01 en contact avec 2 concentrations de l'huile essentielle de *L. nobilis* (CMI et $\frac{1}{2}$ CMI) immédiatement après contact 0h (A), après 6h (B) et 24h (C) et un contrôle sans huile essentielle (les bactéries étant colorées avec le kit Live/Dead® BacLight™ avant toute observation au microscope à épifluorescence). Grossissement X 100.
- Figure 24.** Evolution de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 en présence des huiles essentielles suivantes à deux concentrations la CMI et la $\frac{1}{2}$ CMI: (A) *L. nobilis*, (B) *S. calamintha* Scheele et (C) *M. pulegium* (C= 28 μ L/mL, $\frac{1}{2}$ C=14 μ L/mL), comparée aux cellules non traitées (témoin) en comptant les bactéries viables (●) et les bactéries cultivables (□).
- Figure 25.** Evolution de la croissance d'*E. coli* CECT 471 en présence des huiles essentielles suivantes à deux concentrations la CMI et la $\frac{1}{2}$ CMI: (A) *L. nobilis*, (B) *S. calamintha* Scheele et (C) *M. pulegium*, comparée aux cellules non traitées (témoin) en comptant les bactéries viables (●) et les bactéries cultivables (□).
- Figure 26.** Pourcentage des cellules endommagées d'*E. coli* CECT 471 (A) et de *L. innocua* LRGIA 01(B) après 24 h d'incubation avec les huiles essentielles (*L. nobilis*, *M. pulegium* et *S. calamintha* Scheele) à deux concentrations (CMI et $\frac{1}{2}$ CMI et 28 μ L/mL et 14 μ L/mL pour *M. pulegium* dans le cas de *L. innocua*) comparé aux cellules non traitées en utilisant le kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen).
- Figure 27.** Variation (Δr) de l'anisotropie de fluorescence des sondes TMA-DPH et DPH dans les cellules d'*E. coli* CECT 471 (A) et *L. innocua* LRGIA01 (B) traitées par les huiles essentielles suivantes: *L. nobilis*, *S. calamintha* Scheele et *M. pulegium* à deux concentrations (CMI et $\frac{1}{2}$ CMI, 28 μ L/mL et 14 μ L/mL pour *M. pulegium* dans le cas de *L. innocua*), observés après 280 min de contact. (n=2).
- Figure 28.** Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement de 10 min et de 24 h à température ambiante dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B) en présence de 0,2 μ l/ml des huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*.

- Figure 29.** Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement de 10 min et de 24 h à température ambiante dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B) en présence de 0,2 µl/ml des huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*.
- Figure 30.** Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement thermique modéré (54°C, 10 min), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieux sélectifs: TSA à 3% Nacl et TSA à 0,35% en Sels Biliaires.
- Figure 31.** Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement thermique modéré (54°C, 10 min), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieu sélectif TSA à 6% Nacl.
- Figure 32.** Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement au champ électrique pulsé (25 pulses, 30Kv/cm), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieux sélectifs: TSA à 3% Nacl et TSA à 0,35% en Sels Biliaires.
- Figure 33.** Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement au champ électrique pulsé (25 pulses, 30kV/cm), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieu sélectif TSA à 6% Nacl.
- Figure 34.** Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement aux hautes pressions hydrostatiques (400MPa, 20 min), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieux sélectifs : TSA à 3% Nacl et TSA à 0,35% en Sels Biliaires.
- Figure 35.** Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement aux hautes pressions hydrostatiques, dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) (175MPa, 20 min) et pH 7,0 (B) (325 MPa, 20 min). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE et en milieu sélectif TSA à 6% Nacl.
- Figure 36.** Inactivation d'*E. coli* O157:H7 (A) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) par un traitement thermique modéré (54°C, 10 min) (C) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*.

Figure 37. Inactivation d'*E. coli* O157:H7 (A) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) par un traitement au champ électrique pulsé (25 impulsions, 30Kv/cm) (C) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*.

Figure 38. Inactivation d'*E. coli* O157:H7 (A) (400 MPa, 20 min) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) (175MPa, 20 min à pH 4,0; 325 MPa, 20 min à pH 7,0) par un traitement aux hautes pressions hydrostatiques (C) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*.

Figure 39. Nombre de cycles cellulaires de *L. innocua* LRGIA 01 adhérees aux coupons d'acier inoxydables AISI 304 obtenues d'une phase d'adhésion de 6 h après traitement avec une solution désinfectante à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* testée à la concentration CMI (8 µl/ml) comparés à un biofilm témoin et un biofilm sans traitement à deux temps de contact 10 min et 30 min.

Figure 40. Nombre de cycles cellulaires de *L. innocua* LRGIA 01 adhérees aux coupons d'acier inoxydables AISI 304 obtenues d'une phase de formation de biofilm de 48 h après traitement avec une solution désinfectante à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* testée à la concentration CMI (8 µl/ml) comparés à un biofilm témoin et un biofilm sans traitement à deux temps de contact 10 min et 30 min.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Exemples des huiles essentielles testées *in vitro* pour leur activité antibactérienne.

Tableau 2. Aperçu sur certaines études testant les effets antibactériens des huiles essentielles dans des matrices alimentaires.

Tableau 3. Méthodes traditionnelles de conservation des aliments.

Tableau 4. Rendement en huiles essentielles des différentes plantes aromatiques et médicinales sélectionnées.

Tableau 5. Caractéristiques et origine des souches bactériennes.

Tableau 6. Les conditions d'application du traitement des hautes pressions hydrostatiques.

Tableau 7. Composition chimique (en %) des différents composés identifiés dans les cinq huiles essentielles étudiées.

Tableau 8. Composition chimique des huiles essentielles selon leurs groupes fonctionnelles.

Tableau 9. Efficacité antioxydante des huiles essentielles étudiées.

Tableau 10. Diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre du disque 6 mm) des cinq huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes Gram positives.

Tableau 11. Diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre du disque 6 mm) des cinq huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes Gram négatives.

Tableau 12. Activité antibactérienne des cinq huiles essentielles contre des bactéries Gram positives par détermination des valeurs de concentration minimal inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) ($\mu\text{l/ml}$).

Tableau 13. Activité antibactérienne des cinq huiles essentielles contre des bactéries Gram négatives par détermination des valeurs de concentration minimal inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) ($\mu\text{l/ml}$).

Tableau 14. Inhibition de la croissance mycélienne par les cinq huiles essentielles.

Introduction Générale

La plupart des produits alimentaires sont de nature périssables et requièrent une protection contre l'oxydation lipidique et la détérioration antimicrobienne durant la préparation, le stockage et la distribution afin de prolonger leur durée de vie. Cette détérioration surtout par les microorganismes pathogènes ou d'altération est devenue une préoccupation prioritaire pour la santé public (Sandri et *al.*, 2007). Dans ce contexte, l'identification de mesures et techniques de préservation appropriées pour le contrôle des microorganismes et le maintien de la sécurité et la qualité des produits alimentaires est essentielle et peut être considérée comme un défi majeur des industries agroalimentaires. De même, en réponse aux nouvelles tendances des consommateurs qui demandent des produits de haute qualité, sans conservateurs synthétiques et modérément traités, il y a un grand intérêt à développer des approches de conservation plus innovantes et naturelles (Rajkovic et *al.*, 2010; Hyldgaard et *al.*, 2012).

De nombreuses technologies et méthodes alternatives ont été développées ou sont en cours de recherche pour remplacer les conservateurs synthétiques et les traitements thermiques intenses les plus couramment utilisés mais qui peuvent causer des changements dans les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Pfulg and Gould, 2000).

L'oxydation des aliments en particulier la peroxydation lipidique est un processus complexe qui reflète l'interaction entre les oxygènes moléculaires et les acides gras polyinsaturés (Yadegarinia et *al.*, 2006). C'est un mécanisme qui entraîne la détérioration des aliments mais aussi de graves problèmes de santé par le biais des radicaux libres. Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés mais peuvent présenter des effets secondaires toxiques (Cornwell et *al.*, 1998). D'où l'intérêt croissant de l'utilisation de molécules naturelles en tant qu'antioxydants.

En conséquence, la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle reçoit une grande attention (Tajkarimi et *al.*, 2010). Les extraits des plantes aromatiques et médicinales ont été largement utilisés à des fins thérapeutiques, dans la parfumerie, la cosmétique ou comme agents aromatisants (Hyldgaard et *al.*, 2012). Dans divers pays, les plantes aromatiques et médicinales continuent de représenter une part importante des moyens thérapeutiques utilisés dans la médecine traditionnelle. En particulier les huiles essentielles qui ont fait l'objet de nombreuses études. Du fait de leur multifonctionnalité et la diversification de la nature chimique de leurs constituants, elles trouvent de grandes perspectives d'application dans divers domaines. Les huiles essentielles sont connues par leurs propriétés pharmacologiques diverses (Lang and Buchbauer, 2011). Plusieurs études

ont confirmé leurs activités anticancéreuses, antivirales, anti-acariens, antioxydants, antifongiques et antimicrobiens sur un large spectre de microorganismes (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Lang and Buchbauer, 2011).

De nombreuses huiles essentielles ou de leurs composants font partie de la liste des ingrédients GRAS (Generally Recognized As Safe) de la Food and Drug Administration (FDA). D'où l'intérêt de leur application comme bio-conservateurs d'origine naturelle dans l'industrie agroalimentaire. Toutefois, leur utilisation dans les aliments reste limitée en raison des concentrations élevées nécessaires pour atteindre le niveau d'inactivation requis ce qui peut avoir une incidence sur les propriétés organoleptiques des aliments (Tajkarimi *et al.*, 2010).

L'une des solutions proposées pour éviter ce problème est le développement de processus combinés (appelés aussi Hurdle technology ou technologies de barrières) des huiles essentielles conjointement avec des méthodes de préservation traditionnelles telle que les traitements thermiques modérés ou des alternatives émergentes telle que le champ électrique pulsé ou les hautes pressions hydrostatiques (Burt, 2004; Espina *et al.*, 2011; Ait-Ouazzou *et al.*, 2012). Le but de ces procédés combinés serait de mettre en place une série de barrières que les microorganismes ne seraient pas en mesure de surmonter, atteignant ainsi le niveau souhaité d'inactivation tout en réduisant l'intensité de chaque procédé.

La flore marocaine est extrêmement riche et variée en plantes aromatiques et médicinales qui poussent spontanément et dont un grand nombre est endémique. L'étude de propriétés biologiques potentielles des huiles essentielles extraites de ces plantes va favoriser la valorisation de cette richesse.

Le premier objectif de ce travail est d'une part contribuer à la connaissance de 5 huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales d'origine méditerranéenne (*Laurus nobilis*, *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis* et *Satureja calamintha* Scheele) par l'analyse de leurs compositions chimiques et l'évaluation de leurs propriétés antibiologiques et antioxydantes. Il s'agit de déterminer l'effet bactériostatique et bactéricide *in vitro* des huiles essentielles contre des souches pathogènes et d'altération ainsi que tester l'aptitude de ces huiles essentielles à inhiber l'oxydation par utilisation de différents tests.

D'autre part, cette étude vise aussi de comprendre le mode d'action antibactérien de certaines de ces huiles essentielles. Il s'agit de mettre en évidence leurs effets sur la viabilité cellulaire, l'intégrité membranaire ainsi que la fluidité membranaire d'*Escherichia coli* CECT 471 et *Listeria innocua* LRGIA 01.

Le second objectif est le développement de processus de conservation plus efficaces par l'action combinée des huiles essentielles et d'autres technologies traditionnelles comme les traitements thermiques ou émergentes comme les hautes pressions hydrostatiques et le champ électrique pulsé sur l'inactivation d'*Escherichia coli* O157:H7 et *Listeria monocytogenes* EGD-e. Et finalement, on a aussi visé de développer une étude préliminaire pour tester l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* contre un biofilm de *Listeria innocua* LRGIA 01 formé sur des aciers inoxydables.

Revue bibliographique

1. Les plantes et les substances actives

1.1 Historique

Depuis l'antiquité, l'homme a utilisé diverses plantes et épices pour le traitement de maladies infectieuses communes ainsi que pour leur parfum et saveur (Bauer et *al.*, 2001; Ríos and Recio, 2005; Zsuzsanna et *al.*, 2010). En effet, tous au long des siècles, les plantes médicinales et aromatiques ont toujours fourni une source stable de médicaments pour les populations. Elles ont été utilisées par les premiers Egyptiens et pour des siècles par les pays asiatiques et plusieurs civilisation telle que les cultures indigènes, dans les pays arabes, la civilisation grecque ou chinoise ... (Cowan, 1999; Mohammedi, 2006). La production des huiles essentielles remonte à plus de 2000 ans en Extrême-Orient, et a été développée premièrement en moyen âge par les arabes (Bakkali et *al.*, 2008; Tajkarimi et *al.*, 2010), alors que les premiers essais pour la caractérisation des propriétés de ces plantes dans le laboratoire remontent au début des années 1900 (Dorman and Deans, 2000). Dans les dernières décennies, il y' a eu une émergence dans l'étude et l'application des plantes aromatiques et médicinales ainsi que de leurs composés dérivés, dans la médecine, dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La recherche de nouveaux antimicrobiens à partir de plantes et d'épices occupe plusieurs groupes de recherche (Ríos and Recio, 2005). Il existe une vaste biodiversité de plantes dans le monde et seule une minorité d'entre elles est explorée, ce qui explique l'intérêt pour l'exploitation de cette ressource naturelle qui représente un vaste réservoir de substances actives.

1.2. Généralités sur les huiles essentielles

1.2.1. Définition et méthodes d'extraction

Les huiles essentielles sont des composés naturels complexes de structures organiques variées, liquides, volatiles, limpides et odorantes, synthétisées par des plantes aromatiques et médicinales comme métabolites secondaires (Bakkali et *al.*, 2008). Elles sont insolubles dans l'eau et solubles dans l'alcool et les solvants organiques. Elles ne contiennent pas de corps gras, leur appellation «huile» vient de leur caractéristique hydrophobe et le terme «essentielle» de leur caractéristique d'odorat (Bouhdid, 2009). Les huiles essentielles sont très sensibles aux variations de température, à la lumière et à l'oxygène.

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les phytopathologies d'origine antibactérienne, antivirale ou antifongiques mais aussi contre les insectes ravageurs et contre les herbivores; elles jouent aussi un rôle dans l'attraction des insectes avantageux pour favoriser la dispersion de pollens et de graines (Bakkali *et al.*, 2008). Les huiles essentielles exercent aussi un effet allélopathique en inhibant la germination et le développement d'autres espèces dans leur voisinage (De feo *et al.*, 2002). Elles peuvent être synthétisées par tous les organes ou structures sécrétrices des plantes à savoir les fleurs, les feuilles, les tiges, les graines, les fruits, les racines, du bois ou l'écorce et sont stockées dans des cellules sécrétoires, des cavités sécrétrices, des canaux sécréteurs ou trichomes glandulaires et qui sont souvent localisés sur ou à proximité de la surface de la plante (Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008; Solórzano-Santos and Miranda-Navales, 2012).

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des huiles essentielles. Elles incluent l'utilisation de méthodes nouvelles telles que l'extraction par le Dioxyde de Carbone liquide ou l'extraction assistée par ultrasons ou microondes (Kimbaris *et al.*, 2006) et des méthodes plus générales à savoir l'entraînement par la vapeur, l'hydro-distillation, par expression à froid pour les Citrus ou effleurage pour les fleurs. L'hydro-distillation et l'entraînement par la vapeur sont les plus utilisés au niveau laboratoire et commercial puisqu'ils ne requièrent pas de technologie sophistiquée et un bon rendement est obtenu (Burt, 2004; Kulisic *et al.*, 2004).

1.2.2. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels de structures complexes qui peuvent contenir de multiples composants à différentes concentrations. La composition chimique et le rendement en huile essentielle d'une plante peut être influencé par plusieurs facteurs à savoir la saison de récolte, la zone géographique d'origine, la partie de la plante utilisée, le stade de développement de la plante, les conditions environnementales (climat, nature du sol, pollution), séchage et stockage de la plante ainsi que la méthode d'extraction (Faleiro *et al.*, 2002; Hyldgaard *et al.*, 2012). A l'intérieur d'une même espèce végétale, on peut observer des variations chimiques qualitatives et quantitatives, ce qui conduit à l'existence de chimiotype, par exemple un thymus à thymol (Amarti *et al.*, 2010), à carvacrol (Nejad *et al.*, 2008; Ghasemi *et al.*, 2011) ou à bornéol (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011a). Cette variation du profil chimique pourra entraîner la variation de ses propriétés

biologiques. La technique la plus couramment utilisée pour la détermination de la composition des huiles essentielles est le couplage d'une technique de Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM). La CPG permet la séparation de composés volatils de mélanges complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit, cependant les informations obtenues ne sont pas suffisantes pour une caractérisation totale des composants d'une huile essentielle, mais on peut faire une approximation en comparant le temps de rétention du composé avec des substances de référence. La SM permet l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans des bibliothèques de spectres. L'utilisation de la CPG couplé à la SM permet de combiner les qualités de séparation de la première avec les propriétés analytiques de la seconde et permet une identification rapide des constituants des huiles essentielles (Yadegarinia et *al.*, 2006).

Les huiles essentielles sont caractérisées par des composants majeurs à hautes concentration avec d'autres composants présents en traces ou en moindre pourcentage. Les huiles essentielles sont composées de deux groupes principaux d'origine biosynthétique distincte, de poids moléculaire bas à savoir les terpènes et l'autre groupe est composé de constituants aromatiques et aliphatiques dérivés du phénylpropane et des composés spécifiques contenant du soufre ou de l'azote (Bakkali et *al.*, 2008).

1.2.2.1 Terpènes et terpénoïdes

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont fait de la combinaison de plusieurs unités de 5 carbones-bases appelés isoprène (C₅H₈) et peuvent être à chaîne ouverte ou cyclique (Bakkali et *al.*, 2008; Hyldgaard et *al.*, 2012). Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C₁₀) et les sesquiterpènes (C₁₅), mais on trouve aussi des hemiterpènes (C₅), diterpènes (C₂₀), des triterpènes (C₃₀) et des tétraterpènes (C₄₀). La synthèse se fait via la voie de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA (Hyldgaard et *al.*, 2012). Un terpène contenant un oxygène est appelé terpénoïdes (Cowan, 1999). Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les molécules les plus représentatifs dans le règne végétal.

On peut distinguer:

- Les monoterpènes hydrocarbonés: Tels que pinène, 3-carene, myrcène, sabinène etc.

- Les monoterpènes oxygénés ou monoterpénoïdes :

Alcools : géraniol, linalol, menthol, bornéol etc.

Aldéhydes : néral, géraniol etc.

Esters : Acétate de linalyl, acétate de myrthenyl, acétate de géranyl etc.

Ethers : 1,8 cineole (eucalyptol) etc.

Phénols : thymol, carvacrole etc.

Cétones : pulegone, menthone, camphre, carvone etc.

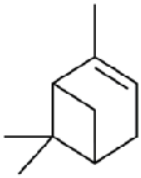
- Les sesquiterpènes hydrocarbonés : Tels qu'azulène, elemène, β -caryophyllène etc
- Les sesquiterpènes oxygénés ou sesquiterpénoïdes : Tels que cedrole, cadinène, germacrone, caryophyllène oxyde etc.

1.2.2.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Ils dérivent du phénylpropane et sont moins fréquents que les terpènes (Bakkali et *al.*, 2008). Ils sont caractérisés par un noyau aromatique lié à une chaîne de trois atomes de carbone propène (Hylgaard et *al.*, 2012). Cependant, ces composés sont importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces; le cinnamaldéhyde est le composant majoritaire de l'huile essentielle du *Cinnamomum verum* (cannelle) et l'anéthole composant majoritaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* (anis) (Rodrigues et *al.*, 2003) et ceux qui ont été le mieux étudiés sont l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline, le safrole et le cinnamaldéhyde. Certaines huiles essentielles peuvent contenir des composés spécifiques contenant du soufre ou du nitrogène tel que l'allicin et allyl-isothiocyanate (Svoboda and Hampson, 1999).

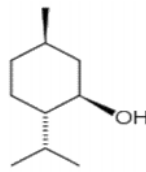
Monoterpènes

Monoterpènes Hydrocarbonés



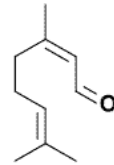
α -pinène

Alcools



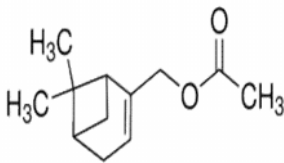
Menthol

Aldéhyde



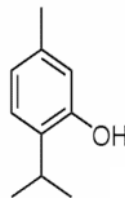
Néral (Citral B)

Esters



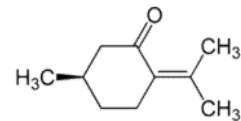
Acétate de myrtényl

Phénols



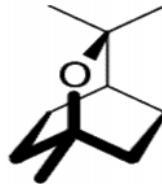
Thymol

Cétones



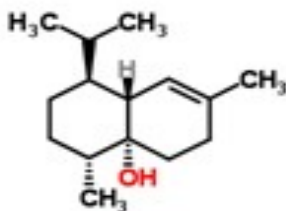
Pulégone

Ethers

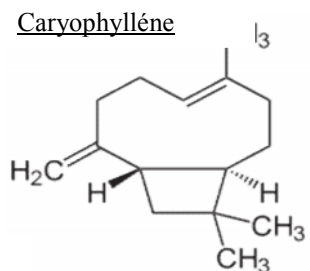


1,8 cinéol (Eucalyptol)

Sesquiterpènes

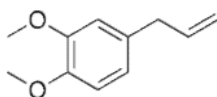


Cubénol

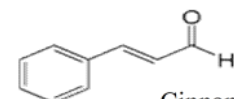


Caryophyllène

Dérivés du phénylpropane



Méthyl eugéno



Cinnamaldéhyde

Figure 1. Structures chimiques de certains composants des huiles essentielles.

1.2.3. Activités biologiques et domaines d'application

Diverses industries (agroalimentaire, pharmaceutique, parfumerie, aromathérapie etc..) sont maintenant à la recherche de sources bioactives alternatives, plus naturelles et plus écologiques (Svoboda and Hampson, 1999). La possibilité d'utiliser les huiles essentielles est d'une grande importance pour les chercheurs et gagne beaucoup d'intérêts de la part des scientifiques ainsi que du public vue leur diversité structurale de composants, ce qui leur confère de diverses propriétés et activités biologiques. Certaines huiles essentielles ou leurs composants actifs ont trouvé des applications variées dans de nombreux secteurs tels que la cosmétique, la parfumerie, l'aromathérapie, l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire comme additives ou arômes ainsi que l'industrie hygiénique ou sanitaire (Ijaz, 2009).

En effet, les huiles essentielles présentent de remarquables propriétés antioxydantes (Simić et al., 2003; Gholivand et al., 2010; Ozen et al., 2011), antimicrobiennes (Daljit and Kaur, 1999; Chéraif et al., 2007; Gulluce et al., 2007) et antifongiques (Vivek et al., 2007; Souza et al., 2007; De Corato et al., 2010). Cependant, elles dévoilent aussi d'autres activités intéressantes et diversifiées. En effet, beaucoup de travaux ont décrits les effets antiviraux des huiles essentielles. Schnitzler et al., (2001) ont examiné *in vitro* l'activité antivirale de l'eucalyptus contre le virus herpès simplex sur des cellules RC-37 avec une valeur de l'IC₅₀ de l'ordre de 0,009%. Ces auteurs ont aussi testé l'action antivirale du thym, gingembre, l'hysope et le bois de sandale sur le virus HSV-1 (Schnitzler et al., 2007). Les effets anti-cancérogènes des huiles essentielles ont été aussi démontrés par plusieurs études. Il a été montré que l'effet thérapeutique des huiles essentielles inclu des activités chimio-préventives et chimio-thérapeutiques (Wei and Shibamoto, 2010). L'activité anti-cancérogène de l'huile de *Santalum album* a été démontrée sur des tissus hépatiques de la souris (Banerjee et al., 1993) et des papillomes cutanés (Dwivedi and AbuGhazaleh, 1997). Wei and Shibamoto (2010) ont aussi discuté les activités anti-inflammatoires des huiles essentielles mentionnant que l'une des plantes les plus remarquables pour ses activités anti-inflammatoires est l'aloë vera (*Barbadensis miller*). Également, les huiles essentielles ou leurs composants actifs peuvent être utilisés comme une alternative ou complément aux thérapies anti-parasitiques actuelles. Il a été démontré que l'huile essentielle de l'ail possède un large spectre d'activité contre les Trypanosoma, Plasmodium et Leishmania (Anthony et al., 2005). D'autres effets remarquables des huiles essentielles ont été étudiés. Erler et al., (2006) ont montré que les huiles d'eucalyptus,

basilic et l'anise présentent une activité répulsive importante contre les femelles adultes de *Culex pipiens*. Également, les effets herbicides de deux huiles essentielles (*Tanacetum aucheranum* et *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*) sur la germination des graines d'*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* et *Rumex crispus* ont été déterminés et les huiles ont complètement inhibés la germination de ces graines (Salamci et al., 2007).

Ces propriétés remarquables confèrent à ces huiles essentielles un large champs d'application. En étant d'excellents antiseptiques et agents antimicrobiens ; cette qualité permet leur usage dans la purification et l'assainissement de l'air. Pibiri (2005) a montré que les huiles essentielles (Thym, Cannelle, Origan et Sarriette des montagnes) testées à l'état gazeux ont contribué à l'assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation. Le pouvoir antifongique, insecticide et antiparasitaire d'un grand nombre des huiles essentielles rend avantageux la possibilité de leurs application comme une alternative naturelle dans le stockage de céréales, et contre la détérioration par les moisissures (Belyagoubi, 2005) ; ainsi que comme des biopesticides dans la gestion de la résistance des insectes ravageurs aux pesticides (Wratten et al., 2008). En outre, les effets thérapeutiques des huiles essentielles ouvrent la voie de leur utilisation dans la médecine et l'industrie pharmaceutique dans la prévention ou le traitement de maladies infectieuses, cardio-vasculaires, inflammatoires, neuro-dégénératives, cancéreuses et autres (Edris, 2007). De même, leur pouvoir antimicrobien et antioxydant, rend l'application des huiles essentielles comme agents préservatives dans l'industrie agroalimentaire l'une des alternatives les plus prometteuses.

1.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les plantes aromatiques ainsi que leurs huiles essentielles contiennent un grand nombre de substances actives ayant des propriétés létales ou inhibitrices de l'activité métabolique des bactéries, levures et moisissures. Elles ont été traditionnellement utilisées dans la conservation des aliments pour prolonger la durée de vie utile des aliments et dans la médecine complémentaire (Reichling et al., 2009). Il semble y avoir un renouveau dans l'utilisation des approches traditionnelles notamment les extraits des plantes dans la protection contre les maladies et la détérioration alimentaire (Zsuzsanna et al., 2010). La diversité des constituants des huiles essentielles est considérable et présente une large

gamme de composés. Certains ont une efficacité faible voire inexistante contre les micro-organismes tandis que d'autres sont des antimicrobiens puissants.

1.3.1. Méthodes d'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne

De nombreuses méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles ont été rapportées dans la littérature. La plupart sont basées sur des études *in vitro* utilisant dans la majorité des cas des méthodes de diffusion en agar et des méthodes de dilution en agar ou cultures en milieu liquide ou les deux à des fins comparatives, car la performance antimicrobienne dans les deux systèmes peut varier (Hammer et *al.*, 1999; Holley and Patel, 2005; Bakkali et *al.*, 2008). Cependant, le principal inconvénient de ces études *in vitro* est la difficulté de comparer les résultats les uns aux autres en raison de la grande divergence entre les différentes méthodes de tests adoptées (Friedman et *al.*, 2002; Zsuzsanna et *al.*, 2010; Tajkarimi et *al.*, 2010). Il n'existe pas une méthode standardisée mise au point pour l'évaluation de cette activité. La méthode NCCLS pour les tests de sensibilité antibactérienne principalement destinée aux tests pour les antibiotiques a été modifiée pour tester les huiles essentielles (Hammer et *al.*, 1999; NCCLS, 2000; Ijaz, 2009).

Une multitude de travaux ont quantifié la performance de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur la base de la méthode de diffusion en agar (test de diffusion sur disque ou test de diffusion en puits) qui est utilisée comme une méthode préliminaire de dépistage ou screening (Burt, 2004; Tajkarimi et *al.*, 2010). Une zone d'inhibition se produit autour du disque ou du puits lorsque l'huile essentielle est active contre le microorganisme testé. La sensibilité du micro-organisme vis-à-vis l'huile essentielle est liée à la taille de la zone d'inhibition. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) donne des résultats plus précis, fiables et reproductibles. Il existe plusieurs procédures différentes pour la détermination des valeurs de la CMI et CMB par la méthode de dilution en milieu liquide. Les plus couramment utilisées sont celles de la mesure de la densité optique et du dénombrement des colonies viables (Burt, 2004). Une autre méthode est basée sur l'emploi de la résazurine (indicateur redox) comme indicateur visuel de la CMI (Holley and Patel, 2005; Brandi et *al.*, 2006; Sarker et *al.*, 2007).

Un autre aspect qui varie considérablement dans les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est le type d'agents émulsifiants utilisés pour

dissoudre les huiles essentielles. Diverses substances ont été utilisées, le plus souvent: l'éthanol (Packiyasothy and Kyle, 2002; Rahman and Kang, 2009; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011a; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012a), le Tween 80 (Vagionas et *al.*, 2007; Bendahou et *al.*, 2008; Deba et *al.*, 2008), le dimethylsulphoxide (Oussou et *al.*, 2004; Chéraif et *al.*, 2007; Gulluce et *al.*, 2007; Demirci et *al.*, 2008) et l'agar (Delaquis et *al.*, 2002; Gill et *al.*, 2002). Toutefois, il a été rapporté par des études que des doses élevées en ces substances pourraient diminuer l'effet antibactérien des huiles essentielles (Juven et *al.*, 1994; Burt, 2004).

1.3.2. Les huiles essentielles comme agents antimicrobiens naturels

Au cours des dernières décennies, de nombreuses huiles essentielles ont été testées pour évaluer leur activité antibactérienne (table 1). Plusieurs travaux ont rapporté les effets bactériostatiques et bactéricides des huiles essentielles et de leurs constituants sur une multitude de bactéries (Gram positive et Gram négative) pathogènes ou impliquées dans le processus d'altération alimentaire.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles des espèces de *Thymus* et d'origan a été largement étudiée (Karaman et *al.*, 2001; Baydar et *al.*, 2004; Bendahou et *al.*, 2008; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011a). Dadalioğlu and Evrendilek (2004) ont étudié les effets inhibiteurs des huiles d'*Origanum minutiflorum*, *L. nobilis*, *L. stoechas* subsp. *Stoechas* et de *Foeniculum vulgare* sur des souches pathogènes d'origines alimentaires. Les huiles essentielles testées ont montré des effets inhibiteurs contre *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

En général, les bactéries Gram-négatives sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram-positives. En effet, Nombres de travaux ont rapporté la sensibilité des bactéries Gram-positives (Farag et *al.*, 1989; Mendoza-Yepes et *al.*, 1997; Ouattara et *al.*, 1997; Lambert et *al.*, 2001; Delaquis et *al.*, 2002; Walsh et *al.*, 2003; Holley and Patel, 2005). Cela est du en partie à la plus grande complexité de la double membrane cellulaire des bactéries Gram-négatives, ce qui limite la diffusion des composés hydrophobes au travers la couche lipo-polysaccharide (Vaara, 1992).

De nombreux composants majeurs des huiles essentielles ont été testés individuellement. Ils ont montré d'importantes propriétés antimicrobiennes. Les plus actifs étant les composés phénoliques, bien que certains aldéhydes et composants non phénoliques aussi présentent une activité prometteuse (Hyldgaard et *al.*, 2012). Les

composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol sont susceptibles d'entraîner des dommages structuraux et fonctionnels à la membrane cytoplasmique (Juven et *al.*, 1994; Sikkema et *al.*, 1995; Ultee et *al.*, 2002; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b).

Les huiles essentielles ne sont pas seulement capables d'inhiber la croissance bactérienne, elles ont aussi la capacité d'inhiber la germination de spores comme dans le cas de souches de *Clostridium* (Chaibi et *al.*, 1997; Vijay et *al.*, 2006; Vijay and Friedman, 2007) et de *Bacillus cereus* (Chaibi et *al.*, 1997). Certaines huiles essentielles sont aussi capables d'altérer la pathogénicité des bactéries spécialement la capacité de certaines souches à provoquer des pathologies par production d'une gamme de protéines extracellulaires tel que les toxines et les entéro-toxines. Smith-Palmer et *al.*, (2004) ont montré la capacité de certaines huiles essentielles (clou de girofle, cannelle, noix de muscade et thym) à influencer la production d'entéro-toxines A, B et α -toxine par *S. aureus*. Une autre étude des mêmes auteurs (Smith-Palmer et *al.*, 2002) a montré que cinq huiles (laurier, clou de girofle, cannelle, muscade et thym) réduisent significativement la production de la listériolysine O par la souche *L. monocytogenes*.

1.3.3. *Activité antifongique des huiles essentielles*

Diverses études se sont intéressées à la recherche d'huiles essentielles dotées de propriétés antifongiques. Ainsi, il existe des huiles actives sur nombreux champignons et levures. La viabilité des isolats de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Pichia minuscula*, *Pichia ohmeri*, *Rhodotorula rubra* et *Saccharomyces cerevisiae* a été efficacement inhibée par l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* (Souza et *al.*, 2007). Les huiles essentielles d'*Origanum gratissimum*, *Thymus vulgaris* et *Cymbopogon citratus* étaient efficaces et ont empêché la germination des conidies et la croissance de l'ensemble de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (Nguefack et *al.*, 2004b). La croissance de *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. et *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* a été complètement inhibée par de faibles concentrations en huile essentielle d'origan, de thym et de marjolaine (Daferera et *al.*, 2003). Par ailleurs, Park et *al.*, (2009) ont montré que des constituants des huiles essentielles à savoir le citral, eugenol, nerolidol et α -terpineol ont fortement inhibé la croissance des hyphes de *Trichophyton mentagrophytes*. Diverses autres huiles essentielles possèdent une activité antifongique *in vitro* contre des champignons provoquant de graves détérioration

alimentaire (Chebli et *al.*, 2003; Kumar et *al.*, 2008; Nguefack et *al.*, 2009; De Corato et *al.*, 2010).

Tableau 1. Exemples d'huiles essentielles testées *in vitro* pour leur activité antibactérienne.

Huiles essentielles	Microorganismes	Concentrations et méthodes	Références
<i>Origanum minutiflorum</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Lavandula stoechas L.</i> , <i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	5, 10, 20, 30, 40, 50 et 80 µl/ml: comptage des cellules survivantes sur gélose. Activité antibactérienne forte.	Dadalioglu and Evrendilek, (2004).
<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Ocimum gratissimum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> <i>Zingiber officinale</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Méthode de diffusion en agar par puits. L'huile de <i>Thymus</i> a montré la plus forte activité suivie de celui d' <i>Ocimum gratissimum</i> .	Nguefack et <i>al.</i> , (2004a,b).
<i>Origanum glandulosum Desf.</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Méthode de diffusion en agar par disques. Détermination des valeurs de CMI : 50-120 µlg/ml.	Bendahou et <i>al.</i> , (2008).
<i>Cupressus arizonica Greene</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Méthode de diffusion en agar par disques. Détermination des valeurs de CMI et CMB : 0,05 à 100 µg/ml. Activité antibactérienne modeste.	Chéraïf et <i>al.</i> , (2007).
<i>Tanacetum aucheranum</i> , <i>Tanacetum chiliophyllum</i> var. <i>chiliophyllum</i>	33 souches bactériennes	Méthode de diffusion en agar par disques. Un large spectre d'activité antibactérienne.	Salamci et <i>al.</i> , (2007).
<i>Allium roseum L.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ,	Méthode de diffusion en agar par disques.	Najjaa et <i>al.</i> , (2007).

Revue bibliographique

	<i>Micrococcus luteus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.</i>	Activité antibactérienne importante.	
<i>Bidens pilosa</i> Linn. var. <i>Radiata</i>	<i>Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Escherichia Coli, Pseudomonas ovalis.</i>	Méthode de diffusion en agar par disques (400 µg/disque). L'activité inhibitrice est significativement plus importante contre les bactéries Gram négatives que les Gram positives.	Deba et al., (2008).
21 huiles essentielles	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus.</i>	Méthode de diffusion en agar par disques. Déterminations des valeurs de CMI: 0,2 à 25,6 mg/ml. L'huile de cannelle, clou de girofle, géranium, citron, lime, orange et le romarin possèdent des effets inhibiteurs importants.	Prabuseenivas an et al., (2006).
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	<i>Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis, Klebsiella sp., Salmonella enteritidis, Shigella flexineri.</i>	Méthode de diffusion en agar (25-50 mg). Détermination des valeurs de CMI et des CMB: 0,75 à 24 µg/mL.	Nakamura et al., (1999).
<i>Thymus algeriensis, Eucalyptus globulus, Rosmarinus officinalis, Mentha pulegium, Juniperus Phoenicia, Cyperus longus.</i>	<i>Salmonella enteritidis, Escherichia coli O157:H7, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium, Listeria monocytogenes 4b, Listeria monocytogenes EGD-e.</i>	Méthode de diffusion en agar: 15 µl/ml. Détermination des valeurs de CMI et des CMB: 0,5 à 30 µl/ml. <i>Thymus algeriensis</i> montre la plus forte activité bactéricide et bactériostatique.	Ait-Ouazzou et al., (2011a). Ait-Ouazzou et al., (2012a).

1.3.4. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Les mécanismes impliqués dans le mode d'action antimicrobien des huiles essentielles ne sont pas encore totalement éclaircis. Leur action peut être inhibitrice ou létale. Elles peuvent affecter plusieurs cibles en même temps et leur mécanisme d'action est probablement n'est pas attribué à un mécanisme spécifique considérant la grande variété des groupes de constituants chimiques présentes dans une huile essentielle et les différents sites dans la cellule ou elles peuvent agir (Burt, 2004; Bakkali et *al.*, 2008).

Plusieurs sites d'action peuvent être ciblés dans la cellule microbienne par les composés actifs (Figure 2) incluant la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, les protéines membranaires et les enzymes métaboliques de la paroi cellulaire, la force motrice des protons, les contenants cellulaires, le système enzymatique ou des processus cellulaires impliqués dans la biosynthèse ou la génération de l'énergie (Burt, 2004; Hyldgaard et *al.*, 2012).

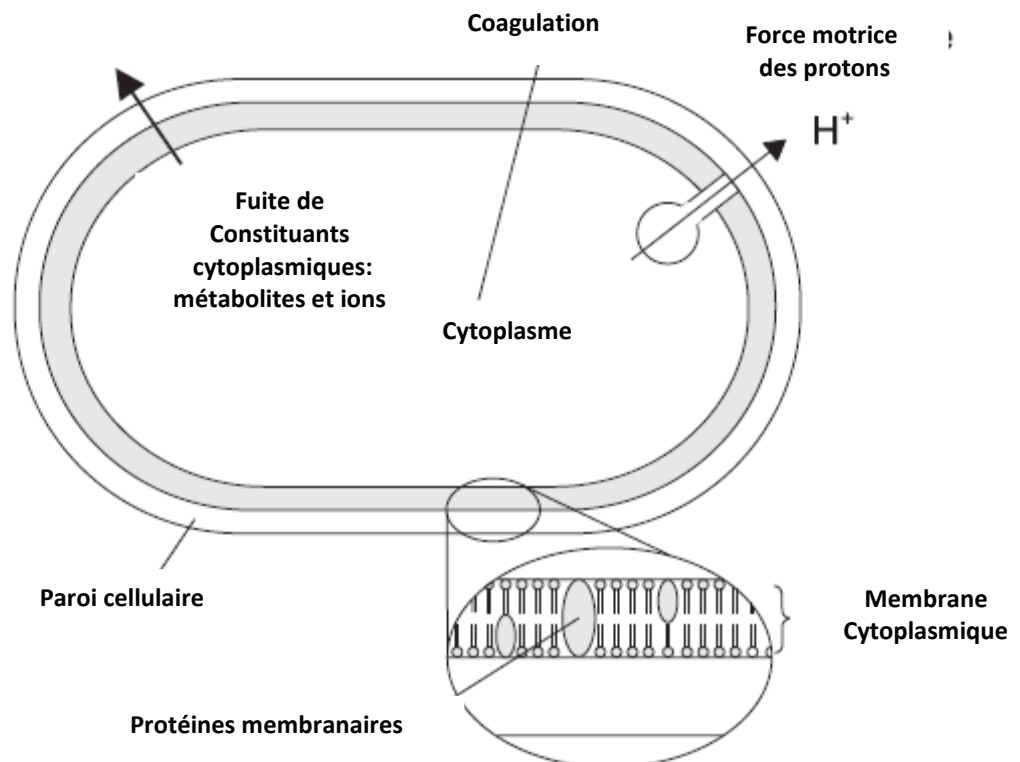


Figure 2. Schéma des principaux sites et mécanismes d'action des huiles essentielles et de leurs composants dans la cellule bactérienne (Burt, 2004).

La membrane cytoplasmique qui constitue le siège de plusieurs fonctions vitales telle que la respiration tous en étant une barrière de perméabilité sélective, s'avère la première cible des huiles essentielles en lui causant des dommages structuraux et fonctionnels. Il est connu que la principale caractéristique des huiles essentielles et de leur composants est leur faible solubilité dans l'eau ainsi que leur haute hydrophobicité (Sikkema et *al.*, 1995; Brul and Coote, 1999; Burt, 2004; Rasooli, 2007; Tajkarimi et *al.*, 2010); cela leur permet de s'unir aux lipides membranaires de la cellule bactérienne perturbant et déstabilisant ainsi sa structure et par conséquent sa fonction et augmentant la fluidité membranaire (Brul and Coote, 1999). Une fuite des ions, des métabolites, des nutriments et d'autres contenus cellulaires vitaux peut mener à la diminution du gradient du pH à travers la membrane plasmique et affectant le potentiel membranaire et la perméabilité à l'ensemble de la cellule et provoquant finalement la mort du microorganisme (Lambert et *al.*, 2001; Skandamis et *al.*, 2001; Castillejos, 2005; Bouhdid, 2009; Hyldgaard et *al.*, 2012). Les huiles essentielles peuvent également agir sur les protéines de la membrane cytoplasmique déformant l'interaction lipide-protéine et affectant l'activité des enzymes telles que l'ATPase, diminuant la production de l'énergie nécessaire à la fonction cellulaire (Lambert et *al.*, 2001 ; Ultee et *al.*, 2002; Burt, 2004).

Conner (1993) a suggéré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est basée sur la détérioration de différents systèmes enzymatiques, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et dans la synthèse des composants structuraux. Une fois le composé antimicrobien traverse la membrane cellulaire, il peut interagir avec les protéines et les enzymes provoquant un flux inverse des protons à travers la membrane et affectant ainsi l'activité des cellules.

Il a été mis en évidence par Gill and Holley (2006) que le carvacrol et l'eugénol à des concentrations bactéricides possèdent contre *E. coli*, *L. monocytogenes* et *Lactobacillus sakei*, une activité inhibant l'ATPase et provoquent la désintégration de la membrane cytoplasmique augmentant ainsi sa perméabilité non spécifique. L'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* a la possibilité de perturber la barrière de perméabilité de la membrane cellulaire accompagnée par une inhibition de la respiration et une fuite des ions potassium dans le cas d'*E. coli* et de *S. aureus* (Cox et *al.*, 2000).

Les huiles essentielles peuvent aussi agir sur les protéines de la membrane cytoplasmique (Burt, 2004) déformant l'interaction lipide-protéine et affectant l'activité des enzymes comme l'ATPase diminuant ainsi l'énergie requise pour le fonctionnement

cellulaire ou bien interagissant directement avec les molécules protéiques ou lipidiques, changeant la structure de la membrane cellulaire et par conséquent changent la fluidité membranaire (Lambert et *al.*, 2001; Ultee et *al.*, 2002; Bouhdid, 2009). Il a été observé que le traitement des cellules d'*E.coli* avec le carvacrol ou le thymol induit une diminution progressive de l'ATP interne et une augmentation de l'ATP externe en 10 min (Ilkka et *al.*, 1998). Des résultats obtenus par Gill and Holley (2006) indiquent que l'eugénol, le carvacrol et le cinnémaldéhyde sont capables d'inhiber l'activité ATPase liée à la membrane d'*E. coli* et de *L. monocytogenes*.

1.3.5. Application des huiles essentielles dans l'industrie agroalimentaire

Les maladies d'origine alimentaire sont un problème de santé publique dans le monde entier. Un contrôle efficace est nécessaire par l'utilisation de plusieurs techniques de conservation durant la fabrication et le stockage des produits alimentaires. Cependant, la perception négative des consommateurs pour les additifs synthétiques a suscité un intérêt croissant pour trouver des alternatives naturelles. Les plantes aromatiques et médicinales ont été traditionnellement utilisées comme arômes ainsi que pour prolonger la vie utile des aliments. Bien qu'elles soient peu utilisées commercialement comme conservateurs alimentaires, un grand nombre d'études ont été effectuées sur les huiles essentielles dans des matrices alimentaires afin qu'elles puissent être appliquées comme alternatives potentielles des conservateurs synthétiques. Divers composants des huiles essentielles sont acceptés par la Commission européenne pour utilisation comme arômes dans les produits alimentaires (par exemple le linalool, thymol, l'eugénol, carvone, le cinnamaldéhyde, vanilline, le carvacrol, le citral et le limonène) et font partie de la liste des ingrédients GRAS (Generally Recognized As Safe) de l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (Food and Drug Administration) (Hyldgaard et *al.*, 2012).

L'effet conservateur de ces huiles ou de leurs composants a été testé sur divers produits alimentaires à savoir, la viande et les produits à base de viande, les poissons, les produits laitiers, légumes et fruits, les jus et sauces etc... Le tableau 2 représente un résumé de certaines des importantes études sur les effets biologiques des huiles essentielles ou de leurs composants dans des matrices alimentaires.

En général, il a été trouvé qu'une concentration plus grande en huile essentielle est nécessaire pour atteindre l'effet équivalent *in vitro* dans les aliments (Smid and Gorris, 1999; Tiwari et *al.*, 2009; Hyldgaard et *al.*, 2012). En effet, la multi-composition et la

Tableau 2. Aperçu sur certaines études testant les effets antibactériens des huiles essentielles dans des matrices alimentaires.

Produits Alimentaires	Huiles essentielles	Microorganismes	Références
Les saucisses	<i>Origanum majorana L.</i> <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Eugenia caryophyllata</i> , <i>Pimenta dioica</i> .	<i>Escherichia coli</i>	Busatta et al., (2008)
Hot-dogs	<i>Rosemarinus officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i>	Singha et al., (2003)
Viande haché de bœuf	Thym, <i>Salvia officinalis</i> , <i>Schinus molle L.</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella anatum</i>	Solomakos et al., (2008); Hayouni et al., (2008)
Poulet	Noix de muscade, origan.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Shekarforoush et al., (2007)
Poisson	Carvacrol, citral, géraniol.	<i>Salmonella typhimurium</i>	Kim et al., (1995)
Sauce de tomate	Thym, la sarriette et le clou de girofle.	<i>Aspergillus flavus</i>	Omidbeygi et al., (2007)
Fromage	Clou de girofle, cannelle et thym.	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Mendoza-Yepes et al., (1997); Smith-Palmer et al., (2001).
Laitue et carottes	L'origan et le thym.	la flore d'altération des végétaux frais	Gutierrez et al., (2009).
Lait et jus de pomme	L'HE de citron.	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Rentsenkhand et al., (2011).
jus de pomme	17 huiles essentielles, trans-cinnamaldehyde.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i>	Friedman et al., (2004); Baskaran et al., (2010)
jus de fruits	<i>Cymbopogon citrates</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salvia officinalis</i> .	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	Hegazy, (2012)
Lait	<i>Metasequoia glyptostroboides</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19116	Jung In Yoon et al., (2010).

structure physique d'un aliment peut limiter l'effet antibactérien des huiles essentielles (Rasooli, 2007). Les propriétés intrinsèques des aliments (protéines, graisses, amidon, teneur en eau, pH, sel et autres additives) mais aussi les déterminants extrinsèques (température, air, gaz, type d'emballage) peuvent influencer la sensibilité bactériale dans les aliments (Tassou *et al.*, 1995; Rasooli, 2007).

Les huiles essentielles et leurs constituants possèdent un arôme intense même à de faibles concentrations ce qui peut influencer les propriétés organoleptiques deS aliments dépassant le seuil acceptable par les consommateurs limitant ainsi leur utilisation (Tiwari *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2011). De ce fait, la sélection d'une huile adéquate devrait être basée non seulement sur son efficacité mais aussi sur sa compatibilité sensorielle et chimique avec l'aliment. Une autre alternative est d'essayer de minimiser la concentration en huile essentielle en les combinant avec d'autres méthodes de conservation, il s'agit de la technologie de barrières (hurdle technology).

1.4. Activité antioxydante des huiles essentielles

1.4.1. Le stress oxydatif

Les fonctions organiques et corporelles reposent sur des réactions d'oxydation qui produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme sous-produits ou de produits intermédiaires au cours du métabolisme normal. Dans les circonstances normales, cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense (Mohammedi, 2006). Le terme ERO est utilisé pour inclure à la fois des radicaux libres et certains dérivés non radicalaires réactifs de l'oxygène tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Nickavar *et al.*, 2008). Un équilibre entre la formation et l'élimination de ces molécules est nécessaire pour maintenir les fonctions physiologiques normales. Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs.

1.4.1.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (Vansant, 2004). Les principaux radicaux libres présents sont l'anion peroxyde, le radical hydroxyl, le radical peroxyde et l'oxygène singulier. Ils sont impliqués dans divers mécanismes physiologiques importantes. En effet, ils jouent un rôle dans la destruction des bactéries dans les cellules phagocytaires

(Grisham, 2000). Ils entrent aussi dans la signalisation cellulaire et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires létales telle que l'apoptose (Favier, 2003; Beaudeux et *al.*, 2006). D'autres sources des radicaux libres sont les mécanismes des cycles redox que produisent dans l'organisme, certaines molécules. Les rayonnements, les particules toxiques et l'alcool sont aussi capables de générer des radicaux libres.

1.4.1.2. Les conséquences du stress oxydatif

Une production excessive et prolongée des ERO peut causer de graves problèmes puisqu'elles peuvent réagir avec des molécules biologiques et leur provoquer des lésions directes, y compris l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides, entraînant des lésions des tissus et de cellules ainsi que des événements pathologiques (Nickavar et *al.*, 2008).

Les lipides et principalement les acides gras sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle ; réaction appelée peroxydation lipidique. Les conséquences de cette attaque sont graves tel que les maladies cardiovasculaires (Favier, 2003). Les radicaux libres peuvent aussi induire des effets mutagènes à l'ADN et l'oxydation du glucose très dangereuse dans le cas des personnes diabétiques. Les radicaux libres ont un rôle principal dans divers pathologies telle que l'athérosclérose, le cancer, les troubles inflammatoires et neuro-dégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Galvez et *al.*, 2005).

1.4.2. Les antioxydants

L'une des manières d'éliminer les radicaux libres et de les maintenir sous contrôle est l'action des systèmes antioxydants bio-synthétisés par l'organisme ou apportés par l'alimentation. Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui retarde, prévient ou élimine les dommages oxydatifs d'une molécule cible (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Les molécules impliquées dans la défense antioxydante peuvent se diviser en des antioxydants endogènes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase ...) et des antioxydants naturels (vitamine E, vitamine C, les caroténoïdes, des composés phénoliques, huiles essentielles...). Un régime alimentaire optimisé et riche en antioxydants naturels peut jouer un rôle primordial dans le système de défense antioxydant (Willcox et *al.*, 2004).

Les antioxydants ont été largement utilisés comme additifs alimentaires pour fournir une protection contre la dégradation oxydative des aliments, la rancidité, la décoloration et pour allonger leur durée de vie surtout les aliments gras. Les antioxydants les plus utilisés commercialement sont synthétiques ex. hydroxytoluène butylé (BHT) et hydroxyanisole butylé (BHA) et le butyle hydroquinone tertiaire (TBQH); toutefois ils peuvent provoquer des effets secondaires toxiques sur la santé (Dorman and Hiltunen, 2004; Tepe et *al.*, 2006; Nickavar et *al.*, 2008). Récemment, la recherche d'antioxydants naturels spécialement à partir de plantes a largement augmenté et apparait comme une alternative attractive pour substituer les antioxydants synthétiques. Une grande variété des huiles essentielles et des extraits des plantes aromatiques et médicinales ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes.

1.4.3. Méthodes de détermination de l'activité antioxydante in vitro des huiles essentielles

En raison de la complexité et la nature des composants des huiles essentielles, leur activité peut être due à différents mécanismes tels que la décomposition des peroxydes, le piégeage des radicaux libres, chélation des métaux de transition, capacité de réduction et comme donneurs d'hydrogène (Mao et *al.*, 2006). L'utilisation de tests différents (au moins deux) et complémentaires s'avère nécessaire pour cette évaluation (Schlesier et *al.*, 2002; Sarikurkcu et *al.*, 2010).

Les méthodes les plus couramment utilisées sont le test au radical 2,2-di (4-tert-octaphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le test de blanchiment de β -carotène dans le système acide linoléique. Dans le test au β -carotène- acide linoléique, l'antioxydant est en compétition avec le β -carotène pour transférer un atome d'hydrogène (s) aux radicaux peroxyde formés à partir de l'oxydation de l'acide linoléique en présence d'oxygène moléculaire (O_2) pour les convertir en hydro-péroxydes laissant les molécules β -carotène intacts (Huang et *al.*, 2005). L'activité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de cette oxydation par spectrophotométrie (Miller, 1971).

Le radical DPPH utilisé dans le test à DPPH est stable à température ordinaire et présente une couleur caractéristique bleu. La capacité des molécules antioxydantes de donner des électrons a été mesurée à partir de la décoloration de la couleur pourpre de la solution méthanolique du DPPH (Tepe et *al.*, 2005).

Le pouvoir réducteur mesure la capacité d'une molécule d'agir comme donneur d'électrons et par conséquent de réagir avec les radicaux libres en les convertissant à des produits plus stables et de terminer ainsi la réaction en chaîne radicale (Sarikurkcu et *al.*, 2010). D'autres tests existent tel que : le test de chélation des métaux de transition, le test au TBA (acide thiobarbiturique) etc...

1.4.4. Le potentiel antioxydant des huiles essentielles

De nombreuses sources d'antioxydants ont été explorées et la recherche d'autres molécules actives reste encore en cours. Les huiles essentielles et les extraits de plantes sont connus pour leur abilité à montrer divers degrés d'activités antioxydantes. La littérature montre de nombreux rapports sur des huiles essentielles ayant exhibé un fort potentiel antioxydant (Eminagaoglu et *al.*, 2007; ; Ozen et *al.*, 2007; Descalzo and Sancho, 2008; Sarikurkcu et *al.*, 2010). Certains ont été rapportés être plus efficace que les antioxydants synthétiques (Mimica-Dukic et *al.*, 2004; Tepe et *al.*, 2006; Hussain et *al.*, 2008; Liu et *al.*, 2008). Il a été montré aussi que les composés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol témoignent d'un fort potentiel antioxydant (Ruberto and Baratta, 2000; Tepe et *al.*, 2005; Ebrahimabadi et *al.*, 2010).

D'autres travaux ont porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles dans des systèmes alimentaires afin de mettre en évidence leur efficacité contre la détérioration oxydative des aliments. Des huiles essentielles tel que l'origan, la sauge et le romarin ont montré leur efficacité à réduire l'oxydation de la viande (Wong et *al.*, 1995; Tanabe et *al.*, 2002; Fasseas et *al.*, 2007). L'ajout de l'huile essentielle de *Satureja cilicica* inhibe significativement l'oxydation des lipides dans le beurre (Ozkan et *al.*, 2007). D'autre part, des études ont prouvé que l'administration d'huiles essentielles à activité antioxydante dans l'alimentation de certains animaux a un effet bénéfique sur la qualité de la viande issues de ces animaux (Lopez-Bote et *al.*, 1998; Sárraga and Regueiro, 1999; Botsoglou et *al.*, 2003; Govaris et *al.*, 2007).

2. Conservation alimentaire

La conservation des aliments a toujours été l'une des principales préoccupations de l'homme. La plupart des aliments sont des produits périssables et leur altération peut se produire à n'importe quel stade de fabrication. Les aliments peuvent être altérés rapidement par des agents physiques (la température, la lumière, l'humidité, des coups

etc.), chimiques (oxydation, réaction de Maillard etc.) ou biologiques (enzymes, processus métaboliques, des micro-organismes etc.) (Gould, 1996; Casp and Abril, 2003). Par conséquent, il y a un besoin urgent de réduire au minimum le risque de contamination et de détérioration des aliments.

La conservation des aliments a pour objectif principal le contrôle de l'action des agents biologiques sur les aliments qui peuvent provoquer non seulement l'altération mais de graves problèmes de santé après consommation. Les méthodes de conservation présentent donc un double objectif : celui de viser, d'empêcher et de prévenir la détérioration et donc de prolonger la durée de vie de l'aliment et deuxièmement d'assurer leur salubrité en inhibant ou en minimisant la croissance des micro-organismes. Par ailleurs, certaines méthodes de conservation peuvent modifier considérablement certaines caractéristiques des aliments diminuant ainsi leur acceptation par le consommateur, ce qui rend ce problème parmi les priorités actuels dans l'industrie alimentaire.

2.1. Stratégies et méthodes générales de conservation des aliments

Différentes stratégies ont été mises à point pour assurer la sécurité et la qualité des aliments ainsi que de prolonger leur durée de vie. Les principales techniques de conservation actuellement utilisées pour prévenir ou retarder la détérioration sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3. Méthodes traditionnelles de conservation des aliments (Ait-Ouazzou, 2012).

Séparation des micro-organismes	Filtration	
	Décantation	
	Centrifugation	
Reduction du métabolisme microbien et de l'activité enzymatique	Les basses températures	Réfrigération Congélation
	Réduction de l'activité de l'eau	
	Acidification	
	Fermentation	
	Atmosphères modifiées	
	Conservants	
Inactivation des micro-organismes et des enzymes	Traitements thermiques	Pasteurisation Stérilisation

2.1.1. Les traitements thermiques

La cause majeure de la détérioration des aliments reste principalement les micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) qui peuvent être dangereusement nocifs pour la santé des consommateurs. Le traitement thermique (pasteurisation ou stérilisation) est la méthode la plus communément utilisée par l'industrie agro-alimentaire pour l'inactivation des micro-organismes et des enzymes (Sergelidis and Abraham, 2009). Il est considéré comme la seule méthode capable d'assurer la stabilité et la sécurité des produits traités (Pagán et al., 1997; Lado and Yousef, 2002).

Les effets du traitement thermique sur les micro-organismes ont été largement étudiés (Manás et al., 2003; Hassani et al., 2007; Sergelidis and Abraham, 2009; Dogan et al., 2009). L'inactivation par la chaleur peut provoquer l'altération de diverses structures cellulaires et composantes des microorganismes. La membrane cytoplasmique est l'une des principales structures cibles de ce traitement (Pagán et al., 1997). Effectivement un traitement sévère affecte la membrane cytoplasmique, la paroi cellulaire, les protéines et des acides nucléiques. La sensibilité des bactéries à des substances comme les sels biliaries et le chlorure de sodium (Ait-Ouazzou et al., 2012b; Espina et al., 2012) après un traitement thermique confirme qu'il peut endommager la membrane et faire subir aux cellules des dommages sub-létaux. Selon l'intensité du traitement, les dommages que les cellules subissent dans divers structures cellulaires peuvent être réparées ou non en fonction des conditions environnementales (Espina et al., 2011; Ait-Ouazzou et al., 2011b).

Cependant, il se peut que quelques cellules endommagées ne meurent pas car elles peuvent développer une thermo-résistance (Hassani et al., 2007). Divers facteurs peuvent influencer cette résistance, parmi eux le type de micro-organisme, l'intensité de la température, le pH du milieu du traitement et la composition du milieu. En effet, les bactéries sporulées, tel que *B. subtilis* ou *Clostridium botulinum* témoignent d'une plus grande résistance aux traitements thermiques requérant des traitements sévères pour pouvoir les éliminer (Chea et al., 2000; Smelt et al., 2008). De nombreux travaux ont montré le rôle important du pH sur la thermo-résistance des bactéries ; étant plus résistantes en général à des pH proches de la neutralité et plus sensibles à des pHs acides (Hassani et al., 2005, 2007). La composition du milieu telle que la teneur en sucre, l'ajout de conservateurs ou la présence de sels etc. peuvent aussi avoir un effet sur la thermo-résistance des bactéries.

2.2. Nouvelles stratégies de conservation des aliments

Des efforts intenses ont été mis pour le développement de nouvelles stratégies de conservation qui peuvent être basées sur trois systèmes distincts (Gould, 1996) ; le développement de nouvelles méthodes thermiques moins sévères remplaçant celles traditionnelles, mais aussi le développement de nouvelles méthodes d'inactivation non thermiques et enfin l'application de processus combinés.

2.2.1. Méthodes non thermiques de conservation

Bien que les traitements thermiques soient capables d'inactiver les enzymes et les microorganismes, les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments peuvent être affectées à cause de la dénaturation des protéines et la perte de vitamines et de saveurs. C'est pourquoi le développement de technologies alternatives non thermiques a reçu une attention considérable en réponse à la demande de la part des consommateurs pour avoir des produits plus frais, naturels et sûrs (Jeyamkondan et *al.*, 1999). Ces techniques ont la possibilité d'inactiver les microorganismes à des températures proches d'ambiante et ainsi éviter les effets néfastes de la chaleur intense sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments (Rossa et *al.*, 2003). Ces méthodes font l'objet d'un grand nombre de recherche pour évaluer leur potentiel comme une alternative ou comme des processus complémentaires aux méthodes traditionnelles. Divers traitements non thermiques existent à savoir les hautes pressions hydrostatiques, les champs électriques de haut voltage, les pulsations lumineuses, l'irradiation, les champs magnétiques et les ultrasons.

2.2.1.1. Le champ électrique pulsé

Le champ électrique pulsé (Pulsed Electric Field) est un procédé non-thermique utilisé dans le traitement d'aliments liquides ou fluides. Les aliments traités se maintiennent à des températures ambiantes ou inférieures à celles de la pasteurisation (Calderón-Miranda et *al.*, 1999; Casp and Abril, 2003) et par conséquent les produits alimentaires peuvent garder des propriétés sensorielles et nutritionnelles proches des produits frais (Wan et *al.*, 2009). L'application de ce procédé est limitée aux aliments qui peuvent résister au champ électrique à haute intensité comme les aliments liquides homogènes (lait, jus, sauces, les oeufs liquides etc.).

Le champ électrique pulsé consiste en l'application d'impulsions électriques de courte durée (1-20 μ s) et de forte intensité. L'aliment est placé entre deux électrodes dont l'une est mise à terre et l'autre reliée à un courant pulsé entraînant ainsi un champ électrique élevé entre (20-40 kV/cm) (Vega-Mercado et *al.*, 1997; Casp and Abril, 2003; Herrero and Romero de Avila, 2006).

L'inactivation microbienne par cette technologie dépend de divers facteurs à savoir le type du microorganisme (Gram négatives ou positives, des spores), la concentration initiale et la phase de croissance des microorganismes, les propriétés électriques, la conductivité et le pH de l'aliment à traiter, le nombre, la durée et la forme des pulses (Calderón-Miranda et *al.*, 1999; Cserhalmi et *al.*, 2002; Ravishankar et *al.*, 2002; Góngora-Nieto et *al.*, 2002; Casp and Abril, 2003).

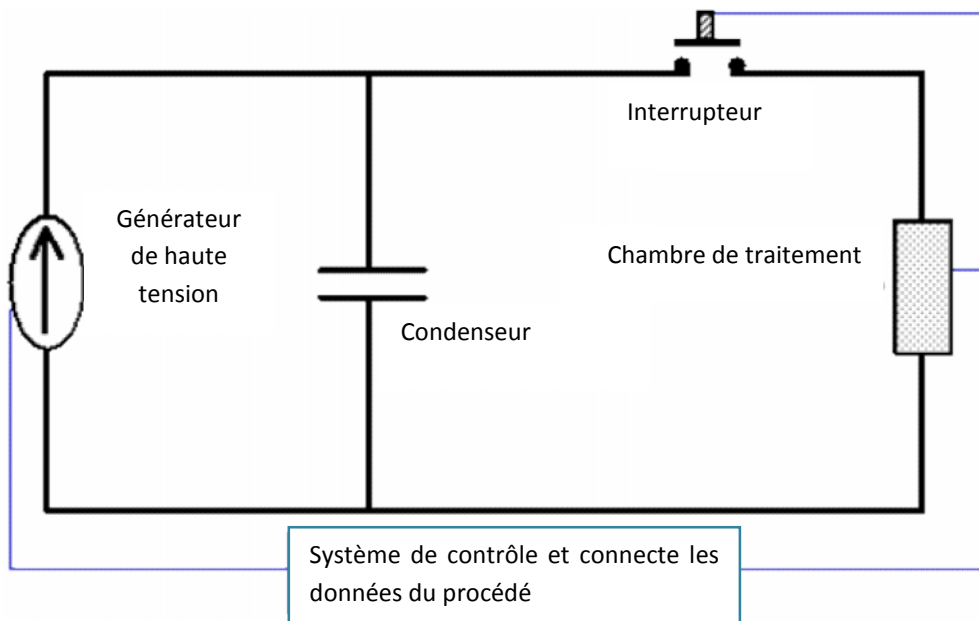


Figure 3. Schéma de base d'un système de génération du champ électrique pulsé (Álvarez, 2003).

L'inactivation de divers micro-organismes tels qu'*E. coli*, *S.aureus*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. cerevisiae* et d'autres souches par le champ électrique pulsé a été largement étudiée (Calderón-Miranda et *al.*, 1999; Cserhalmi et *al.*, 2002; Álvarez et *al.*, 2003a; Perni et *al.*, 2007; Somolinos et *al.*, 2008; Saldaña et *al.*, 2009).

La théorie la plus acceptée expliquant le mécanisme d'inactivation microbienne par cette technologie est la théorie d'électroporation ou rupture diélectrique de la membrane

cellulaire. C'est une réponse physique de l'exposition des cellules à ce champ électrique à haute intensité. Selon cette théorie, la cellule exposée à un champ électrique subit une déstabilisation temporaire de la bicouche lipidique et des protéines de la membrane. En effet, un potentiel transmembranaire est induit dans la membrane cellulaire. Des charges libres s'accumulent sur les deux côtés de la membrane et s'attirent, ce qui comprime la membrane cellulaire. Lorsque ce potentiel transmembranaire induit est plus grand que le potentiel naturel de la cellule, la membrane de la cellule perd sa stabilité et une rupture diélectrique de la membrane aura lieu et par conséquent, on observe la formation de pores dans cette membrane, de sorte qu'elle est partiellement ou complètement endommagée (Zimmermann, 1986; Castro et al., 1993; Barbosa-Cánovas et al., 1998; Cserhalmi et al., 2002; Góngora-Nieto et al., 2002; Casp and Abril, 2003). Un changement dans la perméabilité membranaire et une inhabilité à bien fonctionner (distorsion de transport ionique) se produit ce qui résulte en l'inactivation des cellules (Figure 4) (Tsong, 1990; Gómez et al., 2005).

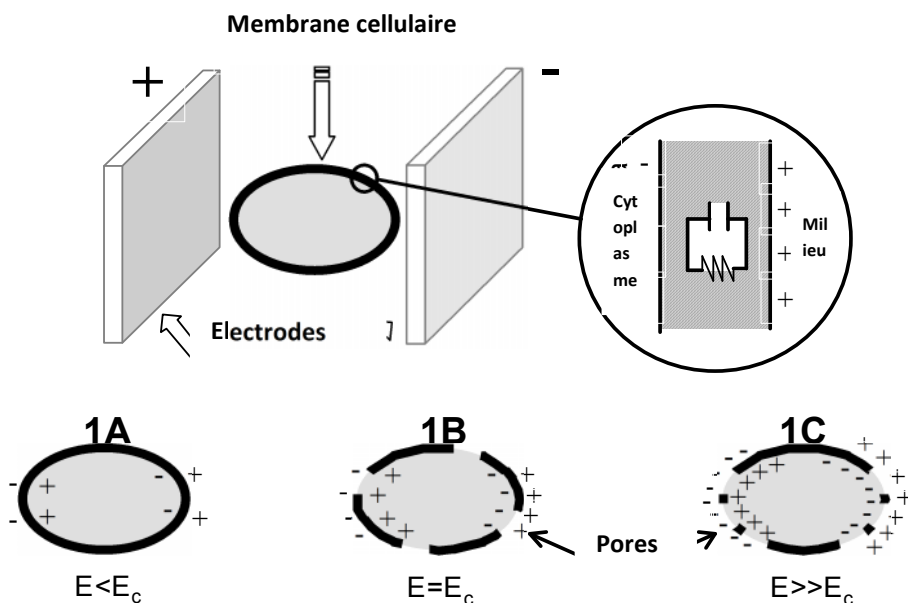


Figure 4. Mécanisme d'inactivation par les pulses électrique de haute intensité. "E": Champ électrique. "E_c": Champ électrique critique (Álvarez, 2003).

2.2.1.2. Les hautes pressions hydrostatiques

Les hautes pressions hydrostatiques (HPH) est une technique qui reçoit actuellement un grand intérêt en tant que méthode pour la destruction des micro-organismes pathogènes et d'altération des aliments. Cette méthode consiste en l'application de niveaux élevés de

pressions statiques (50-1000 MPa) de façon continue pendant un certain temps à des aliments solides ou liquides conditionnés (Mertens and Deplace, 1993; Casp and Abril, 2003; Herrero and Romero de Avila, 2006). La pression appliquée à un système permet un traitement uniforme et isostatique quelle que soit la taille, la forme et le volume de la matière traitée. Les effets qui sont minimaux sur les qualités sensorielles (telles que la texture, la couleur ou la saveur) varient selon l'aliment et l'intensité du traitement (Herrero and Romero de Avila, 2006; Rajkovic et *al.*, 2010; Muñoz-Cuevas et *al.*, 2013). La production commerciale d'aliments sous pression est devenue une réalité dans divers pays (Japon, France, Espagne, Etats-Unis...) (Rajkovic et *al.*, 2010).

Les équipements des HPH utilisés dans le traitement des aliments sont formés essentiellement par une chambre de traitement (cylindrique en acier à haute résistance), un générateur de pression (en général un système de pompage comprenant la pompe hydraulique et un système multiplicateur de pression) et un système de contrôle de la température.

L'inactivation de divers micro-organismes par les HPH a été largement étudiée *in vitro* ou directement sur des aliments (Jordan et *al.*, 2001; Chen and Hoover, 2003; Van Opstal et *al.*, 2005; Muñoz-Cuevas et *al.*, 2013). Le mode d'action des HPH est en fonction de l'intensité de la pression (Smelt, 1998). Les hautes pressions hydrostatiques utilisées dans l'industrie agroalimentaire agissent sur les liaisons chimiques faibles (Casp and Abril, 2003). En effet, les liaisons ioniques et les interactions hydrophobes responsables du maintien de la structure secondaire et tertiaire des protéines sont perturbées. Ce traitement affecte les cellules et altère leur perméabilité et les échanges d'ions mais aussi peut inactiver certaines enzymes vitales pour la survie des cellules bactériennes (Rajkovic et *al.*, 2010). La perte de viabilité des micro-organismes par ce procédé est probablement le résultat d'une combinaison de dommages dans la cellule (Rendueles et *al.*, 2011). Les changements dans la structure intramoléculaire de divers molécules à > 300 MPa peut conduire entre autres à la réduction de la synthèse de l'ADN, l'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires, dénaturation des biopolymères et des protéines, y compris l'inactivation des enzymes et aussi influencer l'expression de certains gènes (Smelt, 1998; Herrero and Romero de Avila, 2006; Rendueles et *al.*, 2011).

La résistance des microorganismes aux HPH peut dépendre des facteurs du processus (intensité de la pression appliquée, le temps et la température du traitement), les

caractéristiques du microorganisme (type, conditions de la culture, concentration cellulaire) et les caractéristique du milieu du traitement (pH, activité de l'eau, composition du milieu).

2.3. Processus combinés de conservation

La conservation des aliments par le biais de processus combinés consiste en l'utilisation de diverses méthodes de conservation afin de réduire et limiter leur intensité tout en maintenant ou en améliorant l'effet conservateur souhaité. Les processus de préservation combinés appelés aussi technologie de barrière ou d'obstacle «Hurdle technology» préconisent l'utilisation de manière intelligente des méthodes de conservation existantes et nouvelles mais à moindre intensité au lieu d'un seul système de conservation à haute intensité ce qui permet d'obtenir des aliments de meilleur qualité et microbiologiquement surs tout en préservant leur caractéristiques sensorielles et nutritionnelles (Leistner and Gorris, 1995; Leistner, 2000; Casp and Abril, 2003). Des processus de combinaisons réussis dépendent non seulement de l'augmentation de l'inactivation microbienne mais aussi de la compatibilité des processus sélectionnés (Rossa et *al.*, 2003).

Il existe dans la littérature divers exemples de processus combinés avec des résultats très prometteurs montrant des effets additifs ou synergétiques. L'inactivation de *E. coli* O157:H7 par le champ électrique pulsé a été améliorée synergiquement en baissant le pH de 6,4 à 3,4 par utilisation de l'acide sorbique ou benzoïque (Liu et *al.*, 1997). D'autres études ont mis en évidence l'effet synergétique de la combinaison de traitements modérés des ultrasons et des hautes pressions hydrostatiques ou traitement thermique (Raso et *al.*, 1998; Pagan et *al.*, 1999). D'autres combinaisons ont été testées dans d'autres travaux à savoir le champ électrique pulsé et les ultrasons (Su et *al.*, 1996), et les HPH et l'irradiation (Crawford et *al.*, 1996), les HPH et un traitement thermique modéré (Patterson and Kilpatrick, 1998) etc...

L'addition des antimicrobiens naturels a montré des effets effectifs lorsqu'ils sont combinés avec d'autres processus de conservation. Les bactériocines telle que le nisine et le lysosome produits par les bactéries lactiques ont été largement étudiés (Pol et *al.*, 2000; Cleveland et *al.*, 2001). De nombreux auteurs ont montré leur efficacité en combinaison avec les HPH (Garcia-Graells et *al.*, 1999; Morgan et *al.*, 2000) et le champ électrique pulsé (Terebiznik et *al.*, 2000). Les extraits des plantes aromatiques et médicinales

spécialement les huiles essentielles qui ont montré d'importantes propriétés antibactériennes apparaissent prometteuses pour une utilisation combinée avec d'autres méthodes de préservation. Diverses combinaisons ont été étudiées, avec des traitements thermiques modérés (Char et *al.*, 2009; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012b), avec le champ électrique pulsé (Mosqueda-Melgar et *al.*, 2008; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012b) et les HPH (Palhan et *al.*, 2004; Evrendileka and Balasubramaniam, 2011).

3. Les biofilms

3.1. Définition

Un biofilm est défini comme étant un groupe ou une communauté de microorganismes qui s'attachent et colonisent une surface. C'est un mode de croissance d'autoprotection répandue chez les microorganismes dans la nature et qui est différent de celui des cellules planctoniques (Hood and Zottola, 1995; Xianming and Zhu, 2009). Un biofilm n'inclus pas seulement les bactéries, mais il décrit aussi toute la matière extracellulaire ou matrice de substances polymères extracellulaires (EPS) qui est responsable de la morphologie, structure et les propriétés physicochimiques de ces agrégats cellulaires (Jessen and Lammert, 2003; Pang Chee Meng, 2007).

Un biofilm peut comprendre une seule ou de multiple espèces mais dans un environnement naturel souvent les biofilms sont formés par une variété d'espèces bactériennes, de moisissures, d'algues ou des protozoaires qui peuvent former une seule couche ou des structures tridimensionnelles.

3.2. Les biofilms dans les divers environnements

Les biofilms présentent une grande diversité vis à vis du type du support colonisé. Ils peuvent se développer sur n'importe quel type de surface biotique ou abiotique, qu'elle soit minérale (systèmes aquatiques naturelles, roche, interfaces air-liquide...), organique (peau, dents, tissus vivants, racines et feuilles des plantes), industrielle (canalisations industrielles ou d'eau potable, coques des navires, des surfaces immergées....) ou médicale (prothèses, cathéters ...). Les propriétés physiques et chimiques de la surface jouent un rôle majeur dans les mécanismes de formation d'un biofilm (Chavalet de Rochemonteix, 2009; Donlan, 2002).

La capacité des microorganismes pathogènes ou d'altération de se fixer et de se développer sur les surfaces de contact alimentaires ou sur les différents équipements dans les industries agroalimentaires allant de l'acier, plastique, le bois, caoutchouc, métal ou le verre, sous des conditions favorables qui sont suffisantes pour leur viabilité et leur croissance (Bower *et al.*, 1996; Kumar and Anand, 1998; Trachoo, 2003; Vlková *et al.*, 2008) met en jeu la qualité et la sécurité microbiologique des aliments. Les biofilms peuvent se former tout au long de la chaîne alimentaire et notamment à la surface des équipements ou matériaux de conditionnement. Maîtriser la qualité sanitaire des aliments implique donc de contrôler la contamination microbiologique des surfaces susceptibles d'être en contact avec les denrées fabriquées.

3.3. Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un processus dynamique et complexe et plusieurs processus sont impliqués dans leur attachement et leur croissance régulés par de nombreux facteurs exogènes et endogènes (Sauer *et al.*, 2007). La formation d'un biofilm commence par la colonisation d'une surface par les bactéries. L'adhérence est basée sur les forces physicochimiques attractives (liaisons van der Waals, électrostatiques, interactions hydrophobes) entre la cellule et le substrat (Hood and Zottola, 1995; Strevett and Chen, 2003). Les mécanismes influençant l'attachement bactérien à la surface sont les caractéristiques des souches microbiennes, la composition et la rugosité de la surface d'adhérence, la disponibilité et la concentration en nutriments, la charge de la surface, le pH, la température, la concentration en électrolytes et le flux de matériaux ainsi que le type de surface (Melo, 2003). Le mécanisme le plus accepté dans la fixation bactérienne aux surfaces solides est un processus à deux étapes. La première étape implique que les bactéries soient transportées assez proche de la surface pour qu'elles puissent être adsorbées. Cette étape est réversible et les bactéries peuvent être enlevées par un lavage simple (Kumar and Anand, 1998; Strevett and Chen, 2003; Marchal, 2010). Une fois adsorbées, la seconde étape implique la production de la matière extracellulaire (EPS) pour que les microorganismes deviennent ancrés à la surface; c'est la phase irréversible de l'adhésion. Cette étape met en jeu des forces plus importantes, tel que les liaisons hydrogènes, covalentes ou des interactions hydrophobes fortes (Marchal, 2010). Les cellules bactériennes irréversiblement adhérentes croissent et se divisent utilisant les nutriments présents dans l'environnement fluide avoisinant. Cela conduit à la formation de

zones de forte densité cellulaire qui s'agrandissent et s'unissent pour former une couche de cellules recouvrant la surface (Kumar and Anand, 1998). Durant cette période, il y aura aussi production de la matière exopolymère additionnelle (EPS) qui aide à l'ancrage des cellules à la surface et à stabiliser la colonie (Characklis and Marshall, 1990).

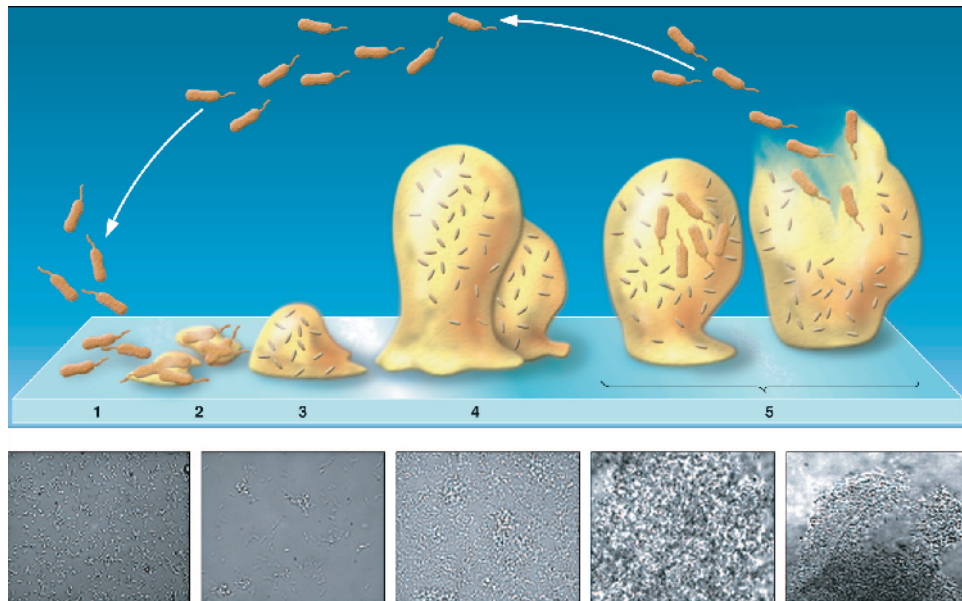


Figure 5. Processus de développement d'un biofilm (1) Attachement réversible, (2) Attachement irréversible, (3) Maturation (4) Maturation et (5) dispersion. (Sauer et *al.*, 2007).

3.4. Contrôle de biofilms

Il est important de développer des méthodes de nettoyage et de désinfection ainsi que des systèmes de contrôle de biofilms. Bien qu'il existe diverses méthodes pour le contrôle de biofilms, elles présentent des limitations à éliminer les biofilms de la surface contribuant ainsi à la dissémination des microorganismes résistants (Ferreira et *al.*, 2010). Simoës et *al.*, (2006) ont montré que généralement les désinfectants ne pénètrent pas la matrice superficielle du biofilm après une procédure de nettoyage et donc ils ne détruisent pas toutes les cellules vivantes d'un biofilm et que une procédure efficace de nettoyage doit rompre ou dissoudre la matrice d'EPS pour que les désinfectants puissent avoir accès aux cellules viables. La stratégie principale pour prévenir la formation du biofilm est la désinfection régulière avant que les bactéries ne s'attachent fermement aux surfaces (Midelet and Carpentier, 2004; Simoës et *al.*, 2006).

3.4.1. Les mesures de contrôle conventionnelles

Les biofilms surtout en industries agroalimentaires peuvent être éliminés en adoptant différentes stratégies soit des méthodes physiques ou chimiques. Plusieurs approches ont été décrites pour prévenir la formation initiale d'un biofilm et inhiber sa croissance et son développement.

La stratégie traditionnelle à savoir les méthodes mécaniques comme le brossage ne doivent pas être négligés (Bower et *al.*, 1996; Gibson et *al.*, 1999). Il existe d'autres nouvelles méthodes utilisées tel que les traitements par les ultrasons (Oulahal-Lagsir et *al.*, 2000; Oulahal et *al.*, 2004), des lavages à haute pression (Burfoot and Middleton, 2009), le champ électrique pulsé ou jets de plasma (Lee et *al.*, 2003; Araya et *al.*, 2007). Les produits chimiques couramment utilisés dans les processus de désinfection de biofilms sont des tensioactifs, des produits alcalins et acides. Cependant, ces substances chimiques représentent l'inconvénient d'être toxiques; ils peuvent atteindre des sources d'eau potable ou s'accumuler dans les chaînes alimentaires menaçant ainsi la santé publique.

3.4.2. Mesures de contrôle alternatives des biofilms

Afin d'éviter l'usage de produits synthétiques et chimiques, des méthodes alternatives plus naturelles sont développées. Des mécanismes biologiques seuls ou des procédures synergétiques pourrait offrir de nouvelles stratégies efficaces pour le contrôle de biofilms.

Des détergents à base d'enzymes ont été utilisés comme bio-nettoyants (Simoës et *al.*, 2010). En effet, les enzymes (protéases, α -amylase et β -glucanase etc.) vu leur haute spécificité et leur rapide réaction ont prouvé leur efficacité dans la dégradation des polymères extracellulaires formant la matrice et la désorganisation de l'architecture du biofilm et donc dans leur élimination (Potthoff et *al.*, 1997; Oulahal-Lagsir et *al.*, 2003).

Plusieurs chercheurs se sont intéressés dans les dernières années à l'évaluation des effets des huiles essentielles sur les biofilms visant leur utilisation ou leurs constituants comme désinfectants surtout dans l'industrie agroalimentaire. Mattos de Oliveira et *al.*, (2010) ont testé des solutions désinfectantes à base de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* et *Cymbopogon nardus* L. appliquées seuls ou en combinaison sur deux phases (3h et 240h) de la formation d'un biofilm de *L. monocytogenes* sur une surface en acier inoxydable. Ils ont montré que ces solutions ont réduit effectivement le nombre de cellules adhérents après

60 min de contact. Une autre étude a montré que la présence de 5 composés d'huiles essentielles a causé la réduction de l'activité métabolique de biofilms de deux isolats pathogéniques de *L. monocytogenes* (Sandasi et *al.*, 2008).

Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Collecte des plantes

Les plantes des espèces de *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas*, *Myrtus communis*, *Laurus nobilis* et *Satureja calamintha* Scheele (Figure 6) ont été récoltées durant la période Mars-Juin de 2009, de différentes stations de la région du nord du Maroc. Ces régions sont Menar, Rémilat, Jebel lehbib et la région de Moulay abdessalam.

Les plantes fraîchement collectées ont été séchées à l'ombre à l'abri de la lumière et dans un endroit sec et aéré. Devenues sèches, les feuilles ont été récupérées et mises dans des sacs en papier et stockées jusqu'à leur utilisation.

❖ *Mentha pulegium*

Le genre *Mentha* appartient à la famille des Lamiacées. Il comprend 20 espèces qui se propagent partout dans le monde. *Mentha pulegium* appelé aussi menthe pouliot, fait partie des espèces indigènes d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie et du proche Orient. Cette plante a été traditionnellement utilisée comme antiseptique, dans le traitement du rhume, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, la bronchite et la tuberculose. *Mentha pulegium* est une plante qui pousse spontanément au Maroc, ce qui fait d'elle une source potentielle des huiles essentielles.

❖ *Lavandula stoechas*

La plante de *Lavandula stoechas* appelée aussi lavande papillon, appartient à la famille des Lamiacées. On la trouve dans tous le maroc et les pays méditerranéens, mais aussi en Asie. C'est un petit arbrisseau décoratif et parfumé, très utilisés en ornementation. Cette plante possède des propriétés antiseptiques, bactéricides, désinfectantes, calmantes, antispasmodiques et carminatives. En phytothérapie, cette plante est recommandée pour combattre l'anxiété, la nervosité et les insomnies, mais aussi pour soulager les rhumatismes et soigner les infections des voies respiratoires.

❖ *Myrtus communis*

C'est une plante du nom commun de Myrte, originaire du bassin Méditerranéen et appartenant à la famille des Myrtacées. C'est un arbuste bien ramifié pouvant atteindre 2 à 3 m à feuillage persistant et odorants et des fruits sous forme de baies comestibles. Elle est

connue pour son utilisation ornementale, alimentaire (aromatisants), médicinale (antiseptique).

❖ *Laurus nobilis*

Cette plante (appelé aussi laurier sauce) appartient à la famille des Lauracées. C'est une espèce endémique de la région méditerranéenne, qui est cultivé dans de nombreux pays à climat tempéré. Elle fait partie des plantes spontanées de la région méditerranéenne, on le trouve sous forme d'arbre ou d'arbuste rustique au feuillage persistant. Elle est surtout cultivée pour ses caractéristiques condimentaires et médicinales. Ses feuilles sont très utilisées en cuisine pour aromatiser divers plats. Cette plante est aussi utilisée dans l'ornementation des jardins. Mais aussi en médecine, pour traiter de nombreux maladies (diurétique, des affections, antalgique,....).

❖ *Satureja calamintha* Scheele

Cette plante appartient à la famille des Lamiacées. C'est une plante vivace de petite taille à odeur forte. On la trouve dans toute la région méditerranéenne, mais aussi en Asie. Elle est utilisée comme plante ornementale et dans la médecine alternative.



Mentha pulegium (فليبو)

Lavandula stoechas (خزامى)

Satureja calamintha Scheele



Myrtus communis (ريحان)

Laurus nobilis (رند)

Figure 6. Représentation photographique des plantes aromatiques et médicinales étudiées.

1.1.2. Extraction des huiles essentielles

Matériel et méthodes

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par entraînement à la vapeur des feuilles séchées pendant 2h. L'ébullition de l'eau crée un courant de vapeurs qui en traversant les plantes fait éclater les cellules et entraîne avec lui les molécules volatiles des huiles essentielles. Après condensation, le mélange obtenu appelé distillat est décanté. Pour faciliter la séparation de la phase organique, de la phase aqueuse, on ajoute 2 % de NaCl pour augmenter la charge ionique de l'eau. Les extraits ont été conservés à 4°C jusqu'à l'analyse chimique de leurs composants et l'évaluation de leurs activités.



Figure 7. Photo de l'appareil d'entraînement à la vapeur.

Le rendement en huile essentielle obtenu à partir des différentes plantes est exprimé en pourcentage par rapport au poids de la matière végétale sèche et il est indiqué dans le tableau 4.

Tableau 4. Rendement en huiles essentielles des différentes plantes sélectionnées.

Plantes	Rendement en (%)
<i>Laurus nobilis</i>	0,23
<i>Myrtus communis</i>	0,89
<i>Lavandula stoechas</i>	0,13
<i>Satureja calamintha</i>	2,39
<i>Mentha pulegium</i>	1,9

1.2. Caractéristiques des microorganismes testés

1.2.1. Les souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail ont été choisies pour leur pathogénicité ou pour leur rôle dans le processus d'altération des aliments. Les travaux ont été réalisés sur 10 souches bactériennes. Leur origine et leurs principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 5.

Les souches sont conservées en -20°C ou -80°C en cryo-tubes dans un mélange du milieu Bouillon Cœur Cerveille (BHI) ou le milieu Tryptone Soy Broth (TSB) avec 15% de glycérol (v/v). A partir des cryo-tubes conservés, un ensemencement en stries est réalisé dans des boîtes de pétri de TSA (Tryptone Soy Agar) pour une conservation de plus courte durée.

Tableau 5. Caractéristiques et origine des souches bactériennes.

Référence des souches	Origine de la souche ou collection	Principales caractéristiques
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Souche de collection	Bacille à Gram -
<i>Escherichia coli</i> CECT 431	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Bacille à Gram -
<i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 4315	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Bacille à Gram -
<i>Salmonella</i> Seftenberg CECT 4563	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Bacille à Gram -
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Souche de collection	Bacille à Gram +
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Bacille à Gram +
<i>Listeria innocua</i> LRGA01	Environnement laitier, Souche de collection	Bacille à Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Coque à Gram +
<i>Enterococcus faecium</i> CECT 4932	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Coque à Gram +
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 4071	Collection Espagnole de Cultures Type (CECT)	Bacille à Gram +

1.2.2. Les souches fongiques

L'activité antifongique des huiles essentielles a été testée sur des souches de champignons filamenteux. Deux souches fongiques ont été utilisées: *Aspergillus flavus*

CECT 2279 et *Aspergillus flavus* CECT 2684 de la Collection Espagnole de Cultures Type. Les souches ont été reçues lyophilisées et ont été par la suite revitalisées. Le lyophilisat est réhydraté avec 0,2 ml du milieu de Sabouraud liquide, puis la suspension obtenue est répartie sur un milieu solide approprié, la gélose dextrosée de pomme de terre (Potato Dextrose Agar, PDA) dans des tubes. Les tubes sont maintenus à 4°C et sont repiqués une fois par mois. Pour les tests, les champignons ont été cultivés sur milieu PDA pendant 7 jours à 30°C.

2. Analyse chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/ SM)

L'identification et la quantification des composants chimiques des huiles essentielles ont été réalisées par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CPG/SM). Les analyses ont été faites à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Trace GC ULTRA) équipé d'un injecteur couplé à un spectromètre de masse (Polaris Q MS à trappe ionique) avec impact électronique en mode ionisation (70 eV). La séparation est effectuée dans une colonne capillaire VB-5 ayant les caractéristiques suivantes:

- Phase stationnaire : Polysiloxane de méthyle à 5% de phényle.
- Longitude de la colonne : 30 m.
- Diamètre interne: 0,25 mm.
- Epaisseur du film: 0,25 µm.

Les conditions dans lesquelles chacun des échantillons est analysé sont les suivantes : La température d'injection été de 220°C avec un programme de température de 40-300°C à une vitesse de 4°C/min. Le gaz hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1,4 ml/min. 1µl des échantillons dilués (1% v/v dans du n-Hexane) est injecté en mode fractionnement pour une meilleure identification des composés. En combinant les deux techniques, on obtient les spectres de masse des différents composés des échantillons des huiles essentielles. L'identification des composants des huiles essentielles est réalisée en comparant leur temps de rétention et leurs spectres de masse avec ceux dans la base de données, dans la littérature et aussi par comparaison avec les données de la bibliothèque NIST MS research (v.6) (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD).

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

3.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée *in vitro* en utilisant deux différentes techniques telles que détaillées ci-dessous.

3.1.1. Obtention des suspensions bactériennes

La remise en culture des souches bactériennes a été effectuée par ensemencement d'une colonie isolée à partir des boîtes d'agar nutritif dans 50 ml du milieu TSB. Le bouillon a ensuite été incubé 24 h à 37°C et à 30°C pour les souches de *Listeria* jusqu'à ce que la phase stationnaire de croissance soit atteinte.

3.1.2. Technique de diffusion en gélose

La méthode de diffusion en gélose est utilisée comme test préliminaire pour une détermination qualitative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Figure 8). Après l'obtention des souches bactériennes ; 0,1ml (10^7 UFC/ml) de la suspension bactérienne de chaque souche d'intérêt a été inoculé à la surface d'une boîte de gélose de Muller Hinton Agar (MHA) à l'aide d'un étaloire de façon à avoir une croissance répartie de façon homogène sur toute la boîte. Des disques stériles de papier filtre (Wattman N°1, 6 mm de diamètre) ont été individuellement imprégné avec 20 µl de chaque huile essentielle dissoute dans 3 % d'éthanol absolu et ensuite placés à l'aide d'une pince stérile à la surface des boîtes de pétri de MHA préalablement ensemencée avec les microorganismes. Les boîtes de Pétri ont été conservées à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des huiles essentielles. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24 h sauf pour les boîtes inoculées avec *Listeria*, elles sont incubées à 30°C. Les diamètres des zones d'inhibition résultants ont été mesurés en mm incluant le diamètre du disque de papier (6 mm). Les tests ont été effectués en triple. Les résultats sont exprimés en moyenne de trois déterminations (+/-) écart type.

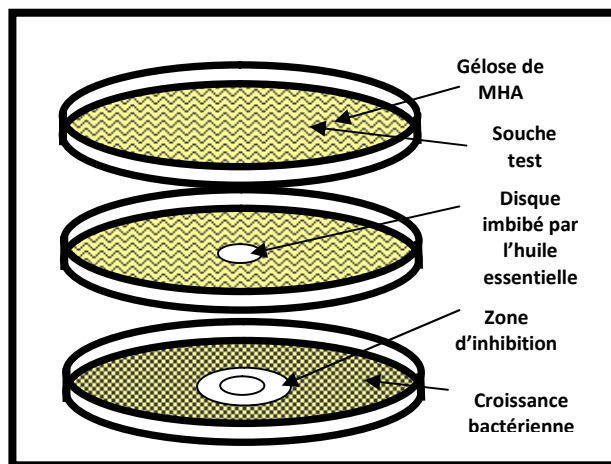


Figure 8. Illustration de la méthode de diffusion en agar.

3.1.3. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Dans ce travail, la technique de micro-dilution utilisant la résazurine comme indicateur de croissance bactérienne (Mann and Markham, 1998) a été utilisée pour la détermination des valeurs de CMI. L'utilisation de la résazurine comme indicateur visuel pour la détermination des valeurs des CMI des huiles essentielles est une méthode nouvelle de micro-dilution. C'est un indicateur d'oxydo-réduction utilisé pour l'évaluation de la croissance cellulaire. Il s'agit d'un colorant violet/bleu non fluorescent qui devient rose et fluorescent lorsqu'il est réduit en résorufine par des enzymes oxydoréductases dans les cellules viables (Sarker et al., 2007) (Figure 9).

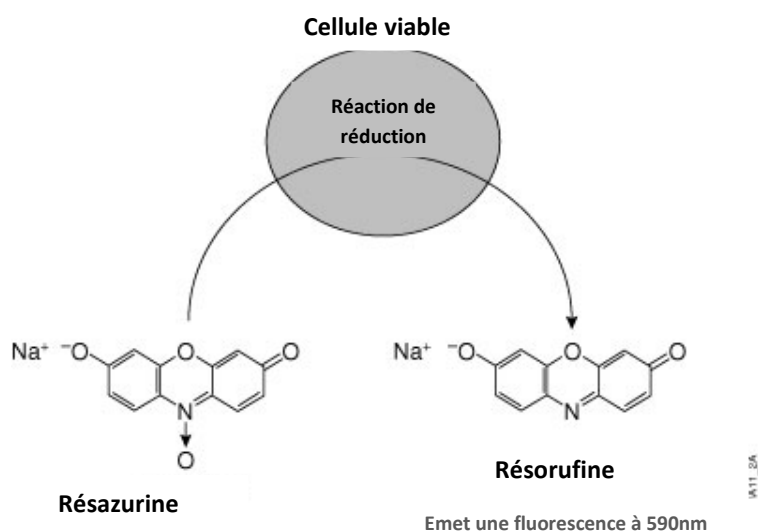


Figure 9. Réduction du résazurine en résorufine par les enzymes oxydoréductases des cellules viables.

Les huiles essentielles ont été dissoutes dans 0.5% (v/v) du Tween 80. Des séries de dilutions allant de 0,5 à 56 µl/ml ont été préparées dans le bouillon Muller Hinton (MHB). Après agitation, 180 µl de chaque concentration sont ajoutés dans les puits d'une plaque de microtitration de 96 puits. Les suspensions microbiennes préparées ont été diluées pour atteindre une concentration de 10^7 UFC/mL, puis 20µl sont ajoutés à chaque puits (concentration finale de 10^6 UFC/ml dans chaque puits). Tous les essais ont été effectués en triple. Pour chaque analyse, les contrôles suivants sont préparés :

- Un contrôle positif : Incluant le milieu MHB et le Tween 80 avec le microorganisme objet d'étude.
- Un contrôle négatif : Incluant le milieu MHB avec ajout d'huiles essentielles mais sans suspension bactérienne.

Les plaques de microtitration sont ensuite incubées à température adéquate pour chaque germe (30°C pour les souches *Listeria* et 37°C pour les autres bactéries) pendant 18 à 24 h. Pour la révélation de la CMI, 5µl de la résazurine à 0,01% (w/v) ont été additionnés à chaque puits. La CMI est définie comme la plus petite concentration en huile essentielle qui ne produit pas de changement de coloration de la résazurine et qui correspond à l'absence de croissance bactérienne (Figure 10).

La CMB est définie comme étant la concentration minimale bactéricide de l'huile capable de tuer 99% de l'inoculum. A partir des puits où il n'y a pas eu de changement de coloration donc absence de croissance, des aliquotes de 10 µl de chaque puits sont transférés et ensemencés sur la gélose de Muller Hinton (MHA) et ensuite incubés pendant 18 h aux températures adéquates pour chaque germe. La CMB correspond à la plus petite concentration où il n'y a pas de subculture.

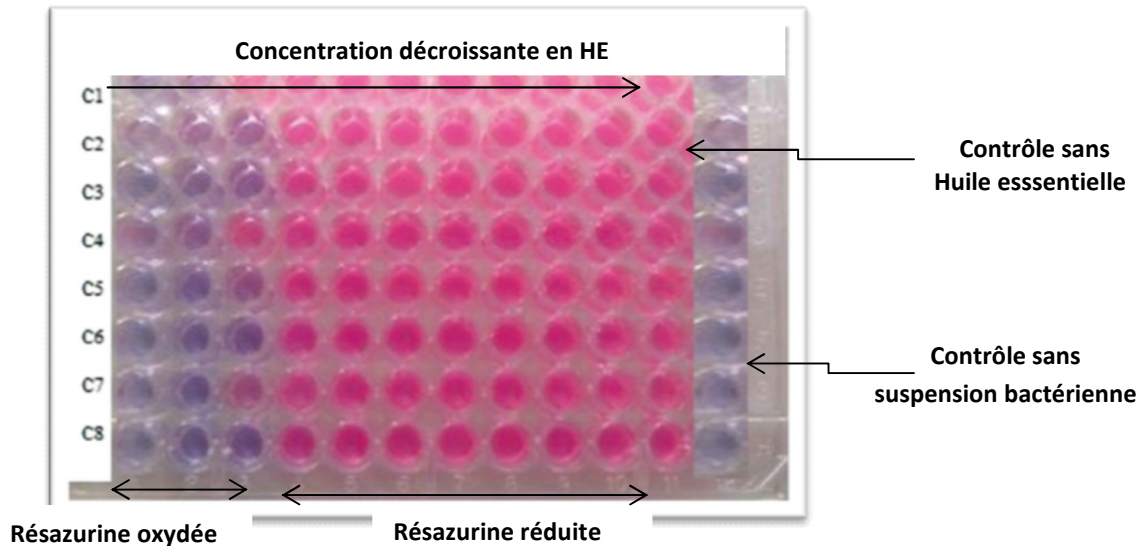


Figure 9. Exemple d'une plaque de micro-titration pour la détermination des valeurs de CMI des huiles essentielles par la méthode de microdilution.

3.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de dilution en milieu gélosé en mesurant la croissance radiale sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Les huiles essentielles ont été utilisées à des concentrations allant de 0,2 à 14 $\mu\text{l/ml}$ et ont été dissoutes dans des tubes stériles contenant 9 ml du milieu PDA en surfusion (45°C) additionné de 50 mg/ml de chloramphénicol. Le mélange est ensuite coulé dans des boîtes de pétri. Après solidification de la gélose, des disques mycéliens de 5 mm de diamètre sont coupés de la périphérie d'une culture de 7 jours et placés aseptiquement au centre de chaque boîte de pétri, face supérieure contre le milieu de culture. Le contrôle consiste en milieu PDA avec le disque de mycélium mais sans huile essentielle. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C pendant 7 jours. Le diamètre de la croissance radiale des disques mycéliens est ensuite mesuré. Trois répétitions sont faites pour chaque condition. Le pourcentage de l'inhibition de la croissance mycélienne est calculé comme suit:

$$\% \text{ Inhibition} = (D_C - D_T) \times 100 / D_C$$

Où D_C est le diamètre de croissance dans les boîtes contrôles alors que D_T est le diamètre de croissance dans les boîtes traitées.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus petite concentration où aucune croissance n'est visible. L'IC₅₀ représente la concentration capable de réduire de 50% la croissance mycélienne.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

Trois différents tests ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles.

4.1. Activité du piégeage du radical DPPH

Elle est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Blois (Blois, 1956). Ce test est basé sur la réduction du radical stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée en DPPH réduit (diphénylpicryl hydrazine) de couleur jaune facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm. Cette réduction est due à l'aptitude des composés antioxydants à céder des protons ou des électrons.

Un millilitre d'une solution de 1mM du radical DPPH dans du méthanol est ajouté dans des tubes contenant 3 ml de différentes dilutions (1,25-10 µl/ml) de chacune des huiles essentielles dans de l'éthanol. Après agitation au vortex, les tubes sont maintenus à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min. La mesure de l'absorbance est réalisée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY6305, UK). Le BHT (un antioxydant standard) est utilisé comme contrôle positif et l'éthanol comme contrôle négatif. Le pourcentage de l'activité du piégeage du radical DPPH est calculé comme suit:

$$\% \text{ Piégeage du radical DPPH} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Avec:

A_{control} est l'absorbance de la réaction contrôle (contenant tous les réactifs excepté le produit à tester) et A_{test} est l'absorbance du produit à tester.

4.2. Test de blanchissement du β -carotène

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été aussi étudiée par le test de blanchissement du β -carotène selon la méthode spectrophotométrique de Miller (Miller, 1979). Cette méthode est basée sur la capacité du produit testé à réduire la décoloration oxydative du β -carotène en inhibant l'oxydation de l'acide linoléique. Une solution de β -

carotène a été préparée en dissolvant 2 mg du β -carotène dans 10 ml du chloroforme. 1 ml de cette solution est mis dans un ballon de verre avec 20 mg de l'acide linoléique et 200 mg du Tween 40. Après agitation, le chloroforme est évaporé en utilisant un évaporateur rotatif à 50°C et 50 ml d'eau distillé sont ensuite ajoutés tout en agitant vigoureusement. L'émulsion obtenue a été fraîchement préparée avant chaque expérience. 5 ml de cette émulsion sont transférés dans des tubes contenant 0,2 ml de différentes concentrations des huiles essentielles (1,25-10 μ l/ml) dans de l'éthanol. Après agitation à l'aide d'un vortex, l'absorbance est immédiatement mesurée à 470 nm ($t = 0$) contre un blanc constitué du même mélange sans β -carotène. Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 50°C. Après 120 min d'incubation, l'absorbance est mesurée de nouveau. Le BHT est utilisé comme contrôle positif. Les tests sont faits en triple.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition en référence au contrôle selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d' inhibition} = [(A_{\text{test}(120)} - A_{\text{control}(120)}) / (A_{\text{control}(0)} - A_{\text{test}(120)})] \times 100$$

Avec:

$A_{\text{control}(120)}$ est l'absorbance de la réaction contrôle à $t = 120$ min.

$A_{\text{control}(0)}$ est l'absorbance de la réaction contrôle à $t = 0$ min.

$A_{\text{test}(120)}$ est l'absorbance du produit à tester à $t = 120$ min.

4.3. Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles a été déterminé selon la méthode d'Oyaizu (Oyaizu, 1986). Ce test est basé sur la réduction de Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation de la puissance de la réduction des produits testés. 1ml de la dilution des huiles essentielles (1,25-10 μ l/ml) dans de l'éthanol est mélangé avec 2,5 ml du tampon phosphate (0.2 M; pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferrocyanure de potassium à 1%. Le mélange est incubé pendant 20 min dans un bain marie à 50°C. Ensuite, 2,5 ml de l'acide trichloracétique à 10% est ajouté au mélange pour stopper la réaction. Après centrifugation à 3000 tours/min pour 10 min, 2,5 ml du surnagent est mélangé avec 2,5 ml de l'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure ferrique à 0,5%. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Le BHT est utilisé comme antioxydant standard et l'éthanol comme contrôle négatif. Les tests sont effectués en triple.

5. Etude du mode d'action des huiles essentielles

L'objectif de cette partie est l'évaluation des dommages induits par les huiles essentielles au niveau des cellules bactériennes. Il s'agit d'étudier les effets de ces huiles sur la fluidité membranaire ainsi que sur la viabilité et l'état physiologique de deux souches : *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* CECT 471.

5.1. Etude de la fluidité membranaire des bactéries par spectrofluorimétrie après contact avec les huiles essentielles

Le terme «fluide» est employé car les phospholipides et les protéines membranaires peuvent bouger dans le plan de la membrane. Le terme de fluidité membranaire englobe le type et le positionnement des lipides contenus dans cette membrane. Des changements de fluidité de la membrane peuvent se produire après différentes interactions entre les lipides membranaires et divers facteurs de stress de l'environnement.

5.1.1. L'équipement utilisé

La polarisation de fluorescence (anisotropie de fluorescence) est utilisée pour l'étude des changements de fluidité des membranes. L'analyse de la polarisation de fluorescence est réalisée en utilisant des sondes ou marqueurs fluorescents capables de s'insérer dans la membrane. Elle est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre équipé de polariseurs. C'est une méthode de détection de la lumière émise par des fluorochromes. La source de lumière est une lumière UV le plus souvent une lampe au Xénon de 75 à 150 W. Cette lampe produit une longueur d'onde d'excitation qui est polarisée verticalement avant d'entrer dans la cuve de mesure. L'intensité d'émission de la lumière qui passe à travers l'échantillon est ensuite collectée par un ou deux polariseurs d'émission qui dans le dernier cas sont orientés soit verticalement, soit horizontalement (chadeau, 2011). La lumière est ensuite transmise grâce à un photomultiplicateur et enregistrée via un ordinateur. L'anisotropie représente une intensité directionnelle émise par le marqueur. Cette anisotropie (r) est calculée de la manière suivante:

$$r = \frac{I_{vv} - (GF \cdot I_{vh})}{I_{vv} + (2 \cdot GF \cdot I_{vh})}$$

Où:

- G correspond au facteur correctif instrumental,

- I_{vv} correspond à l'intensité d'émission transmise par la direction verticale,
- I_{vh} correspond à l'intensité d'émission transmise par la direction horizontale lorsque le faisceau d'excitation est orienté verticalement.

Le rapport entre la polarisation de la sonde et la fluidité de la membrane cytoplasmique est inverse. Quand la fluidité de la membrane cytoplasmique diminue, la valeur de polarisation augmente et inversement.

5.1.2. Les marqueurs utilisés

Les sondes fluorescentes utilisées pour l'étude de la fluidité des membranes sont des marqueurs qui se localisent spécifiquement dans les doubles couches lipidiques membranaires. Elles sont sensibles aux altérations de la fluidité membranaire dues aux modifications structurales des lipides. Dans cette étude, deux marqueurs fluorochromes sont utilisés: le DPH (1,6-diphényl-1,3,5-héxatriène) et son homologue le TMA-DPH (1-[4-(triméthyl-amino)-phényl]-6-phénylhexa-1,3,5-triène). Le DPH est un marqueur très hydrophobe, symétrique qui pénètre dans la région hydrophobe de la membrane et s'oriente parallèlement à la chaîne de phospholipides (Mykytczuk et *al.*, 2007). Le TMA-DPH est un marqueur amphiphile, qui s'insère en surface de la membrane plasmique, entre les têtes hydrophiles des phospholipides en contact avec le milieu extérieur. Ils possèdent une intensité d'émission et d'excitation similaire, ce qui rend leur utilisation pratique. Une fois insérés dans la bicouche lipidique, l'interaction avec les chaînes acylées des lipides membranaires peut gêner leur mouvement de rotation et affecter la dépolarisation de la lumière d'excitation. C'est ce phénomène, impliquant une modification de l'anisotropie, qui nous indique une altération de la fluidité membranaire.

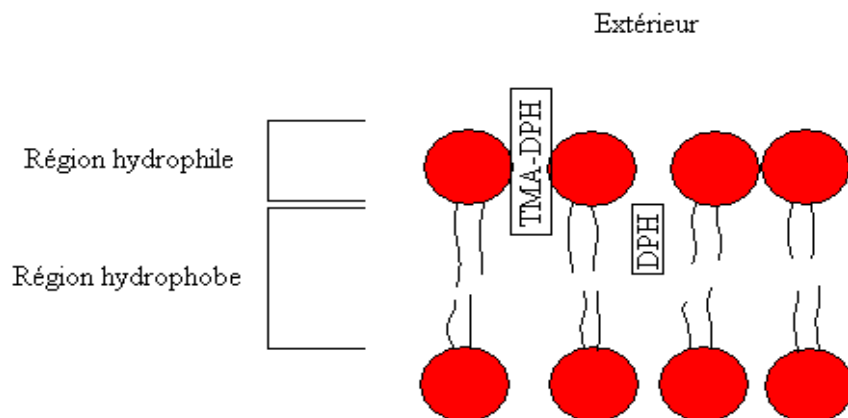


Figure 11. Positionnement des sondes DPH et TMA-DPH dans la bicouche phospholipidique (Trevors, 2003).

5.1.3. Méthodologie

Le DPH est préparé dans du tétrahydrofurane et le TMA-DPH dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration de 2 mM/l. Les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* CECT 471 d'une culture de 16 h ont été lavées trois fois avec du tampon d'anisotropie (pH 7,6) en réalisant 3 centrifugations de 15 minutes de 10.000g à 4°C. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans le même tampon et la concentration est ajustée à la $DO_{600} = 0,25$. 2,4 ml de la suspension microbienne réalisée et 0,6ml du Tween 80 (0,5% v/v) sont mises dans des cuves en quartz pour avoir une DO_{600} finale de 0,2; soit environ 10^8 UFC/ml. Trois microlitres du DPH ou du TMA-DPH sont ensuite ajoutés à l'aide d'une micro-seringue. Les cellules sont mises en contact pendant 7 min avec le TMA-DPH et 30 min avec le DPH à l'obscurité avec agitation magnétique et à la température adéquate pour chaque souche.

Une première lecture est réalisée avant l'ajout de l'agent antimicrobien. L'huile essentielle a été ajoutée à deux concentrations (CMI et $\frac{1}{2}$ CMI) dans les cuves test juste avant la seconde lecture et des mesures d'anisotropie de fluorescence du DPH ou du TMA-DPH sont ensuite réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre LS 55 (Perkin Elmer, France). Une mesure d'anisotropie de fluorescence est réalisée pour chaque cuve toutes les 20 minutes pendant 280 min. La moyenne des mesures a été faite sur deux répétitions. Les conditions de mesures qui ont été employées au cours des manipulations sont les suivantes:

- Longueur d'onde d'excitation : 350 nm
- Longueur d'onde d'émission : 420 nm
- Temps d'intégration: 50 s.
- Agitation magnétique lente en continu.

5.2. Etude de la viabilité et de l'état physiologique des bactéries par microscopie à épifluorescence

5.2.1. Principe du microscope à épifluorescence

L'exposition des cellules bactériennes à différents stress peut entraîner la formation de cellules viables mais non cultivables (VNC) qui peuvent causer des problèmes de contamination en industries agro-alimentaires (Oliver, 2005). Les bactéries VNC sont définies comme des bactéries incapables de se multiplier sur les milieux de culture conventionnels mais ayant néanmoins conservées une activité métabolique (Yamamoto,

2000). Cet état ne peut pas être détecté par les méthodes classiques de dénombrement. L'utilisation de marqueurs de viabilité fluorescents permet de mettre en évidence les différents états physiologiques des bactéries (viables, viables non cultivable et mortes).

La microscopie à épifluorescence est une méthode de détection directe des micro-organismes. Elle permet après filtration et coloration, un examen microscopique et un dénombrement des bactéries présentes dans un échantillon. La coloration se fait grâce à l'utilisation de fluorochromes spécifiques se fixant sur les bactéries et l'examen microscopique se réalise sous lumière UV (Chadeau, 2011). Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation (excitation de l'échantillon), d'un miroir dichroïque (qui réfléchit les rayons de courtes longueurs d'onde correspondant à l'excitation et transmet les plus grandes longueurs d'onde) et d'un filtre d'émission (qui bloque la lumière d'excitation parasite résiduelle et laisse passer la fluorescence).

5.2.2. Principe du kit Live/Dead® BacLight™

La coloration avec le Kit Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability peut être utilisée pour estimer les bactéries viables, mortes et les bactéries totales d'un échantillon. Ce kit est composé de deux fluorochromes : le SYTO 9 et l'Iodure de Propidium (IP) qui sont des marqueurs des acides nucléiques mais qui diffèrent en leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer dans la cellule. Les deux colorants sont contenus dans une solution d'anhydride de diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Boulos et *al.*, 1999). Le SYTO 9 est un fluorochrome capable de pénétrer toutes les cellules quel que soit leur état physiologique puis de se fixer aux acides nucléiques et colorer les cellules en vert. Ainsi, il peut être utilisé pour le marquage et le dénombrement de la totalité des cellules présentes dans un échantillon donné (Chadeau, 2011). L'IP permet de distinguer les cellules mortes des cellules viables. Il est capable de pénétrer uniquement les bactéries dont la membrane cytoplasmique est endommagée pour se fixer aux acides nucléiques et colorer ainsi les cellules en rouge (Figure 12).

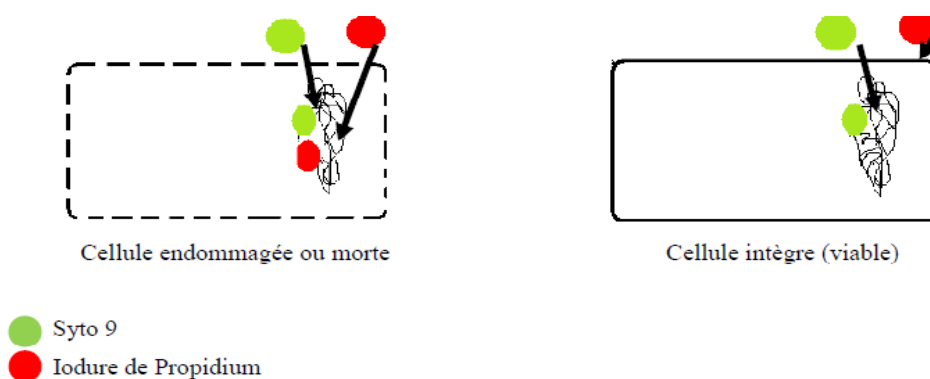


Figure 12. Mode de fonctionnement des 2 fluorochromes du kit Live/Dead[®] BacLight[™]. (Chadeau, 2011).

5.2.3. Méthodologie

Selon les indications du Kit, 1,5 ml de cellules bactériennes (culture de 16 h) de *L. innocua* LRGIA 01 ou *E. coli* CECT 471 ajustées à une concentration de 10^6 UFC/ml du milieu TSB à 0,5% (v/v) du Tween 80 sont mises en contact avec deux concentrations en huiles essentielles (CMI et la $\frac{1}{2}$ CMI) dans un tube eppendorf de 2 ml et sont par suite incubées à 30°C pour *L. innocua* et 37°C pour *E. coli* pour 0, 6 et 24 h. En parallèle, un témoin sans huile essentielle est incubé dans les mêmes conditions. Un millilitre de ces suspensions bactériennes en présence d'huiles essentielles ou non a ensuite été prélevé puis placé en présence de marqueurs (Syto 9 et IP) selon la Figure 13. L'observation des cellules se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence Axiovert 25 CFL (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) équipé d'une lampe UV et d'un objectif de grossissement x 100 et couplé à un appareil photo numérique (ZEISS). Au minimum 10 champs différents ont été photographiés.

Matériel et méthodes

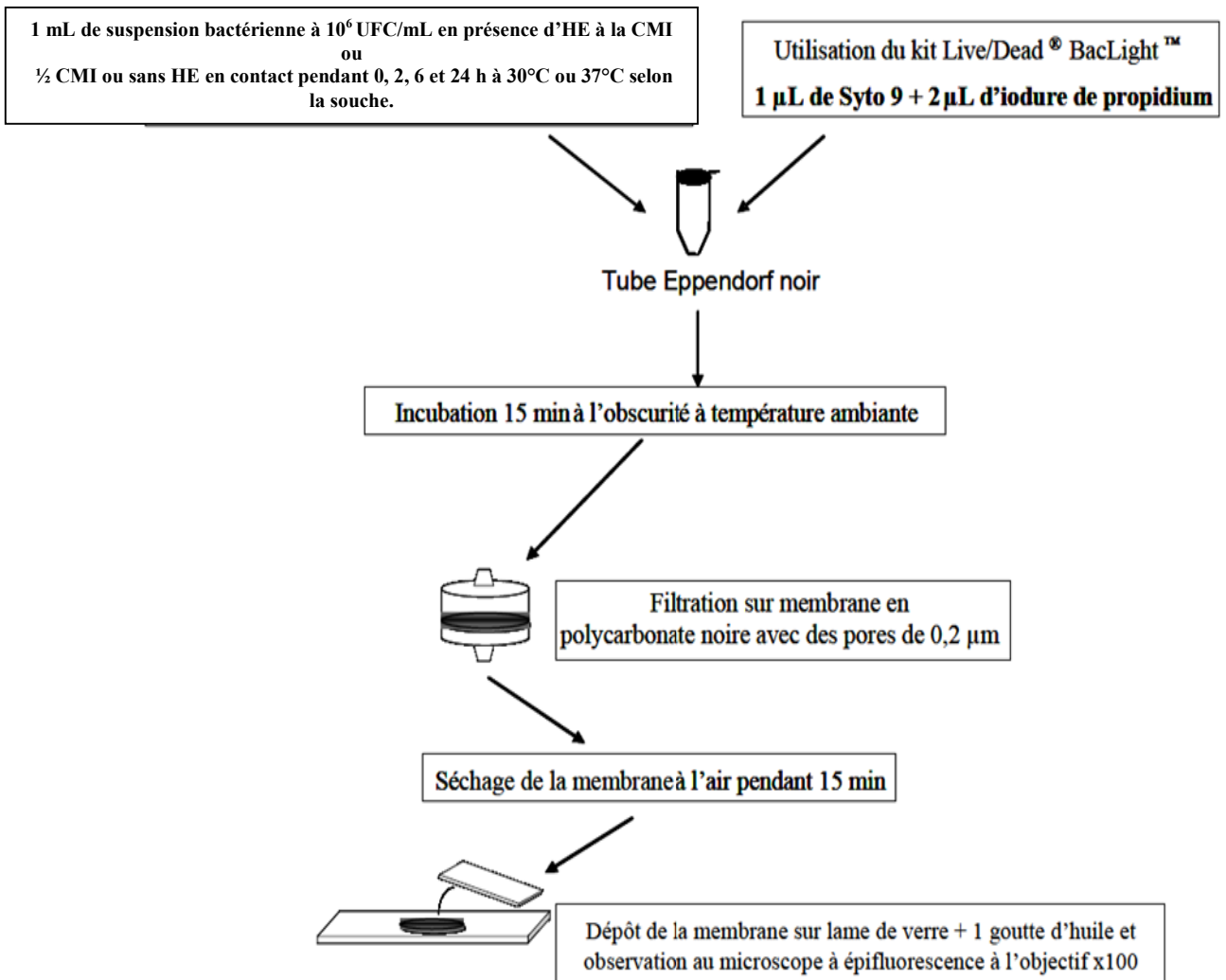


Figure 13. Protocole de coloration des cellules pour l'étude de leur viabilité après contact avec l'huile essentielle en milieu liquide (utilisation du kit Live/Dead[®] BacLight[™], Invitrogen, France) (Chadeau, 2011).

Le nombre des bactéries viables (vertes) et le nombre de bactéries mortes (rouges) a été déterminé en appliquant la formule suivante:

$$\text{Log (Nb de bactéries/ml)} = (\log \text{Nb de bactéries observées/nb de champs}) * S/S'$$

Avec:

- Nb bactéries observées : Nombre de bactéries dénombrées sur la totalité des champs observés.
- Nb champs : Nombre de champs observés.
- S : Surface de la membrane de filtration (491 mm²).
- S' : Surface du champ microscopique (0,012 mm²).

En parallèle, un dénombrement des cellules cultivables sur milieu TSA a été réalisé dans le but de mettre en évidence la présence éventuelle de cellules viables non cultivables (VNC) après contact avec l'huile essentielle et pour comparer les deux méthodes de dénombrements.

6. Evaluation de l'inactivation microbienne à travers les processus de conservation combinés

La combinaison de processus de conservation et des huiles essentielles peut avoir des effets additifs quand le niveau d'inactivation atteint est égal à l'addition des effets des deux traitements agissant séparément. Alors que les effets synergétiques sont obtenus lorsque les effets létaux du processus combiné sont significativement supérieurs à la somme obtenue en appliquant les deux traitements séparément.

6.1. Obtention des suspensions microbiennes

Dans cette partie, on s'est limité à l'étude de deux microorganismes représentatifs du groupe des bactéries Gram positives (*L. monocytogenes* EGD-e) et du groupe des bactéries Gram négatives (*E.coli* O157: H7). A partir de cryotubes conservés à -80°C , des boîtes de gélose de TSA-YE (TSA supplémenté de 0,6% de l'extrait de levure) ont étéensemencées en stries et incubées à température appropriée. Une préculture est préparée en inoculant 5ml du milieu TSB-YE par une colonie isolée de la culture précédente. Après incubation, on ensemence 50 ml du milieu TSB-YE par 1ml de la préculture. Les flacons sont immédiatement transférés dans une étuve équipée d'un agitateur à 135 rpm pour 18 h à température appropriée (30°C pour *L.monocytogenes* et 37°C pour *E. coli*) jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance (Figure 14).

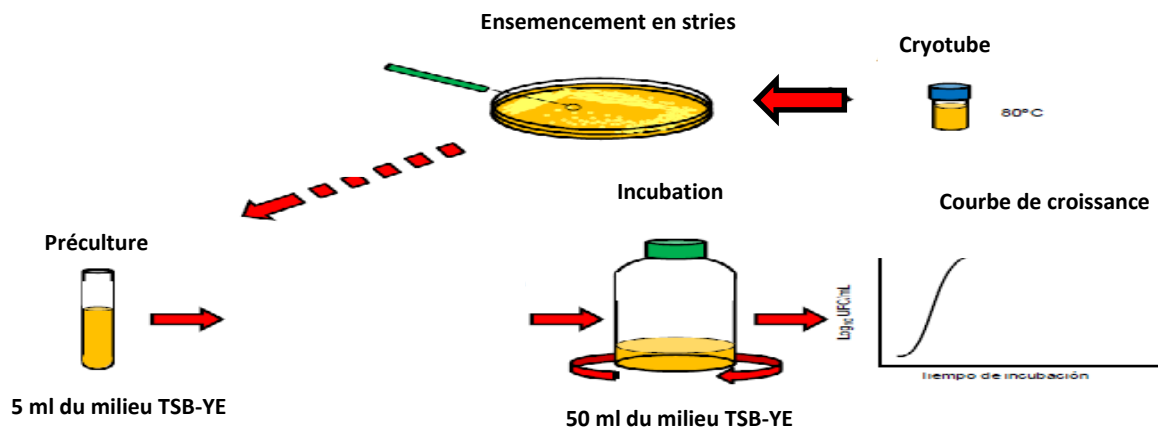


Figure 14. Procédure de mise en culture des souches.

6.2. Evaluation de l'inactivation microbienne en présence de faibles doses en huiles essentielles

Des cellules de *L. monocytogenes* EGD-e et *E. coli* O157:H7 en phase stationnaire de croissance sont ajoutés à des tubes de 5ml du tampon McIlvain (citrate-phosphate) à pH 4,0 ou 7,0 de façon à avoir une concentration finale de $1-3 \times 10^7$ UFC/ml. Les huiles essentielles sont ensuite ajoutées à une concentration de 0,2 µl/ml. Après une agitation vigoureuse de 2 min au vortex, les tubes sont incubés à température ambiante pendant 24 h. Le pH du milieu de traitement reste inchangé après l'addition des huiles essentielles. Des échantillons sont prélevés après 10 min et 24 h de contact, et les cellules survivantes ont été dénombrées comme décrit dans la partie correspondante.

6.3. Evaluation de l'inactivation microbienne par le traitement thermique modéré en combinaison avec les huiles essentielles

Un traitement thermique modéré à 54°C pendant 10 min en combinaison avec une concentration faible en huiles essentielles (0,2 µl/ml) a été choisi pour l'étude de son effet létale sur l'inactivation de *L. monocytogenes* EGD-e et *E. coli* O157:H7. Les traitements thermiques ont été effectués dans un bain thermostatique (mod. Digiterm 100, Selecta). Le contrôle de la température au cours des expériences est réalisé par une sonde et la vitesse d'agitation a été fixée à 130 rpm durant toutes les expérimentations.

Des tubes à essai contenant 5ml du tampon citrate-phosphate à pH 4,0 ou 7,0 avec ajout ou non de 0,2 µl/ml des huiles essentielles sont placés dans le bain thermostatique sous agitation. Une fois la température de traitement adéquate est atteinte, les suspensions microbiennes sont ajoutées à une concentration finale de 10^7 UFC/ml. Après 10 min de traitement à 54°C, des échantillons sont prélevés pour l'évaluation du nombre des cellules vivantes et des cellules endommagées comme décrit dans la partie correspondante. Tous les tests ont été réalisés en triple.

6.4. Evaluation de l'inactivation microbienne par le champ électrique pulsé à haute intensité en combinaison avec les huiles essentielles

Une description de l'équipement du champ électrique pulsé de haute intensité utilisé dans cette investigation est nécessaire (Figure 15). Les principales composantes de cet équipement de signal exponentiel sont les suivantes :

- Générateur de courant électrique continu (mod. FUG, HCK 2500M 35000; Rosenheim, Allemagne).

- Un assemblage de 10 condensateurs (mod. Behlke, C-20C682, Kronberg, Allemagne). Leur fonction est de stocker l'énergie électrique qui va se décharger dans la chambre de traitement à travers l'interrupteur.

- Générateur de fonction (mod. Tektronix, AGF 320, Wilsonville, UA). Il régule l'ouverture et la fermeture de l'interrupteur. Le circuit peut générer des impulsions d'ondes exponentielles à différentes fréquences (1-60 Hz) et de champs électriques (1-40 kV / cm).

- Chambre de traitement : elle contient le produit durant l'application du traitement. Cette chambre se compose de deux électrodes cylindriques d'une superficie de $2,01\text{cm}^2$ d'acier inoxydable séparées par un tube creux en plastique. L'intensité du champ électrique dans la chambre de traitement doit être aussi uniforme que possible afin d'éviter la présence d'air ce qui peut faciliter la formation de bulles pendant le traitement. Le tube en plastique séparant les électrodes possède un petit trou à travers lequel on introduit et on retire l'échantillon.

- Sonde de haute tension (mod. Tektronix P6015A) mesurant la tension appliquée entre les électrodes de la chambre de traitement et elle est reliée à un oscilloscope enregistrant l'impulsion appliquée.

- Un ordinateur qui contrôle et enregistre les traitements à travers le logiciel TestPoint (CEC, Boston, USA).



Figure 15. Equipement du champ électrique pulsé utilisé dans cette investigation.

Avant le traitement, les cellules sont centrifugées à 6000 g durant 5 min. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans le même volume de milieu de traitement (tampon citrate-phosphate à pH 4,0 ou 7,0) ajusté à une conductivité de 2,0 mS/cm, pour obtenir une concentration bactérienne initiale de $1-3 \times 10^7$ UFC/ml. Ensuite, les huiles essentielles sont ajoutées ou non à une concentration de 0,2 μ l/ml. 0,5ml de ces suspensions est mise dans la chambre de traitement (Figure 16) à l'aide d'une seringue stérile. Des impulsions de forme d'onde exponentielle à une intensité de 30 Kv/cm, d'une fréquence de 1Hz, durant 25 impulsions de 2 μ s de durée et d'une énergie spécifique de 5,2 Kj/Kg sont appliquées. La température des échantillons reste inférieure à 35°C. Après les traitements, le nombre de cellules survivantes et endommagées est évalué comme décrit dans la partie correspondante. Tous les tests sont réalisés en triple.

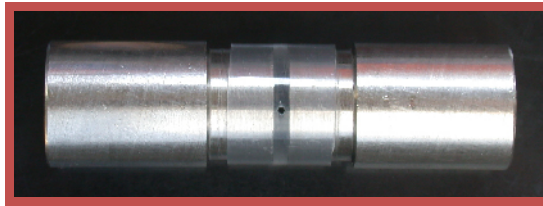


Figure 16. Photo représentative d'une chambre de traitement.

6.5. Evaluation de l'inactivation microbienne par les hautes pressions hydrostatiques en combinaison avec les huiles essentielles

L'équipement des hautes pressions hydrostatiques (mod. S-FL-850-09-W; Stansted Fluid Power, UK) est composé des parties principales suivantes (Figure 17):

- Chambre de pressurisation de 37 mm de diamètre et 300 mm de longueur avec une capacité de 300 ml dans laquelle sont mis les échantillons pour l'application du traitement HPH.
- Un mélange de glycol-eau (30:70) est utilisé comme fluide de transmission de la pression.
- L'équipement HPH est connecté à un système externe de régulation de la température qui refroidit le fluide de transmission de la pression.
- Un panneau de commande qui permet de sélectionner et contrôler les paramètres du traitement.



Figure 17. Equipement des hautes pressions hydrostatiques.

Avant traitement, les cellules sont centrifugées à 6000g durant 5 min. Le culot est remis en suspension dans du tampon citrate-phosphate à pH 4,0 ou 7,0 pour avoir une concentration microbienne finale approximative de 10^7 UFC/ml. Ensuite, les huiles essentielles ont été ajoutées ou non à une concentration de 0,2 μ l/ml. 1ml de chaque suspension préparée est mis dans des sacs en plastique stériles pour la pressurisation. Les conditions du traitement HPH appliquées aux souches bactériennes sont résumées dans le tableau 6. Après décompression, on procède à l'évaluation du nombre de cellules survivantes et endommagées comme décrit dans la partie correspondante. Tous les tests sont réalisés en triple.

Tableau 6. Les conditions d'application du traitement HPH.

Microorganismes	pH du milieu du traitement	Conditions du traitement appliqué
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e	pH 4,0	175 MPa, 20 min
	pH 7,0	325 MPa, 20 min
<i>E. coli</i> O157:H7	pH 4,0	400 MPa, 20 min
	pH 7,0	400 MPa, 20 min

6.6. Incubation et dénombrement des cellules survivantes

Une fois que les différents traitements sont appliqués comme décrits précédemment, les échantillons sont dilués dans de l'eau peptonnée à 0,1% (w/v). Ensuite, 0,1ml sont ensemencés en masse dans la gélose TSA-YE. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C dans le cas de *E. coli* O157:H7 et à 30°C dans le cas de *L. monocytogenes* EGD-e pendant 24 h. Après incubation, les dénombrements sont réalisés avec un compteur de colonies automatique (mod. Protos, Analytical Systems, UK). Pour le comptage des cellules

vivantes après traitement aux HPH, les échantillons sont dilués dans du MRD (diluant de récupération maximale) et 0,02 ml sont ensemencés en surface sur gélose TSA-YE. De la même façon, le comptage est réalisé à l'aide d'un compteur automatique de colonies.

6.7. Evaluation de la présence de dommages sublétaux

Le nombre des cellules endommagées sub-létalement est estimé à partir de la différence entre le nombre de cellules survivantes après l'ensemencement des cellules traitées dans un milieu non sélectif et d'autres sélectifs.

Pour la détermination de la présence de dommages sub-létaux au niveau de la membrane cytoplasmique, on utilise un milieu sélectif en ajoutant le NaCl à une concentration maximale non inhibitrice adapté à chaque microorganisme. Cette concentration maximale est de 6% pour *L.monocytogenes* EDG-e et de 3% pour *E. coli* O157: H7. Alors que pour la détermination de la présence de dommages sub-létaux au niveau de la membrane externe de *E. coli* O157: H7, on utilise un milieu sélectif en ajoutant 0,35% de sels biliaires. Les boîtes ensemencées sont incubées à une température appropriée pour 48 h.

7. Etude de l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*

Dans cette dernière partie d'investigation, l'effet de l'huile essentielle de *L. nobilis* à une concentration égale à la valeur de la CMI (déjà déterminée auparavant : 8 µl/ml) sur la décontamination d'un biofilm de *L. innocua* LRGIA 01 formé sur un support solide en acier inoxydable est étudié.

7.1. Préparation des supports solides et protocole de nettoyage

Les supports solides utilisés dans cette étude sont des aciers inoxydables carrés du type AISI 304 L. (surface lisse), fournis par la société CHALON MEGARD (Montréal-la-cluse-France) d'une surface de 50 mm² × 50 mm².

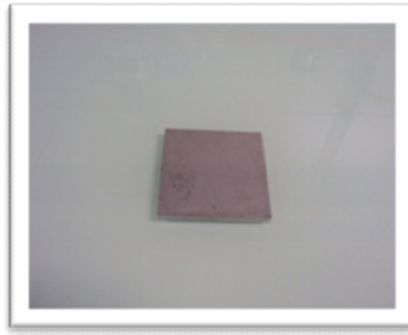


Figure 18. Support solide d'acier inoxydable.

Pour préserver les propriétés initiales des supports solides, la procédure de nettoyage suivante a été réalisée:

-Immersion dans une solution ayant une action détergente et désinfectante, le RBS35 (Chemical products R. Borghraefs.a, Bruxelles) à 2% v/v dans de l'eau distillée à 50°C sous agitation douce pendant 10 min.

- 5 rinçages de 5 minutes chacun avec de l'eau distillée à 50°C.

- 5 rinçages de 5 minutes chacun avec de l'eau distillée à température ambiante.

Les supports solides ont été utilisés immédiatement après nettoyage ou stockés dans un récipient stérile contenant de l'eau distillée stérile pendant 24 h au maximum.

7.2. Adhésion et formation de biofilms

Une culture de 16 h (50 ml) de *L.innocua* LRGIA 01 (à une concentration de 10^8 UFC/ml) a été ajoutée à 500 ml de milieu TSB dilué au 1/20 avec de l'eau distillée stérile. Ce mélange a été versé sur des coupons d'acier inoxydable déposés dans un cristalliseur stérile. Le cristalliseur a été couvert avec du papier aluminium et incubé à 30°C pendant 6h (phase d'adhésion) ou 48h (biofilm mature). Dans le cas du biofilm mature et après 24h d'incubation, les coupons ont été retirés du cristalliseur et immergés trois fois dans une solution de TS (Tryptone soy) pour éliminer les bactéries non adhérentes. Les coupons ont été de nouveau placés dans un cristalliseur stérile et recouverts de 500 ml de milieu TSB dilué au 1/20 avec de l'eau distillé stérile, puis incubés à 30°C pour atteindre les 48 h d'incubation.

7.3. Traitement des cellules adhérees avec l'huile essentielle de *L. nobilis*

Les coupons ont été immergés trois fois dans une solution de TS (Tryptone soy) afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Ensuite, ils ont été recouverts de 5 ml de la solution désinfectante test (à base d'huile essentielle) ou contrôle. La solution désinfectante test est composée de 0,5% (v/v) de NaOH, 0,5% (v/v) de Tween 80 et l'huile essentielle de *L. nobilis* à la concentration égale à la valeur de CMI (8 µl/ml). La solution contrôle est de la même composition mais sans ajout de l'huile essentielle. Deux temps de traitement ont été étudiés : 10 min et 30 min. Les temps de traitement ont été choisis en considérant le temps d'utilisation des solutions désinfectantes dans les industries agro-alimentaires. Après traitement, les coupons ont été immergés deux fois dans une solution de TS afin d'éliminer la solution désinfectante et les cellules décrochées.

7.4. Dénombrement des cellules bactériennes adhérees

Afin de dénombrer les cellules viables cultivables de *L. innocua* LRGIA01 après traitement des cellules adhérees aux coupons d'acier inoxydable, la technique de décrochage aux ultrasons a été utilisée. Le décrochage par ultrasons est réalisé avec un générateur d'ultrasons (40 kHz) connecté à une sonotrode d'un diamètre de 15 mm et à une chambre de prélèvement en acier inoxydable (Figure 19).

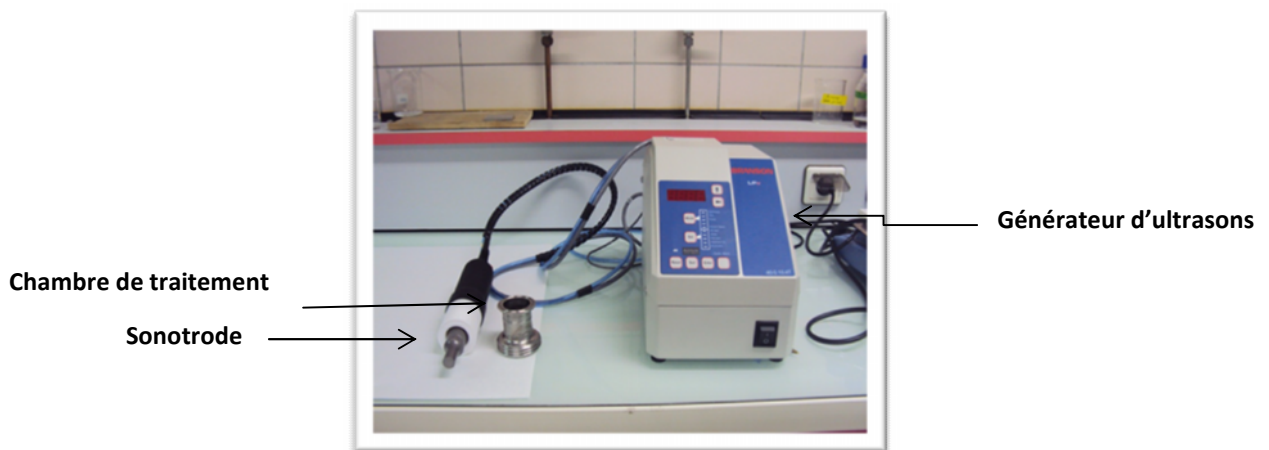


Figure 19. Appareil à ultrasons

Les ultrasons ont été délivrés pendant 10 secondes dans la chambre de prélèvement, préalablement remplie avec 15 ml d'une solution stérile de Ringer. Après décrochage, des dilutions décimales ont été réalisées dans du TS. 100 µL de chaque dilution sont inoculés

Matériel et méthodes

sur milieu TSA, puis incubés à 30°C pendant 24 h et le nombre des cellules survivantes ont été dénombrées.

Résultats

Chapitre 1: Analyse de la composition chimique et de l'activité antioxydante des huiles essentielles.

1. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des cinq huiles essentielles étudiées (*Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas*, *Satureja calamintha* Scheele, *Laurus nobilis* et *Myrtus communis*) a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) conformément aux indices de Kovats et en comparant avec la littérature et avec les données de la bibliothèque NIST MS research (v.6).

Le tableau 7 représente les différents constituants chimiques identifiés des huiles essentielles. Les composés fondamentaux et majoritaires apparaissent en gras. L'analyse chimique a permis l'identification de 66 composés différents dans l'ensemble des huiles essentielles. En particulier, 5 composés ont été identifiés dans *M. communis*, 25 composés dans *L. nobilis*, 8 composés dans *M. pulegium*, 21 composés dans *S. calamintha* Scheele et 21 composés dans *L. stoechas*. Un totale de 97,21%, 83,38%, 99,9%, 82,54% et 99,97% des constituants a été identifiés dans les huiles essentielles de *M. pulegium*, *S. calamintha*, *L. stoechas*, *L. nobilis* et *M. communis* respectivement. On observe que toutes les huiles essentielles analysées étaient riches en composés monoterpéniques à l'exception de *L. stoechas* qui était riche en composés sesquiterpéniques. Cependant la proportion des monoterpènes hydrocarbures et des monoterpènes oxygénés est différente d'une huile essentielle à une autre. L'huile essentielle de *M. pulegium* contient 86,4% des monoterpènes dominés par des monoterpènes oxygénés (68,47%) par rapport à 17,93% des monoterpènes hydrocarbures. Les sesquiterpènes présents dans cette huile sont de 10,81% avec 5,58% des hydrocarbures et 5,23% des oxygénés. Le pulégone (33,65%) a été identifié comme le composé fondamentale de cette huile essentielle, en plus de l'acétate d' α -Terpinenyl (24,29%), Bicyclo[3.1.0] hexane,6-isopropylidene-1-methyl- (12,59%), 1,8-cineole (10,53%), α -Humulène (5,58%) et α -pinène (5,34%).

L'huile essentielle de *S. calamintha* est composée de 75,54% de monoterpènes avec une prédominance des monoterpènes hydrocarbures (61,92%) par rapport aux oxygénés (13,53%). Les sesquiterpènes présents dans cette huile sont de 7,93% avec 6,62% des hydrocarbures et 1,31% des oxygénés. Le 1,8-Cineole (42,94%) est le composé fondamental, en plus de β -phellandrène (11,39%), pinocamphone (9,88%), Cis-isopulegone (2,58%) et menthone (2,28%) comme composés majoritaires.

Résultats

Tableau 7. Composition chimique (en %) des différents composés identifiés dans les cinq huiles essentielles étudiées.

N°	Composés	TR ^a	Concentration (%)				
			<i>Mentha pulegium</i>	<i>Satureja calamintha Scheele</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>
1	α -phellandrene	7,88	-	0,11	-	-	-
2	Cis-ocimene	8,17	-	-	-	3,06	-
3	α -pinene	8,28	5,34	1,73	-	-	16,52
4	Santolinatriene	8,51	-	0,11	-	-	-
5	β -phellandrene	9,48	-	11,39	-	-	-
6	5-tetradecen-3yne, (E)-	10,12	-	-	-	0,28	-
7	Trans-sabinene hydrate	10,14	-	-	-	0,39	-
8	Sabinene	10,16	-	0,48	-	6,17	-
9	1,8-Cineole	11,63	10,53	42,94	2,70	39,81	26,93
10	Trans-sabinene	12,74	-	0,35	-	-	-
11	D-Fenchone	13,65	-	-	3,06	-	-
12	Trans-ocimene	14,21	-	-	-	7,05	-
13	Isomenthone	15,80	-	0,4	-	-	-
14	α -Terpinenylacetate	15,90	24,29	-	-	-	-
15	Menthone	16,13	-	2,28	-	-	-
16	β -fenchone	16,28	-	1,26	-	-	-
17	Pinocamphone	16,45	-	9,88	-	-	-
18	Laevo-menthol	16,86	-	0,33	-	-	-
19	α -terpineol	17,15	-	0,43	-	-	-
20	Benzenemethanol, à,3,5-trimethyl-	17,25	-	-	3,74	-	-
21	Myrtenol	17,32	-	1,82	-	0,39	-
22	Fenchylacetate	18,37	-	-	1,28	-	-
23	Cis-isopulegone	18,77	-	2,58	-	-	-
24	Pulegone	19,01	33,65	-	-	-	-
25	β -pinene	19,84	-	-	-	2,43	-
26	7-propylidenenorcarane	20,44	-	-	1,26	-	-
27	3-carene	20,54	-	-	-	0,21	-
28	Exobornylacetate	20,60	-	-	4,45	-	-
29	(10)-Caren-4-ol, acetoacetic acid ester	20,85	-	-	1,63	-	-
30	α -Terpinene	21,20	-	-	2,90	-	-
31	D-camphene	21,67	-	-	-	0,55	-
32	Bicyclo[3.1.0]hexane, 6-isopropylidene-1-methyl-(CAS)	21,70	12,59	-	-	-	-
33	Myrtenylacetate	21,97	-	-	4,96	-	49,27
34	2-carene	22,64	-	-	-	13,08	-
35	Delta-elemene	23,33	-	-	-	0,14	-
36	(+)-cyclosativene	23,17	-	-	4,53	-	-
37	β -bourbonene	23,62	-	0,19	-	-	-
38	Camphene	23,83	-	-	-	-	2,45
39	Gamma-elemene	24,04	-	-	-	1	-
40	Methyleugenol	24,50	-	-	6,19	1,06	4,8
41	Trans-caryophyllene	24,83	-	-	-	2,74	-
42	Caryophyllene	24,88	2,93	1,79	-	-	-
43	Seychellene	25,89	-	-	-	0,38	-
44	α -Humulene	25,94	5,58	-	-	-	-
45	Cis-farnesol	26,12	-	-	-	0,18	-
46	Germacrene D	26,58	-	1,93	-	-	-
47	α -himachalene	26,81	-	-	-	0,17	-
48	Patchoulene	26,95	-	-	-	0,10	-
49	Gamma-gurjunene	27,05	-	2,07	-	0,36	-
50	1H-Cyclopropa[a]naphthalene, decahydro-1,1,3a-trimethyl-7-methylene-, [1aS-(1aà,3aà,7aà,7bà)]=	27,22	-	-	1,72	-	-
51	Junipene	27,49	-	-	-	0,24	-

Résultats

Suite du tableau 7.

N°	Composés	TR ^a	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Satureja calamintha Scheele</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>
Concentration (% peak area)							
52	δ-Cadinene	28,05	-	-	5,31	-	-
53	Trans-methylisoeugenol	28,54	-	-	-	0,84	-
54	α-Calacorene	28,62	-	-	2,79	-	-
55	Spathulenol	29,04	-	1,09	-	-	-
56	4a,8b,10b,11a-Tetramethylbicyclo[6.3.0]undec-1-en-5-one	29,45	-	-	1,51	-	-
57	Methylisoeugenol	29,74	-	-	-	1,33	-
58	Iso-velleral	29,87	-	-	3,57	-	-
59	10s,11s-Himachala-3(12),4-diene	30,03	-	-	23,62	-	-
60	(-)-Caryophylleneoxide	30,05	2,3	-	-	-	-
61	α-murolool	30,16	-	0,22	-	-	-
62	longicamphor	30,18	-	-	2,5	-	-
63	Cubanol	30,37	-	-	16,19	-	-
64	β-Guaiene	31,06	-	-	1,94	-	-
65	α-Guaiene	31,41	-	-	4,14	0,41	-
66	Endrine	40,48	-	-	-	0,16	-
Monoterpènes			86,4	75,54	18,62	73,74	95,17
Sesquiterpènes			10,81	7,93	66,1	5,72	-
Autres			-	-	15,57	3,67	4,8
Totale des composés identifiés			97,21	83,38	99,99	82,54	99,97

^a Temps de rétention.

La composition de l'huile essentielle de *L. nobilis* est caractérisée principalement par la présence des monoterpènes (73,14%) avec un faible pourcentage en sesquiterpènes (5,72%). Parmi les monoterpènes, 32,55% sont des hydrocarbures et 40,59% sont des oxygénés. Le composant fondamental est le 1,8-cineole avec une proportion de 39,81%. En plus, cette huile contient en moindre concentration le 2-carene (13,08%), trans-ocimène (7,05%), sabinène (6,17%) et trans-caryophyllène (2,74%).

L'huile essentielle de *M. communis* est aussi prédominée par la fraction monoterpénique (95,17%) avec absence de composés sesquiterpéniques et dont les monoterpènes oxygénés représentent la plus grande proportion (76,02%) par rapport aux hydrocarbures (18,97%). Le composant fondamental de cette huile est l'acétate de myrtényl (49,27%) conjointement avec le 1,8 cineole (26,93%), α-pinène (16,52%) et méthyleugénol (4,8%) comme composés majoritaires.

Les constituants qui caractérisent l'huile essentielle de *L. stoechas* sont des sesquiterpènes (66,1%) dont les hydrocarbures représentent la grande proportion (42,33%)

Résultats

par rapport aux oxygénés (23,27%). Les monoterpènes sont présents avec une proportion de 18,62% dont 14,46% sont des oxygénés et 4,16% des hydrocarbures. Le composé fondamental est le 10s, 11s-Himachala-3(12), 4-diene (23,62%) avec le cubenol (16,19%), methyl eugénol (6,19%), δ -Cadinène (5,31%), acétate demyrtényl (4,96%), cyclosativène (4,53%), acétate d'exobornyl (4,45%) et α -Guaiène (4,14%) comme composés majoritaires. D'autres composés à différentes proportions ont été identifiés dans ces huiles essentielles le plus souvent appartenant aux phénylpropènes.

Tableau 8. Composition chimique des huiles essentielles selon leurs groupes fonctionnelles.

	Huiles essentielles				
	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Satureja calamintha</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Laurus nobilis</i>	<i>Myrtus communis</i>
Monoterpènes	86,4	75,54	18,62	73,14	95,17
Hydrocarbures	17,93	61,92	4,16	32,55	18,97
Oxygénés	68,47	13,53	14,46	40,59	76,2
Sesquiterpènes	10,81	7,93	66,1	5,72	0
Hydrocarbures	5,58	6,62	42,33	5,54	
Oxygénés	5,23	1,31	23,77	0,18	
Autres	0	0	15,27	3,67	4,8

2. Activité antioxydante des huiles essentielles

L'excès des radicaux libres peut engendrer des agressions biochimiques au niveau de diverses molécules (lipides, glucides, ADN, protéines...), ce qui implique le développement de nombreuses pathologies. Dans les systèmes alimentaires, ces radicaux peuvent causer la peroxydation de lipides ou protéines au cours des processus de fabrication et de stockage, ce qui mène à la perte de la qualité et la sécurité des aliments (Mau et *al.*, 2004). C'est pourquoi, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche d'antioxydants d'origine naturelle essentiellement les huiles essentielles.

Afin d'obtenir des informations sur les propriétés antioxydantes des huiles essentielles de *M. pulegium*, *S. calamintha*, *L. stoechas*, *L. nobils* et *M. communis*; trois différentes méthodes ont été utilisées: le test au DPPH, le test de blanchissement du β -carotène et la mesure du pouvoir réducteur.

2.1. Piégeage du radical DPPH

La Figure 20 représente les résultats de l'activité du piégeage du radical DPPH des cinq huiles essentielles en fonction de la concentration (1,25-10 µl/ml). On remarque que toutes les huiles essentielles testées étaient capables de réduire le radical libre DPPH mais à des proportions différentes selon l'huile testée et sa concentration. La capacité de réduire ce radical était dépendante de la concentration ($p < 0,05$). Cette capacité de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle. On note que l'huile essentielle de *L. nobilis* était la plus efficace dans le piégeage du radical DPPH avec une activité égale à l'antioxydant synthétique BHT utilisé comme contrôle positif ($p < 0,05$). *L. stoechas* montre aussi un bon potentiel antioxydant avec un pourcentage de piégeage de $63,1 \pm 3,2\%$ à la concentration 10 µl/ml alors que les huiles essentielles de *M. pulegium* et *S. calamintha* ont témoigné d'une capacité de réduction moyenne avec des pourcentages de $30,38 \pm 1,1\%$ et $22 \pm 3,4\%$ respectivement à 10 µl/ml. L'huile essentielle de *M. communis* présente des pourcentages de réduction très faibles atteignant juste $14,8 \pm 1,9\%$ à la concentration de 10 µl/ml.

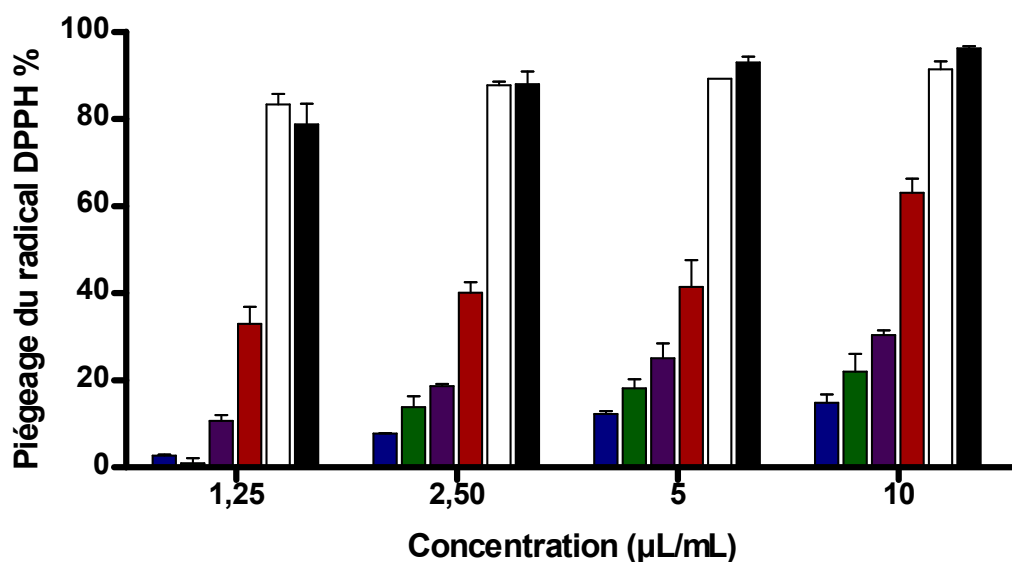


Figure 20. Activité du piégeage du radical libre DPPH des huiles essentielles de *M. communis* (■), *S. calamintha* (■), *M. pulegium* (■), *L. stoechas* (■) et *L. nobilis* (□) comparée à celle du BHT (■) à des concentrations allant de 1,25 à 10 µl/ml. (n=3).

2.2. Inhibition de l'oxydation du β -carotène

La Figure 21 montre l'aptitude des huiles essentielles à empêcher la peroxydation des lipides, évaluée par la technique de décoloration du β -carotène. On remarque que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par l'huile essentielle de *L. nobilis* avec un taux de $90,7 \pm 3,6\%$ à la concentration de $10 \mu\text{l/ml}$ et $53,3 \pm 3,6\%$ à la concentration de $1,25 \mu\text{l/ml}$; le taux d'inhibition étant proche de celui du BHT à toutes les concentrations testées. Un effet moindre mais important est enregistré avec les huiles de *L. stoechas* et *M. pulegium* ($58,2 \pm 1,4$ et $66,9 \pm 1,1\%$ respectivement à $10 \mu\text{l/ml}$). En concordance avec les résultats du DPPH, l'huile de *S. calamintha* est beaucoup moins efficace avec un pourcentage d'inhibition de seulement $31,9 \pm 0,7\%$ à la concentration $10 \mu\text{l/ml}$. Alors que le pouvoir inhibiteur de la décoloration oxydative β -carotène de l'huile de *M. communis* est négligeable ($7,8 \pm 1,5\%$) à la concentration de $10 \mu\text{l/ml}$. A part l'huile de *M. communis*, les autres huiles montrent un profil d'activité dépendant de la concentration en huile essentielle ($p < 0,05$).

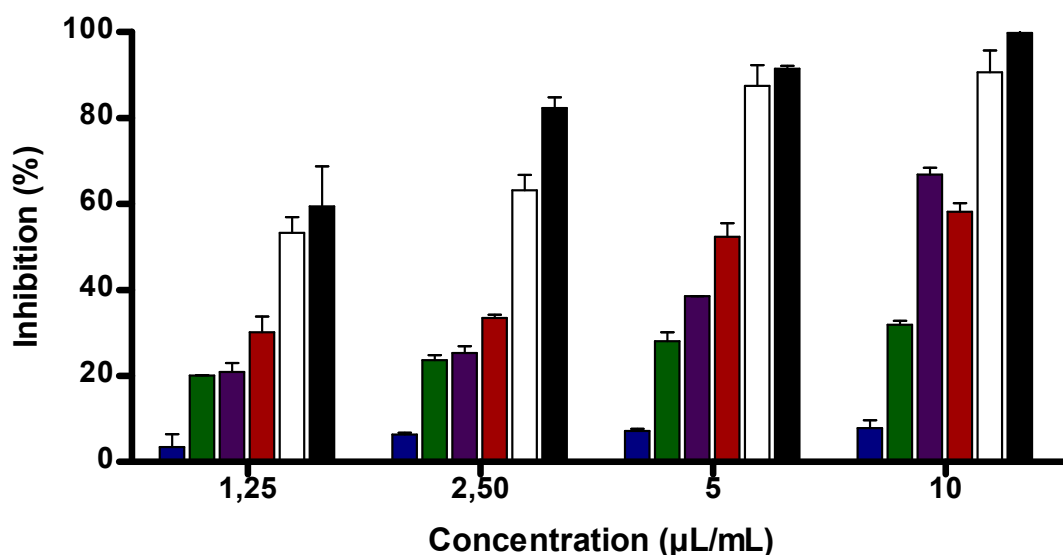


Figure 21. Activité antioxydante des huiles essentielles de *M. communis* (■), *S. calamintha* (■), *M. pulegium* (■), *L. stoechas* (■) et *L. nobilis* (□) déterminée par la méthode de blanchissement du β -carotène comparée à celle du BHT (■) à des concentrations allant de 1,25 à $10 \mu\text{l/ml}$. (n=3).

2.3. Pouvoir réducteur

Les résultats obtenus pour le pouvoir réducteur (Figure 22) confirment ceux obtenues par les deux tests précédents. Un effet très faible est observé pour les huiles essentielles de *M. communis* et *S. calamintha* avec des D.O_{700nm} de 0,37 et 0,41 respectivement à la concentration de 10 µl/ml. Une activité de réduction modérée est observée dans le cas de l'huile essentielle de *L. stoechas* et de *M. pulegium* avec des D.O_{700nm} de l'ordre de 1 et 0,72 respectivement à la concentration de 10 µl/ml en comparaison avec le pouvoir réducteur du BHT testé à la même concentration. Par contre, l'huile essentielle de *L. nobilis* possède un fort pouvoir réducteur. Cependant, toutes les huiles étaient moins efficaces que l'antioxydant synthétique le BHT. Le pouvoir réducteur de *L. nobilis* et de *L. stoechas* est dose dépendante alors que dans le cas de *M. communis*, *M. pulegium* et *S. calamintha*; il n'y avait pas de différences significatives entre les valeurs du pouvoir réducteur en augmentant la concentration ($p < 0.05$).

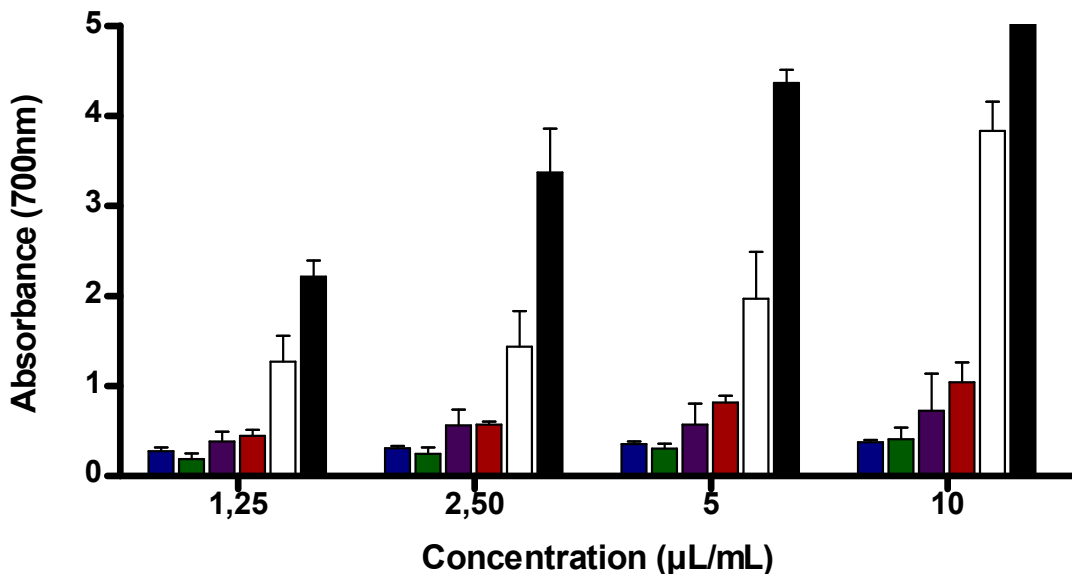


Figure 22. Pouvoir réducteur des huiles essentielles de *M. communis* (■), *S. calamintha* (■), *M. pulegium* (■), *L. stoechas* (■) et *L. nobilis* (□) comparée à celui du BHT (■) à des concentrations allant de 1,25 à 10 µl/ml. (n=3).

2.4. Efficacité antioxydante des huiles essentielles

Pour une meilleure évaluation de l'efficacité antioxydante des huiles essentielles étudiées, le calcul de la concentration efficace qui réduit de 50% la concentration initiale du DPPH, la décoloration du β -carotène ou bien la concentration pour laquelle le DO_{700} est égale à 2,5 (pouvoir réducteur) (tableau 9) est souhaitable. La valeur d' EC_{50} est inversement proportionnelle à l'efficacité du produit à tester. Il apparaît que l'huile essentielle de *L. nobilis* témoigne d'une grande efficacité dans la réduction du radical DPPH et dans l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique avec une $EC_{50} < 1,25$ $\mu\text{l/ml}$. Elle est suivie par l'huile essentielle de *L. stoechas* avec une $EC_{50} = 7,5$ et $4,75$ $\mu\text{l/ml}$ dans le cas du test au DPPH et le test de blanchissement du β -carotène. En tenant compte des valeurs des EC_{50} , l'huile essentielle de *M. pulegium* apparaît plus active dans le système de l'inhibition de la décoloration oxydative du β -carotène ($EC_{50} = 6,6$ $\mu\text{l/ml}$) que dans le système de réduction du DPPH ($EC_{50} > 10$ $\mu\text{l/ml}$). Les résultats du calcul des valeurs de l' EC_{50} du test du pouvoir réducteur, confirme la forte action antioxydante de l'huile de *L. nobilis* ($EC_{50} = 6,6$ $\mu\text{l/ml}$) en comparaison avec les autres huiles testées ($EC_{50} > 10$ $\mu\text{l/ml}$). En comparant les résultats des trois différents tests antioxydants, il apparaît que les huiles essentielles sont plus actives dans le système de l'inhibition de la décoloration oxydative du β -carotène, s'ensuit le système de piégeage du radical DPPH et finalement le test du pouvoir réducteur.

Tableau 9. Efficacité antioxydante des huiles essentielles étudiées.

	EC_{50} ($\mu\text{l/ml}$)		
	Piégeage du radical DPPH	Inhibition de l'oxydation du β - carotène	Pouvoir réducteur
<i>L. nobilis</i>	<1,25	< 1,25	6,6
<i>L. stoechas</i>	7,5	4,75	>10
<i>M. pulegium</i>	>10	6,6	>10
<i>S. calamintha</i>	>10	>10	>10
<i>M. communis</i>	>10	>10	>10

3. Conclusion

Cette première partie du travail contribue à la détermination de la composition chimique et l'évaluation du potentiel antioxydant des cinq huiles essentielles extraites de plantes aromatiques et médicinales du Nord du Maroc. En raison de la complexité chimique des huiles essentielles, l'activité antioxydante a été évaluée par trois différents tests pour avoir une indication sur leur pouvoir antioxydant. L'huile essentielle de *L. nobilis* a montré une efficacité antioxydante importante par les trois tests réalisés. Les huiles essentielles de *L. stoechas* et *M. pulegium* sont des antioxydants actifs mais de moindre efficacité que *L. nobilis*, alors que les huiles de *M. communis* et *S. calamintha* ont exhibé le plus faible pouvoir antioxydant. En comparant les valeurs calculées des EC_{50} , il s'avère que les huiles essentielles sont plus actives dans l'inhibition de la peroxydation lipidique et dans la réduction du radical libre DPPH.

Chapitre 2 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles.

1. Evaluation de l'activité antibactérienne

La diversité chimique des molécules constituant les huiles essentielles définit leurs diverses propriétés biologiques. Ainsi, plusieurs travaux ont démontré les effets inhibiteurs et bactéricides des huiles essentielles et de certains de leurs composants *in vitro* ou dans des systèmes alimentaires contre une large gamme de bactéries pathogènes ou d'altération alimentaire. Cependant, il est difficile de comparer les résultats obtenus dans les différentes études sur l'effet antimicrobien des huiles essentielles en raison de la diversité des méthodes et des conditions appliquées.

L'objectif de cette partie est l'évaluation des propriétés antimicrobiennes de cinq huiles essentielles (*Mentha pulegium*, *Satureja calamintha* Scheele, *Lavandula stoechas*, *Laurus nobilis* et *Myrtus communis*) vis-à-vis des bactéries Gram positives (deux souches de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* et *Bacillus subtilis*) et des bactéries Gram négatives (deux souches d'*Escherichia coli*, *Salmonella* Seftemberg et *Yersinia enterocolitica*). L'effet antifongique de ces huiles essentielles a été testé sur deux souches d'*Aspergillus flavus*.

1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en agar

L'activité antibactérienne des cinq huiles essentielles est évaluée en premier qualitativement par la méthode de diffusion en agar. Les résultats obtenus sont exprimés en termes de diamètres de zones d'inhibition mesurés autour des disques (Tableau 10 et 11).

A partir des résultats obtenus, on peut observer que les huiles essentielles possèdent une activité antibactérienne variant selon l'huile et la souche testée. En ce qui concerne les bactéries Gram positives, les plus grandes zones d'inhibition ont été observées contre *S. aureus* et *L. monocytogenes* EGD-e en présence de l'huile de *L. nobilis* et *L. stoechas* respectivement. Les huiles de *M. communis* et *S. calamintha* ont montré une activité faible par rapport aux autres huiles. La souche *L. monocytogenes* CECT 4031 a montré une résistance à ces deux huiles avec des zones d'inhibition faibles ($12,5 \pm 1,5$ mm dans le cas de *S. calamintha* et $11,5 \pm 2,5$ mm dans le cas de *M. communis*). Une activité relativement faible a été aussi observée avec *S. calamintha* vis-à-vis *E. faecium* ($12,5 \pm 1,5$ mm) et *S.*

Résultats

aureus (16,5±1,9 mm). Les souches les plus sensibles à l'huile de *M. pulegium* étaient *L. monocytogenes* CECT 4031 et *S. aureus* (32,5±0,4 et 30,4±1,1 mm).

Tableau 10. Diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre du disque 6 mm) des cinq huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes Gram positives.

Huiles essentielles	Souches bactériennes				
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i> ¹	<i>L. monocytogenes</i> ²	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>M. pulegium</i>	30,4±1,1	25,7±0,4	32,5±0,4	26,3±0,7	26,4±0,9
<i>L. stoechas</i>	28,0±0,7	37,5±2,5	32,0±2,0	29,5±0,5	34,0±1,4
<i>S. calamintha</i>	16,9±1,9	20,5±0,3	14,0±0,7	12,5±1,5	21,3±0,2
<i>L. nobilis</i>	37,7±1,8	32,5±2,5	14,0±0,7	24,0±1,0	33,3±2,2
<i>M. communis</i>	24,2±2,1	21,5±1,5	11,5±2,5	22,0±2,0	21,1±0,7

*L. monocytogenes*¹: *Listeria monocytogenes* EGD-e et *L. monocytogenes*²: *L. monocytogenes* CECT 4031. Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± écart type.

Tableau 11. Diamètres des zones d'inhibition (incluant le diamètre du disque 6mm) des cinq huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes Gram négatives.

Huiles essentielles	Souches bactériennes			
	<i>S. Senftenberg</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>E. coli</i> ¹	<i>E. coli</i> ²
<i>M. pulegium</i>	21,4±1,4	18,1±1,4	21,8±0,6	23,7±0,7
<i>L. stoechas</i>	14,8±0,2	12,5±1,7	16,2±0,6	20,7±0,4
<i>S. calamintha</i>	13,2±0,8	21,3±0,2	13,4±0,1	17,0±0,7
<i>L. nobilis</i>	20,8±0,6	19,2±1,1	15,3±1,9	23,7±0,4
<i>M. communis</i>	11,7±2,3	7,2±0,2	7,4±0,4	10,8±2,6

*E. coli*¹: *Escherichia coli* O157:H7; *E. coli*²: *Escherichia coli* CECT 471. Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions ± écart type.

L'huile essentielle de *L. stoechas* a aussi montré une efficacité vis-à-vis toutes les souches Gram positives testées; les souches de *L. monocytogenes* EGD-e, *B. subtilis* et *L. monocytogenes* CECT 4031 étant les plus sensibles à cet huile. Alors que dans le cas de *L. nobilis*, toutes les souches Gram positives étaient sensibles à part la souche de *L. monocytogenes* CECT 4031 qui a montré une résistance ($14\pm 0,7$ mm).

Pour les bactéries Gram négatives, il faut noter que l'huile essentielle de *M. communis* était la plus inefficace avec des zones d'inhibition les plus réduites envers ces souches. Les autres huiles ont montré une activité modérée avec des zones d'inhibition allant de 16,2 à 23,7 mm. La souche *S. Senftenberg* a montré une résistance vis-à-vis l'huile de *L. stoechas* et *S. calamintha* ($14,8\pm 0,2$ et $13,2\pm 0,8$ mm). Alors que la souche *Y. enterocolitica* était insensible vis-à-vis *L. stoechas* ($12,5\pm 1,1$ mm) et *E. coli* O157: H7 vis-à-vis *S. calamintha* ($13,4\pm 0,1$ mm). Il apparaît aussi d'après les résultats que d'une manière générale, les huiles essentielles étudiées sont plus actives contre les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives.

1.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles étudiées

La méthode de microdilution en milieu liquide en utilisant le résazurine comme indicateur de croissance a été choisie pour la détermination des valeurs de CMI et CMB des huiles essentielles étudiées. Les résultats obtenus pour les bactéries Gram positives et Gram négatives sont représentés dans les tableaux 12 et 13 respectivement.

Toutes les bactéries Gram positives étaient sensibles aux effets inhibiteurs des huiles essentielles avec des valeurs de CMI allant de 0,5 à 14 $\mu\text{l/ml}$ et variant selon la souche et l'huile essentielle testée. La sensibilité de *L. monocytogenes* EGD-e, précédemment démontrée par la méthode de diffusion en agar est confirmée, avec des valeurs de CMI basses (0,5 ou 2 $\mu\text{l/ml}$). Les huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. nobilis*, *S. calamintha* et *L. stoechas* ont montré des effets bactéricides contre toutes les souches Gram positives, exception d'*E. faecium* qui est plus résistante à l'action bactéricide de *S. calamintha* (CMB > 56 $\mu\text{l/ml}$). Alors que toutes les bactéries testées s'avèrent résistantes à l'action bactéricide de *M. communis* aux concentrations testées (CMB > 56 $\mu\text{l/ml}$) exception de *B. subtilis*.

Résultats

Toutes les huiles essentielles étudiées étaient capables d'inhiber la croissance des bactéries Gram négatives mais à des valeurs légèrement supérieures à celles obtenues pour les bactéries Gram positives (allant de 2 à 56 µl/ml). L'huile essentielle de *M. communis* montre l'effet antimicrobien le plus faible (CMI= 56 µl/ml) vis-à-vis des quatre bactéries Gram négatives avec une absence d'action bactéricide aux concentrations testées. Les souches de *S. Senftenberg* et *Y. enterocolitica* ont montré une résistance aux effets bactéricides de *L. stoechas* et *S. calamintha*. Aussi, *E. coli* CECT 471 était résistante vis-à-vis l'action bactéricide de *L. stoechas*. On a observé que les huiles essentielles de *M. pulegium* et *L. nobilis* montrent l'activité antibactérienne la plus importante contre ce groupe de bactéries. En effet, l'huile de *M. pulegium* a exercé une forte activité antibactérienne contre *E. coli* CECT 471 avec des valeurs de CMI et CMB faibles (CMI= 2 et CMB= 14 µl/ml). Par cette méthode, on observe aussi que les bactéries Gram négatives sont généralement moins sensibles aux effets antibactériens des huiles essentielles en comparaison avec les bactéries Gram positives. Il faut noter aussi que les plus grandes zones d'inhibition ne sont pas toujours les plus sensibles (valeurs de CMI et CMB les plus basses).

Résultats

Tableau 12. Activité antibactérienne des huiles essentielles contre des bactéries Gram positives par détermination des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) ($\mu\text{l/ml}$).

Huiles essentielles	Souches bactériennes									
	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i> ¹		<i>L. monocytogenes</i> ²		<i>E. faecium</i>		<i>B. subtilis</i>	
	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>
<i>M. pulegium</i>	2,0	14,0	2,0	14,0	2,0	14,0	8,0	14,0	1,0	8,0
<i>L. stoechas</i>	2,0	14,0	0,5	8,0	8,0	14,0	2,0	14,0	4,0	8,0
<i>S. calamintha</i>	2,0	8,0	0,5	14,0	8,0	56,0	8,0	>56,0	4,0	56,0
<i>L. nobilis</i>	4,0	21,0	0,5	14,0	1,0	8,0	14,0	28,0	4,0	14,0
<i>M. communis</i>	8,0	>56,0	2,0	>56,0	1,0	>56,0	14,0	>56,0	14,0	56,0

*L. monocytogenes*¹: *Listeria monocytogenes* EGD-e et *L. monocytogenes*²: *L. monocytogenes* CECT 4031.

Résultats

Tableau 13. Activité antibactérienne des huiles essentielles contre des bactéries Gram négatives par détermination des valeurs de concentration minimal inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) ($\mu\text{l/ml}$).

Huiles essentielles	Souches bactériennes							
	<u>S. Senftenberg</u>		<u>Y. enterocolitica</u>		<u>E. coli¹</u>		<u>E. coli²</u>	
	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>	<u>CMI</u>	<u>CMB</u>
<i>M. pulegium</i>	4,0	21,0	4,0	14,0	4,0	8,0	2,0	14,0
<i>L. stoechas</i>	14,0	>56,0	14,0	>56,0	14,0	14,0	21,0	>56,0
<i>S. calamintha</i>	14,0	>56,0	14,0	>56,0	8,0	14,0	14,0	28,0
<i>L. nobilis</i>	4,0	21,0	8,0	14,0	4,0	21,0	14,0	21,0
<i>M. communis</i>	56,0	>56,0	56,0	>56,0	56,0	>56,0	56,0	>56,0

E. coli¹: *Escherichia coli* O157:H7; *E. coli²*: *Escherichia coli* CECT 471.

2. Activité antifongique des huiles essentielles

L'activité antifongique des huiles essentielles étudiées a été déterminée par la méthode de dilution en milieu gélosé, basée sur l'inhibition de la croissance mycélienne de disques de champignons déposés au centre des milieux gélosés additionnés de différentes concentrations en huiles essentielles. Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis deux souches d'*Aspergillus flavus* sont résumées dans le tableau 14.

Il apparaît que les deux souches fongiques étaient sensibles à toutes les huiles essentielles. La réduction de la croissance mycélienne est observée par toutes les concentrations testées et l'augmentation de la dose en huile essentielle est accompagnée d'une meilleure efficacité. Cependant, il n'y avait pas de différence significative dans l'inhibition mycélienne entre les deux concentrations (4 et 8µl/ml) à part dans le cas de l'huile essentielle de *L. stoechas* vis-à-vis *A. flavus* CECT 2684 mais aussi dans le cas de *S. calamintha* contre la même souche ($p < 0.05$). L'inhibition mycélienne totale des deux souches d'*A. flavus* a été atteinte par l'huile essentielle de *L. nobilis* et *M. pulegium* à la concentration de 4 µl/ml, alors que 100% d'inhibition mycélienne a été atteinte à la concentration de 8µl/ml par l'huile de *L. stoechas*.

L'huile essentielle de *M. communis* a montré la plus faible activité antifongique vis-à-vis de *A. flavus* CECT 2279 n'atteignant que 59,4% à la concentration de 8µl/ml, cependant il est capable d'inhiber 71,64% de la croissance radiale de l'autre souche *A. flavus* CECT 2684 à la même concentration. Tandis que l'huile essentielle de *S. calamintha* a montré la plus faible activité antifongique vis-à-vis *A. flavus* CECT 2684 avec une inhibition de 49,2% à la concentration de 8µl/ml. Cependant à la même concentration, cette huile est capable d'inhiber 75,5% de la croissance mycélienne d'*A. flavus* CECT 2279.

Résultats

Tableau 14. Inhibition de la croissance mycélienne par les huiles essentielles.

<u>Huiles essentielles</u>	Pourcentage d'inhibition mycélienne (%)		
	<u>Concentration</u> (μ l/ml)	<u>Souches fongiques</u>	
		<i>Aspergillus flavus</i> CECT 2279	<i>Aspergillus flavus</i> CECT 2684
<i>Mentha pulegium</i>	0.5	14.6 ^c ±7.3	54.8 ^c ±4.2
	1	26.9 ^c ±5.4	64.9 ^{bc} ±0.5
	2	57.4 ^b ±7.1	71.5 ^b ±0.8
	4	100.0 ^a ±0.2	100.0 ^a ±0.7
	8	100.0 ^a ± 0.1	100.0 ^a ± 0.1
<i>Lavandula stoechas</i>	0.5	30.9 ^d ±5.3	8.5 ^e ±1.1
	1	59.6 ^c ±2.1	22.8 ^d ±2.7
	2	76.7 ^b ±3.3	50.0 ^c ±2.2
	4	87.2 ^{ab} ±7.4	73.7 ^b ±0.3
	8	100.0 ^a ± 0.1	100.0 ^a ± 0.2
<i>Satureja calamintha</i> Scheele	0.5	3.9 ^d ±0.5	14.6 ^b ±6.2
	1	8.3 ^{dc} ±2.6	17.8 ^b ±5.0
	2	20.9 ^c ±4.0	23.6 ^b ±5.8
	4	39.4 ^b ±1.4	39.2 ^a ±4.0
	8	75.5 ^a ± 6.4	49.2 ^a ± 2.4
<i>Laurus nobilis</i>	0.5	16.7 ^c ±4.3	24.1 ^c ±3.8
	1	23.4 ^c ±2.1	49.6 ^b ±5.9
	2	44.4 ^b ±2.3	61.3 ^b ±2.6
	4	100.0 ^a ±0.3	100.0 ^a ±0.2
	8	100.0 ^a ± 0.1	100.0 ^a ± 0.1
<i>Myrtus communis</i>	0.5	7.9 ^d ±1.8	22.0 ^c ±4.7
	1	19.9 ^{cd} ±3.8	30.7 ^{bc} ±0.3
	2	33.9 ^{bc} ±6.3	42.4 ^b ±3.0
	4	46.8 ^{ab} ±7.1	59.9 ^a ±6.8
	8	59.4 ^a ± 5.8	71.6 ^a ± 4.7

3. Conclusion

Dans cette partie, l'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion en gélose et par détermination des valeurs de CMI et CMB. Les huiles essentielles de *L. nobilis* et *M. pulegium* ont témoigné de la plus forte activité antibactérienne contre les différentes souches bactériennes. L'huile essentielle de *M. communis* a montré le plus faible effet antibactérien avec une nette résistance des bactéries Gram négatives à cette huile et des effets non bactéricides contre toutes les souches testées. Les souches Gram positifs étaient sensibles à l'huile essentielle de *L. stoechas*, alors que les bactéries Gram négatifs ont montré plus de résistance. Finalement, l'huile essentielle de *S. calamintha* Scheele a révélée une activité antibactérienne modérée avec des effets non bactéricides contre certaines souches Gram positives et Gram négatives.

La meilleure activité antifongique contre les deux souches fongiques a été enregistrée par les huiles essentielles de *M. pulegium* et *L. nobilis*. De même, l'huile de *L. stoechas* était capable d'inhiber complètement la croissance mycélienne des deux souches fongiques. Les deux autres huiles essentielles (*M. communis* et *S. calamintha* Scheele) étaient incapables d'inhiber complètement la croissance radiale des souches fongiques aux concentrations testées.

Chapitre 3 : Impact des huiles essentielles sur la viabilité cellulaire, l'intégrité et la fluidité membranaire des bactéries.

Les huiles essentielles ont démontré leur activité antibactérienne contre une large gamme de microorganismes. Cependant, les mécanismes d'action de ces huiles sont diverses et ne sont pas tous connus. Une meilleure connaissance de leur mécanisme d'action est importante et peut ainsi faciliter leur application, notamment dans l'agroalimentaire ou autres domaines telles que pharmaceutique ou cosmétique.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer certains dommages induits suite au traitement par trois huiles essentielles (*M. pulegium*, *S. calamintha* et *L. nobilis*) au niveau des cellules bactériennes de *Listeria innocua* LRGIA 01 (représentant les Gram positives) et *Escherichia coli* CECT 471 (représentant les Gram négatives). Il s'agit d'estimer l'effet de ces huiles sur la viabilité cellulaire, l'intégrité membranaire ainsi que la fluidité membranaire de ces deux souches. Les concentrations (CMI et ½ CMI) utilisées pour les huiles essentielles testées ont été déterminées auparavant.

1. Evaluation de la viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire des microorganismes

La viabilité et l'intégrité membranaire des bactéries testées ont été évaluées en utilisant le kit LIVE/DEAD® BacLight™ et la microscopie à épifluorescence. Ce kit consiste en un mélange du SYTO 9 (fluorescent vert) et du l'iodure de propidium (fluorescent rouge). Il permet la distinction entre les cellules à membrane plasmique endommagée et les cellules ayant une membrane intacte donc de mettre en évidence des perturbations au niveau de la membrane des bactéries. Ces marqueurs diffèrent à la fois par leurs caractéristiques spectrales et leur capacité à pénétrer les cellules bactériennes. La coloration des cellules dépend de leur viabilité. Le SYTO 9 est un marqueur de viabilité qui pénètre toutes les cellules (avec des membranes intactes et endommagées) les colorant en vert, alors que l'IP ne pénètre que les cellules à membranes endommagées les colorant en rouge. En parallèle, une énumération des cellules cultivables a été faite sur milieu TSA pour détecter la présence éventuelle de cellules viables non cultivables (VNC). De ce fait, il est possible d'évaluer l'état physiologique des cellules bactériennes après différents temps de contact avec les huiles essentielles.

La Figure 23 représente les cellules de *L. innocua* LRGIA 01 après un marquage par les marqueurs du kit Live/Dead® BacLight™ à différents temps de contact avec 2 concentrations en huile essentielle de *L. nobilis* (CMI= 8 µl/ml et ½ CMI= 4 µl/ml) en milieu liquide. Un témoin constitué d'une suspension cellulaire de *L. innocua* sans agent antimicrobien est également présenté.

Des cellules viables ont été observées dans la suspension cellulaire sans huile essentielle de *L. nobilis*, démontrant que les cellules sont vivantes. En effet, pour les cellules sans huile essentielle, toutes les cellules observées sont vertes. En présence des concentrations CMI et ½ CMI en huile essentielle, un mélange de cellules vertes et rouges est observé immédiatement après la mise en contact avec l'huile essentielle de *L. nobilis* avec observation d'une diminution du nombre de cellules sur les champs est également mise en évidence en comparaison avec le témoin. Dès 2 h de contact avec l'antimicrobien, le pourcentage des cellules rouges est beaucoup plus important que les vertes et le nombre des cellules commence à diminuer. Après 24 h de contact avec cette huile essentielle, plus de 90% des cellules sont rouges et le nombre des cellules viables vertes a largement diminué. Ces observations montrent l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle et qu'il est capable de causer des dommages au niveau de la membrane des cellules bactériennes prouvant que ces cellules ont été lysées. Par contre, dans le cas du témoin et après 24 h d'incubation, le nombre des cellules viables de couleur vertes augmentent considérablement, avec présence d'un pourcentage très faible des cellules rouges.

Résultats

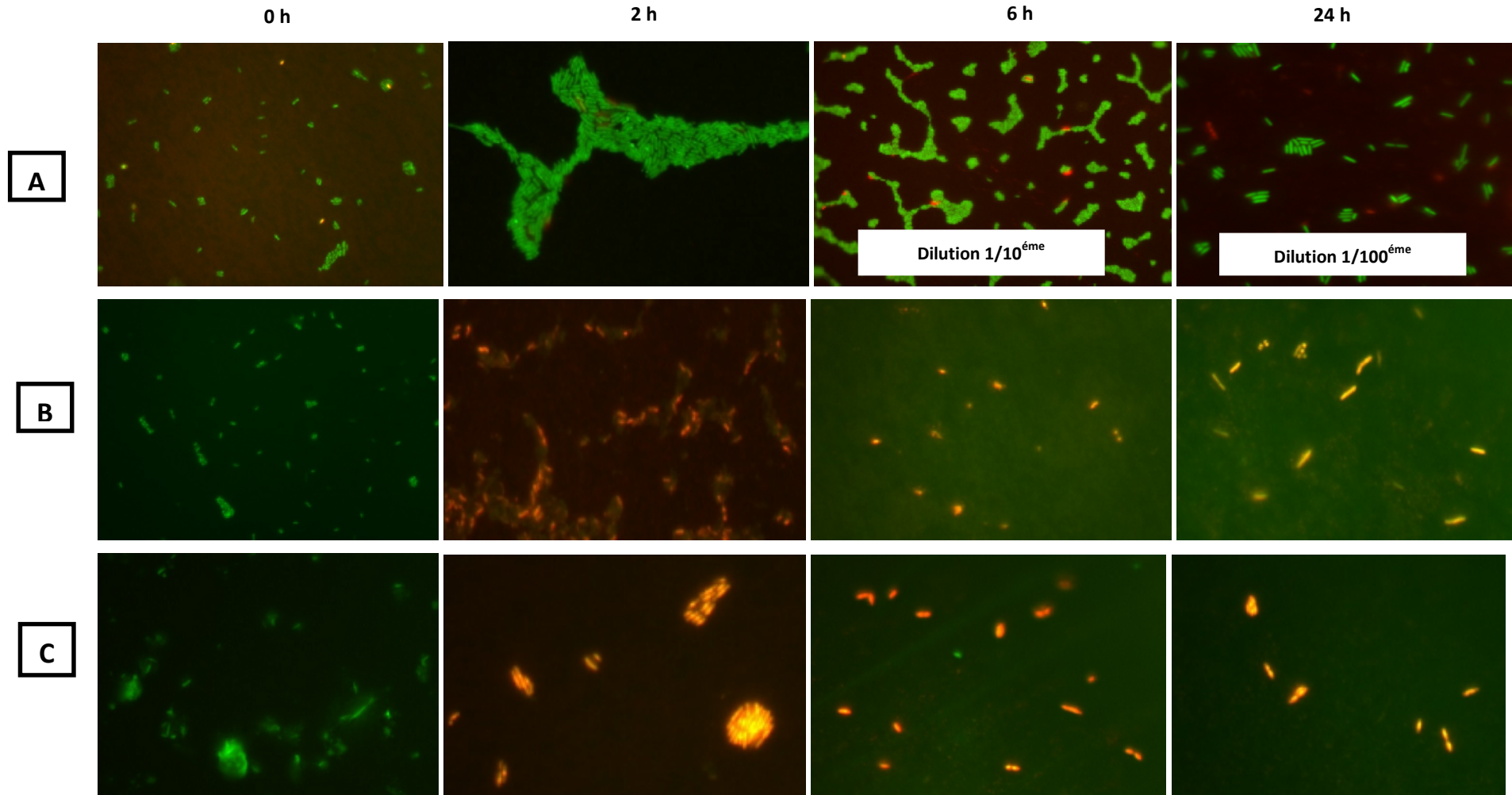


Figure 23. Clichés d’observations au microscope à épifluorescence de *L. innocua* LRGIA01 en contact avec 2 concentrations en l’huile essentielle de *L. nobilis* (CMI (B) et 1/2 CMI (C)) immédiatement après contact 0h, après 2h, 6h et 24h et un contrôle sans huile essentielle (A) (les bactéries étant colorées avec le kit Live/Dead® Baclight™ avant toute observation au microscope à épifluorescence). Grossissement X 100.

Les résultats de l'évolution des cellules cultivables et viables d'*E. coli* CECT 471 et de *L. innocua* LRGIA01 durant les 24 h en présence des huiles essentielles et en comparaison avec le témoin sont présentés dans les Figures 24 et 25, et les pourcentages des cellules à membranes endommagés sont présentés dans la Figure 26.

En absence des huiles essentielles, à la fois le nombre des cellules cultivables et des cellules viables des deux souches augmente avec le temps jusqu'à atteindre 1.10^9 UFC/mL ou bactéries/mL respectivement après 24 h (soit une augmentation d'environ 2 Logs).

D'autre part, le nombre des cellules cultivables de *L. innocua* et *E. coli* traitées avec les huiles essentielles diminue au cours du temps. A partir de 2 h de contact, des différences ont été observées entre le témoin et les bactéries en contact avec les huiles. Après 24 h de contact, une réduction de 4,2 et 4,6 Logs (UFC/ml) a été observée lorsque les cellules de *L. innocua* étaient traitées aux huiles essentielles de *L. nobilis* et *S. calamintha* à leur valeur de CMI (8 µl/ml et 14 µl/ml respectivement) et 1,2 Logs (UFC/ml) de réduction dans le cas de *M. pulegium* à la plus haute concentration testée (28 µl/ml). On constate également dans le cas d'*E. coli* à la concentration CMI, une réduction de 4,5, 4,0 et 3,4 Logs (UFC/ml) est observée après 24 h d'exposition aux huiles essentielles de *L. nobilis*, *S. calamintha* et *M. pulegium* respectivement (dont les valeurs de CMI sont de 14, 8 et 2 µl/ml). Suivant le même schéma, on observe une réduction des cellules bactériennes au cours du temps lorsqu'elles sont en contact avec la concentration $\frac{1}{2}$ CMI mais moins prononcée que celle obtenue en contact de la concentration CMI.

D'après les résultats obtenus dans les Figures 24 et 25, la différence apparaît clairement la différence entre le nombre des cellules cultivables sur gélose et les cellules viables, prononcée après 24 h d'incubation avec les huiles essentielles exception faite de *L. innocua* en contact avec l'huile de *M. pulegium*. On remarque une réduction des cellules viables dénombrées au microscope à épifluorescence comprise entre 1 et 1,5 Logs (bactéries/ml) dans le cas des deux souches (à la CMI) après 24 h en présence des huiles essentielles. Les cellules viables lorsqu'elles sont traitées à la $\frac{1}{2}$ CMI, suivent aussi le même modèle que celles obtenues en contact avec les CMI, mais généralement la diminution est moins importante. D'après la différence observée entre le nombre des cellules cultivables sur gélose et les cellules dénombrées par le microscope à épifluorescence, on peut dire que les cellules bactériennes ont perdu leur capacité de développement sur milieu gélosé. Ces cellules ont probablement réussi à garder leur structure et leur intégrité membranaire mais, se trouvant dans des conditions de stress

Résultats

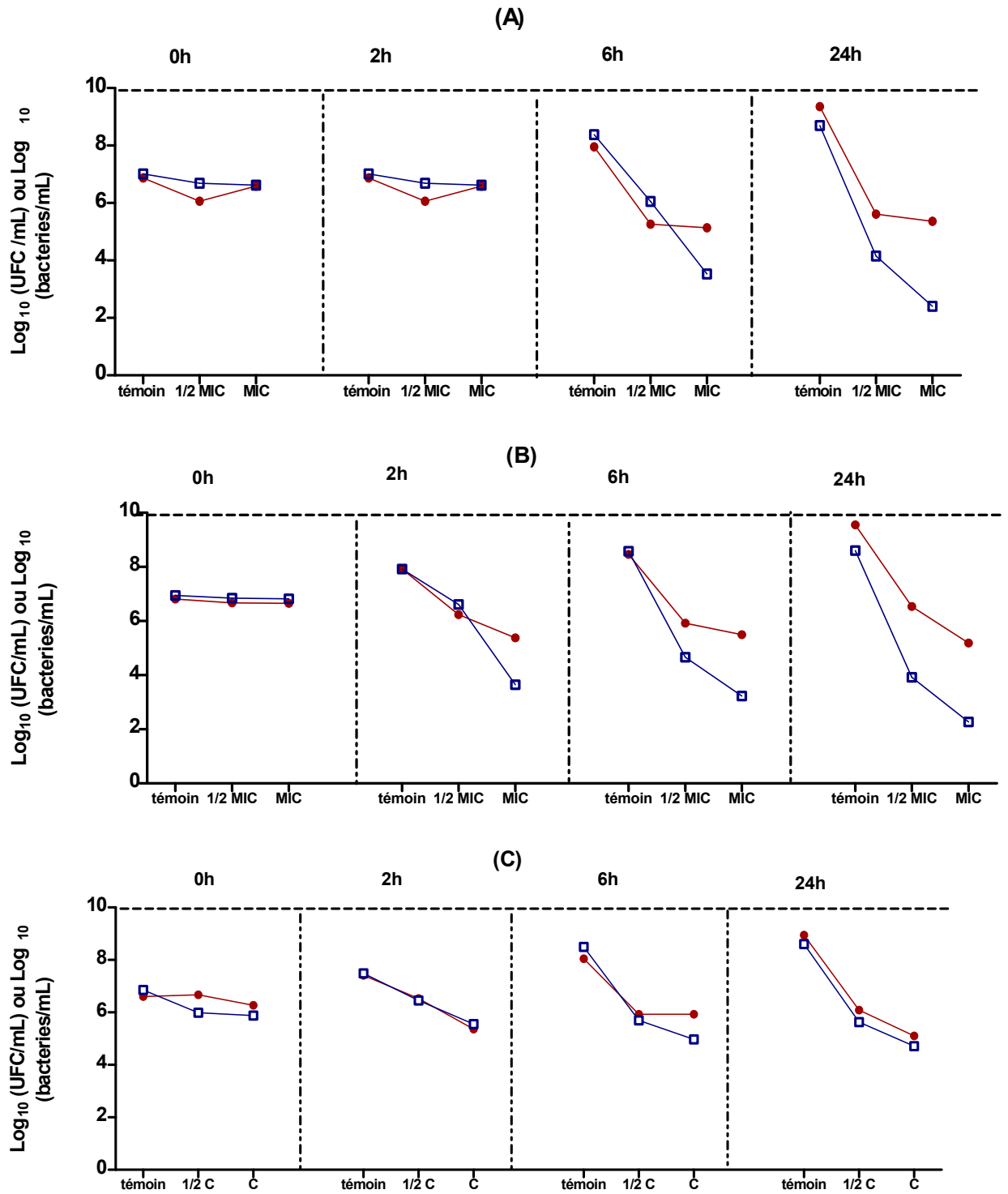


Figure 24. Evolution de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 en présence des huiles essentielles suivantes à deux concentrations la CMI et la 1/2 CMI: (A) *L. nobilis*, (B) *S. calamintha* Scheele et (C) *M. pulegium* (C= 28 $\mu\text{L/mL}$, 1/2 C=14 $\mu\text{L/mL}$), comparée aux cellules non traitées (témoin) en comptant les bactéries viables (●) et les bactéries cultivables (□).

causées par la présence de l'agent antimicrobien, perdant ainsi leur capacité à se multiplier et à former des colonies sur milieu gélosé. Ces cellules peuvent être considérées comme des bactéries viables non cultivables (VNC).

En absence des huiles essentielles, 13% des cellules d'*E. coli* ou de *L. innocua* ont été endommagées après 24 h d'incubation. Parallèlement, une nette augmentation de la proportion des bactéries à membranes endommagées a été observée lorsque les souches étaient en présence des huiles essentielles. L'huile essentielle de *L. nobilis* était la plus active, avec 99% et 98% de cellules endommagées dans le cas d'*E. coli* et de *L. innocua* respectivement. Les huiles essentielles de *S. calamintha* et *M. pulegium* ont également un impact important sur les membranes cellulaires d'*E. coli* avec 82% et 85% de cellules endommagées respectivement à la concentration CMI et $\frac{1}{2}$ CMI. Dans le cas de *L. innocua*, l'huile essentielle de *S. calamintha* a pu endommager 88% des cellules après 24 h de contact à la concentration CMI. Même si l'huile de *M. pulegium* n'a pas été testée à la concentration CMI contre la souche *L. innocua*, 83% de cellules à membranes endommagées ont été enregistrés. Bien que l'effet des huiles essentielles obtenu à la concentration $\frac{1}{2}$ CMI est moindre par rapport à celui obtenue avec les concentrations CMI, exception faite de l'effet de *L. nobilis* vis-à-vis d'*E. coli*, une augmentation importante du pourcentage des bactéries à membranes endommagées a été observée à cette concentration est enregistrée.

Résultats

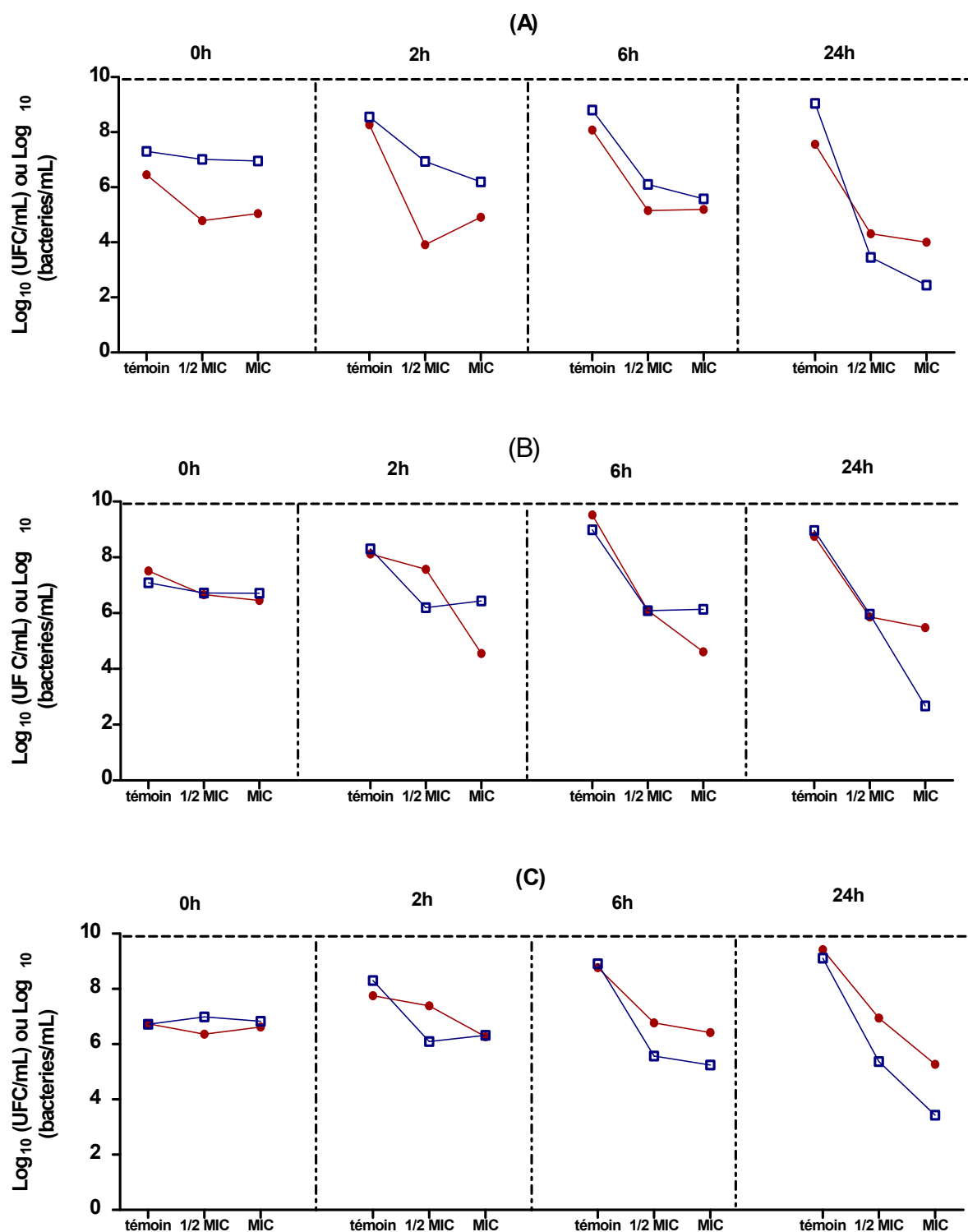


Figure 25. Evolution de la croissance de *E. coli* CECT 471 en présence des huiles essentielles suivantes à deux concentrations la CMI et la ½ CMI: (A) *L. nobilis*, (B) *S. calamintha* Scheele et (C) *M. pulegium*, comparée aux cellules non traitées (témoin) en comptant les bactéries viables (●) et les bactéries cultivables (□).

Résultats

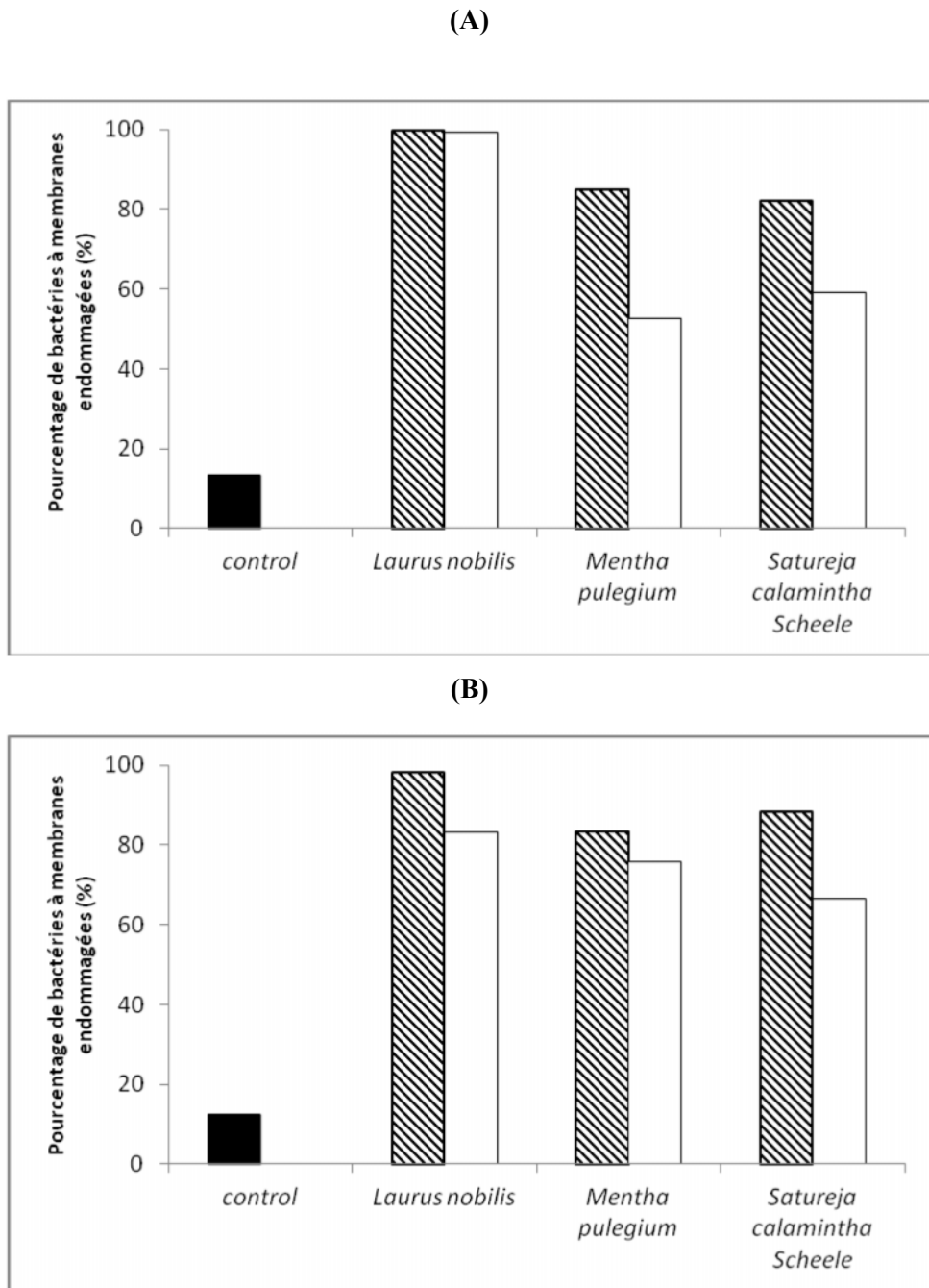


Figure 26. Pourcentage des cellules endommagées d'*E. coli* CECT 471 (A) et de *L. innocua* LRGA 01(B) après 24 h d'incubation avec les huiles essentielles (*L. nobilis*, *M. pulegium* et *S. calamintha* Scheele) à deux concentrations (CMI et 1/2 CMI et 28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et 14 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour *M. pulegium* dans le cas de *L. innocua*) comparé aux cellules non traitées en utilisant le kit LIVE/DEAD®BacLight™ (Invitrogen). Témoin: barres noires, CMI: barres rayés, 1/2 CMI: barres blanches.

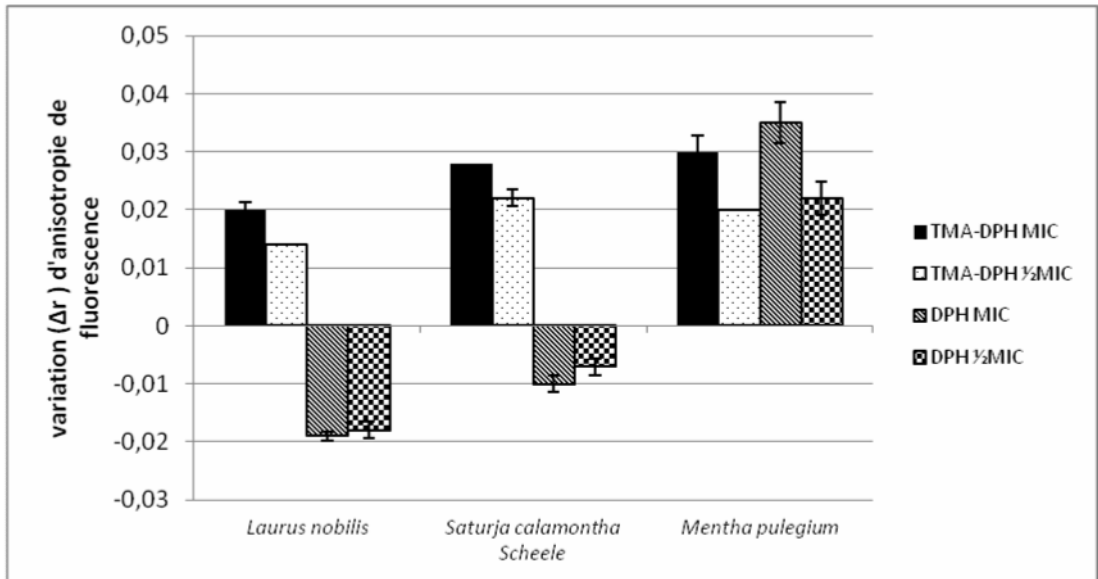
2. Impact des huiles essentielles sur la fluidité membranaire

Les mesures de l'anisotropie de fluorescence des deux sondes fluorescentes (TMA-DPH et DPH) ont été réalisées pour étudier l'effet des trois huiles essentielles sur la fluidité membranaire de *L. innocua* LRGIA 01 et *E. coli* CECT 471 (Figure 27) et pour comprendre leur effet sur les membranes bactériennes. Les deux sondes s'intègrent à deux sites différents de la membrane. Le TMA-DPH possède un domaine cationique qui lui permet de se fixer à la face externe de la membrane ce qui reflète la fluidité à la surface de cette membrane; alors que le DPH est une molécule hydrophobe qui s'insère au cœur de la bicouche lipidique et reflète la fluidité à l'intérieur de la membrane (Trevors, 2003; Mykytczuk et al., 2007; Thibaut et al., 2012). La fluidité membranaire évolue dans le sens contraire de l'anisotropie : lorsque la fluidité de la membrane diminue, l'anisotropie augmente et inversement.

En absence des huiles essentielles, aucun changement d'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH n'a été observés (voir l'annexe 4 et 5). L'ajout des huiles essentielles perturbe la mesure de l'anisotropie de fluorescence des deux marqueurs utilisés. Les résultats présentés sont ceux observés après 280 min de contact avec les huiles, la durée après laquelle les valeurs de l'anisotropie de fluorescence se stabilisent. Les huiles essentielles de *S. calamintha* et *L. nobilis* ont montré le même mode d'action vis-à-vis des deux souches. A la fois, une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et une diminution de celle du DPH. Ainsi, ces résultats indiquent que ces deux huiles essentielles donnent une membrane plus fluide à la surface et en même temps une rigidification de la bicouche lipidique à l'intérieur de la membrane. L'huile essentielle de *M. pulegium* agit différemment. En effet, il'y a à la fois une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH. Et donc, une augmentation de la fluidisation à la surface ainsi qu'au cœur de la membrane.

Dans le cas de *Listeria*, des différences significatives entre les deux concentrations ont été observées seulement entre les mesures de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH en présence de l'huile essentielle de *M. pulegium*. Aussi dans le cas d'*E. coli*, des différences significatives ont été observées dans la mesure de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH en présence des trois huiles essentielles et aussi dans la mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH en présence de l'huile essentielle de la menthe.

(A)



(B)

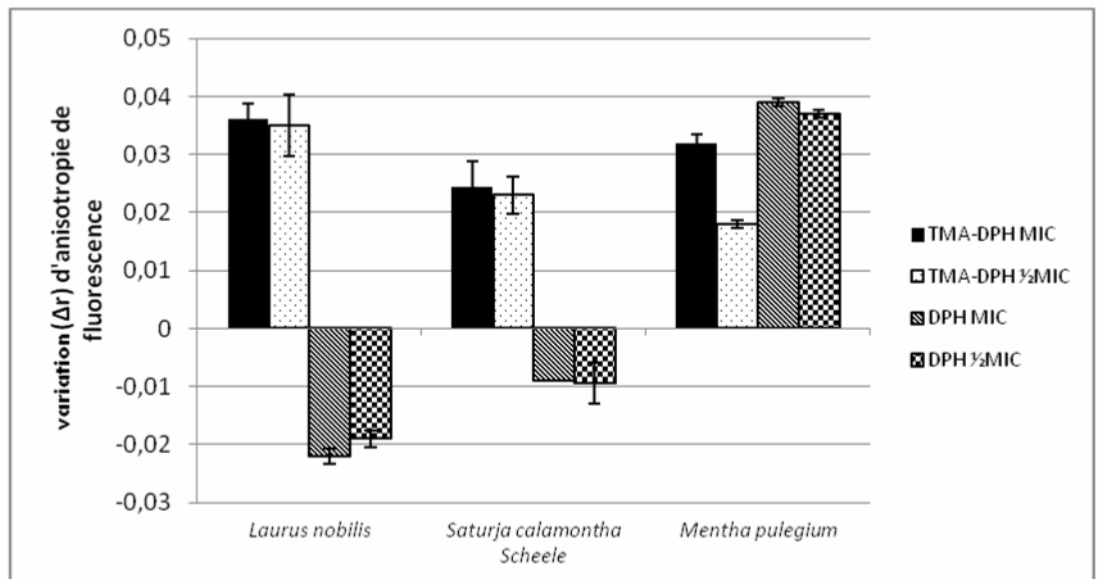


Figure 27. Variation (Δr) de l'anisotropie de fluorescence des sondes TMA-DPH et DPH dans les cellules d'*E. coli* CECT 471 (A) et *L. innocua* LRGIA01 (B) traitées par les huiles essentielles suivantes: *L. nobilis*, *S. calamintha* Scheele et *M. pulegium* à deux concentrations (CMI et $\frac{1}{2}$ CMI, 28 $\mu\text{L}/\text{mL}$ et 14 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour *M. pulegium* dans le cas de *L. innocua*), observés après 280 min de contact. (n=2).

Il faut également noter qu'en présence de l'huile essentielle de *S. calamintha*, le changement de l'anisotropie du TMA-DPH était plus important que celui du DPH. En effet, ce marqueur est situé au niveau de la face externe de la membrane, il est probablement plus facilement sujet à des variations que le DPH qui lui est situé à l'intérieur. Au contraire, en présence de l'huile de *M. pulegium*, le changement de l'anisotropie du DPH était plus important que celui du TMA-DPH. Probablement, cette huile essentielle agit plus au cœur de la bicouche lipidique des membranes qu'à la face externe.

3. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer l'effet de trois huiles essentielles (*Laurus nobilis*, *Satureja calamintha* Scheele et *Mentha pulegium*) sur la viabilité cellulaire, l'intégrité membranaire ainsi que la fluidité membranaire de deux souches : *Listeria innocua* LRGIA01 (Gram positive) et *Escherichia coli* CECT 471 (Gram négative), ainsi que la mise en évidence de la présence de cellules viables mais non cultivables (VNB) après traitement par ces huiles essentielles.

Après traitement des cellules par chacune des huiles essentielles et à l'aide de la technique de microscopie d'épifluorescence en utilisant le Kit de viabilité LIVE/DEAD® BacLight™ en parallèle avec un dénombrement en milieu gélosé ; une réduction de la viabilité cellulaire est démontrée par le dénombrement de cellules viables et cultivables. Une comparaison entre les résultats obtenus pour les cellules viables et celles cultivables a mis en évidence l'existence de cellules VNC, pouvant être dans un état transitoire avant la mort cellulaire.

Le marquage des cellules par l'iodure de propidium (IP) indique une perte du potentiel et de la perméabilité membranaire donc de l'intégrité membranaire de la majorité des cellules traitées aux huiles essentielles.

La technique d'anisotropie de fluorescence par les deux fluochromes (TMA-DPH et DPH) confirme que la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes a été la cible de l'effet des huiles essentielles affectant leur fluidité. L'huile essentielle de *M. pulegium* agit différemment des deux autres huiles par fluidisation de la membrane à la face externe et interne. Tandis que les huiles essentielles de *L. nobilis* et *S. calamintha* donnent une membrane plus fluide à la surface et en même temps une rigidification de la bicouche lipidique au cœur de la membrane.

Chapitre 4 : Inactivation microbienne par les processus de conservation combinés aux huiles essentielles.

1. Evaluation de l'inactivation microbienne par application des barrières séparément

L'activité inhibitrice et bactéricide des différentes huiles essentielles étudiées vis à vis des bactéries pathogènes ou d'altération déterminée précédemment, a rapporté des informations sur les valeurs de CMI et CMB des huiles essentielles. Cependant, elles ont été obtenues à un pH neutre requis pour favoriser la croissance des microorganismes testés. Ces résultats ne nous donnent donc pas des informations suffisantes sur l'influence du pH du milieu du traitement spécialement les pH acides. Dans ce sens, la capacité d'inactivation microbienne des cinq huiles essentielles étudiées (*M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*) a été évaluée à deux pHs 4,0 et 7,0 en utilisant une concentration unique en huiles essentielles (0,2 µl/ml) inférieure aux valeurs de CMI et CMB obtenues. Aussi, l'inactivation des deux microorganismes par application de traitement thermique modéré (54°C, 10 min), d'un traitement de champ électrique pulsé modéré (25 pulses à 30 kV/cm) et d'un traitement HPH (175-400 MPa, 20 min) séparément et en combinaison avec les huiles essentielles a été étudiée. La récupération des microorganismes est faite en milieux sélectives et non sélectives. La réalisation de cette partie de recherche a été réduite à deux microorganismes *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes* EGD-e.

1.1. Inactivation microbienne en présence de faibles doses en huiles essentielles

L'application de 0,2 µl/ml de chaque huile essentielle à pH 4,0 ou 7,0 pendant 10 min (Figure 28) ne cause aucune inactivation significative d'*E. coli* O157:H7 (<0,1 log₁₀ cycles d'inactivation). Après 24 h de traitement, *E. coli* O157:H7 était légèrement plus sensible aux huiles essentielles à pH 4,0 (entre 0,3 à 0,6 log₁₀ cycles d'inactivation selon les huiles). Alors qu'à pH 7,0, l'inactivation de la souche reste non significative après 24 h de traitement (<0,2 log₁₀ cycles d'inactivation).

L'exposition de *L. monocytogenes* EGD-e à 0,2 µl/ml de chaque huile essentielle pendant 10 min montre que cette souche est légèrement plus sensible aux effets des huiles essentielles par rapport à *E. coli*, mais l'inactivation reste quand même non significative (<0,2 log₁₀ cycles d'inactivation) à part pour l'huile de *L. stoechas* à pH 4,0 (0,4 log₁₀

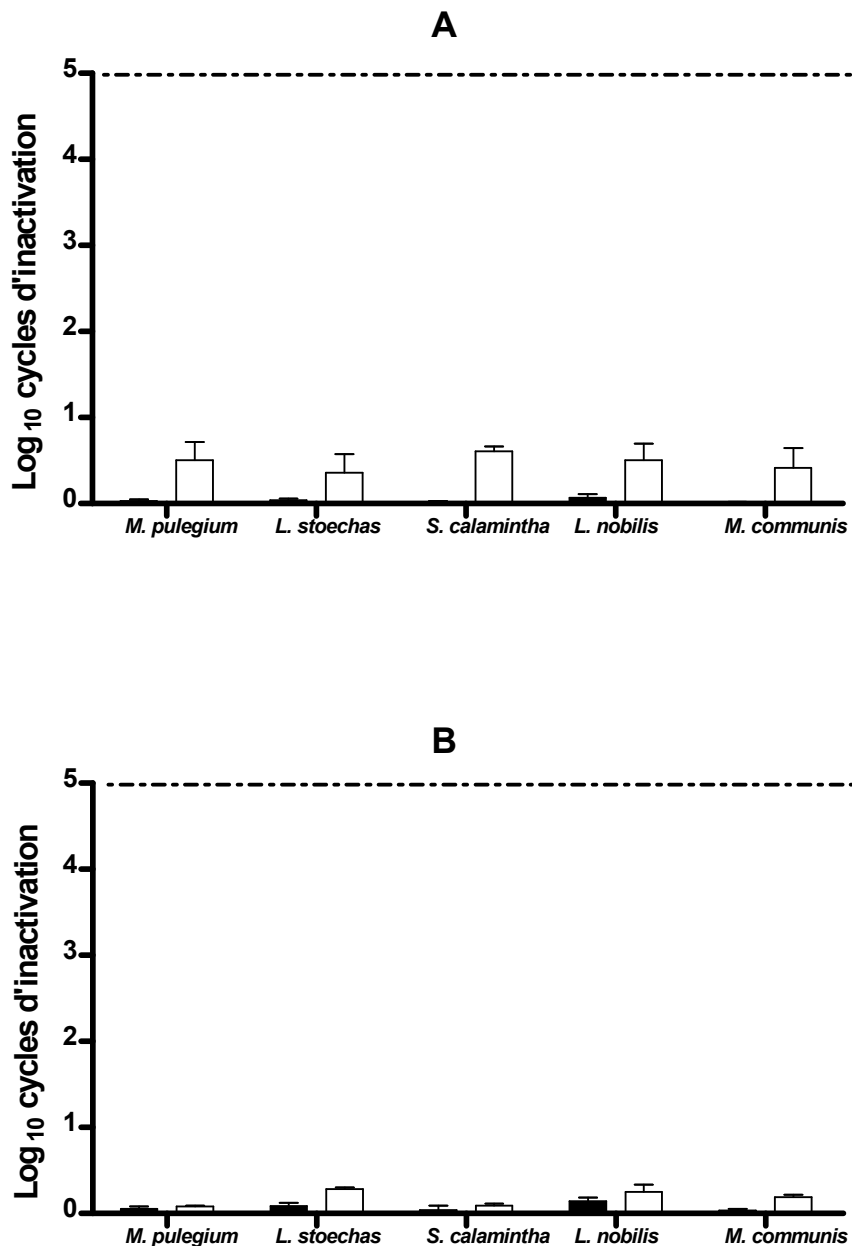


Figure 28. Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement de 10 min (■) et de 24 h (□) à température ambiante dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B) en présence de 0,2 µl/ml des huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*. Les cellules survivantes ont été récupérées dans le milieu TSAYE. Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type.

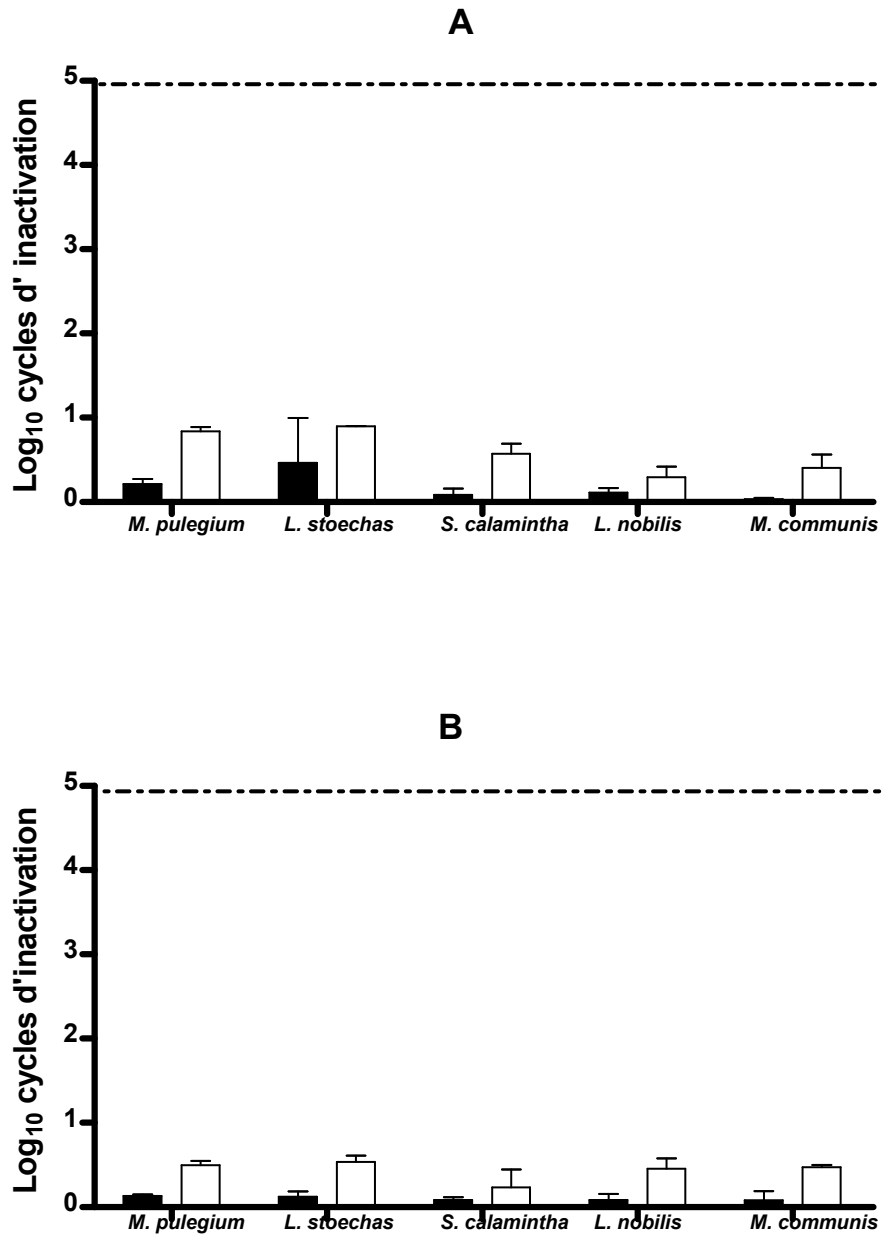


Figure 29. Cycles logarithmiques d'inactivation de *L.monocytogenes* EDG-e après un traitement de 10 min (■) et de 24 h (□) à température ambiante dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B) en présence de 0,2 µl/ml des huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*. Les cellules survivantes ont été récupérées dans le milieu TSAYE. Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type.

cycles d'inactivation). Après 24 h de traitement, l'inactivation reste faible, toutefois elle est plus importante que celle obtenue dans le cas d'*E. coli* (dans les environs de 0,5 log₁₀ cycles d'inactivation à pH 7,0) et on remarque que l'huile de *M. pulegium* et *L. stoechas* étaient les plus actives à pH acide (0,8 et 0,9 log₁₀ cycles d'inactivation respectivement). Les résultats montrent que la prolongation de la durée d'incubation à 24 h réussit à peine à augmenter l'inactivation microbienne et n'étant pas capable d'assurer les 5 cycles d'inactivation dans l'une des conditions testées.

1.2. Inactivation microbienne par un traitement thermique modéré

L'application d'un traitement thermique modéré de 54°C pendant 10 min à la souche *E. coli* O157:H7 cause l'inactivation de 1,7 log₁₀ de cycles cellulaires à pH 4,0 (Figure 30A) et de < 1 log₁₀ de cycles cellulaires à pH 7,0 (Figure 30B). Alors que l'exposition de *L. monocytogenes* EGD-e au même traitement à pH 4,0 (Figure 31A) cause l'inactivation de 2,7 log₁₀ de cycles cellulaires et 0,9 log₁₀ de cycles cellulaires à pH 7,0 (Figure 31B).

On remarque que les cellules survivantes ont subi des dommages sub-létaux. En effet, le traitement thermique affecte les enveloppes cellulaires les rendant sensibles à la présence du NaCl et du sel biliaire dans les milieux de récupération. Ce traitement affecte les cellules survivantes d'*E. coli*, causant 2,9 log₁₀ cycles de dommages sub-létaux dans la membrane cytoplasmique (TSAYE-NaCl) des cellules survivantes et 4,7 log₁₀ cycles de dommages sub-létaux dans la paroi cellulaire (TSAYE-SB) à pH 4,0. Au même pH (4,0), les cellules de *L. monocytogenes* subissent 4,8 log₁₀ cycles de dommages dans la membrane cytoplasmique (TSAYE-NaCl). Le nombre des cellules stressées détectées était supérieur au pH acide qu'au pH 7,0.

En effet, à pH 7,0 seulement 2 log₁₀ cycles de *L. monocytogenes* étaient endommagés; alors que 1,7 log₁₀ cycles de cellules d'*E. coli* étaient endommagés à la membrane cytoplasmique et 3 log₁₀ cycles de cellules endommagés à la paroi cellulaire.

1.3. Inactivation microbienne par un traitement au champ électrique pulsé

Un traitement au champ électrique pulsé de 25 impulsions à 30kV/cm provoque l'inactivation de 0,6 et 1 log₁₀ cycles d'*E. coli* à pH 4,0 et 7,0 respectivement (Figure 32). Alors que 0,4-0,9 extra log₁₀ cycles de survivants ont été endommagés à pH 4,0 et 1,2-2 extra log₁₀ cycles de survivants à pH 7,0. Il apparaît d'après les résultats qu'*E. coli* a

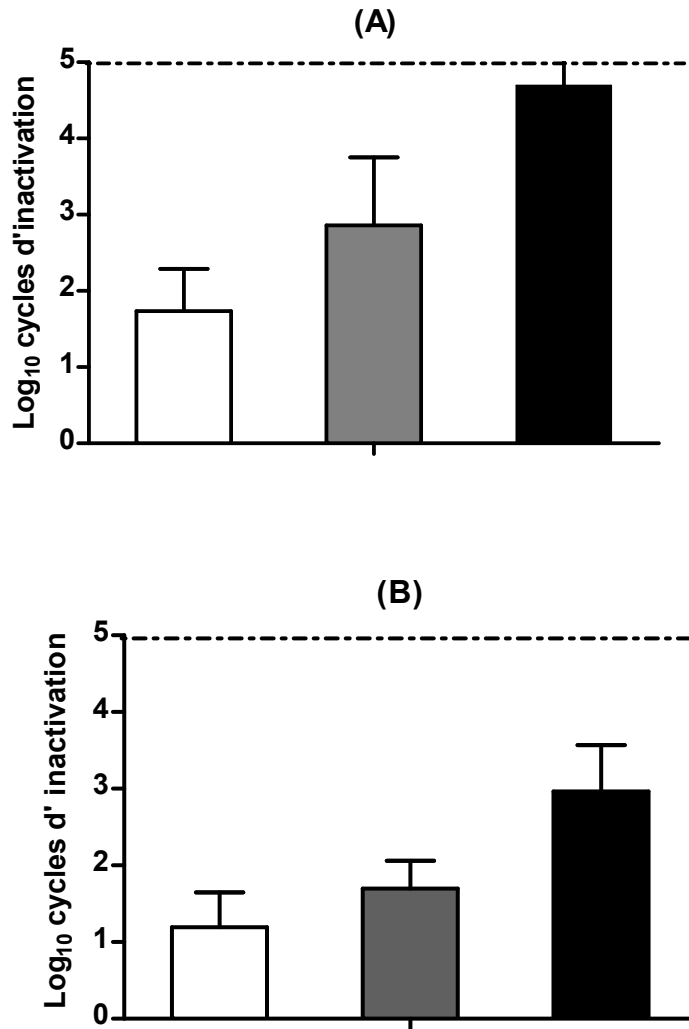


Figure 30. Cycles logarithmiques d'inactivation d' *E. coli* O157:H7 après un traitement thermique modéré (54°C, 10 min) dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs : TSA à 3% NaCl (■) et TSA à 0,35% en Sels Biliaires (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

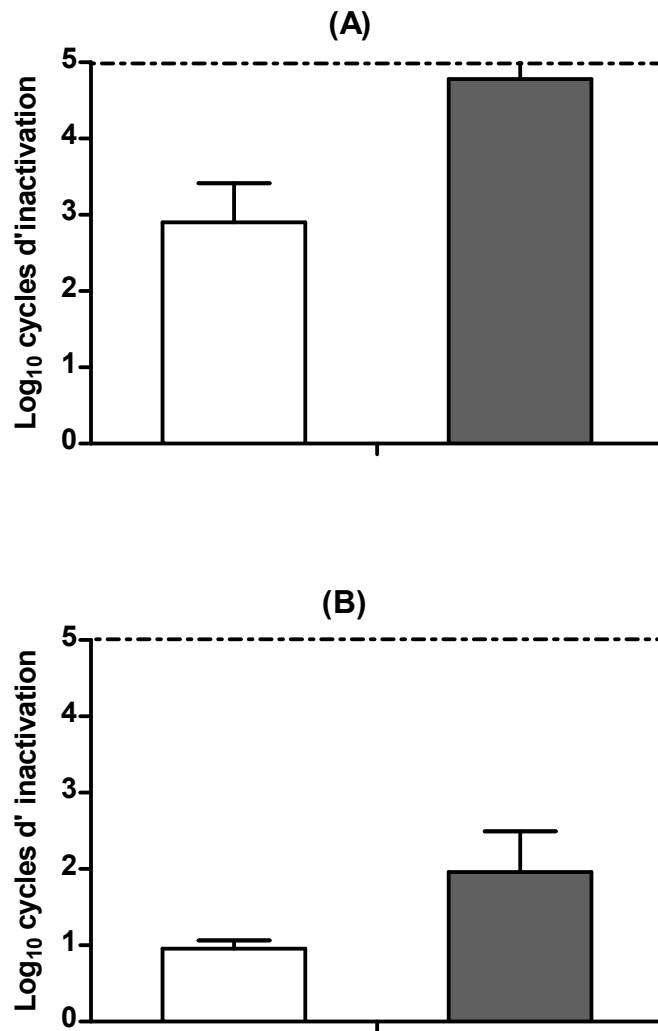


Figure 31. Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement thermique modéré (54°C, 10 min) dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs TSA à 6% NaCl (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

montré une plus grande sensibilité au traitement à pH 7,0 que 4,0, alors que *L. monocytogenes* été beaucoup plus résistante à pH 7,0.

En effet, ce traitement a causé l'inactivation de 2,1-0,2 log₁₀ cycles cellulaires de *L. monocytogenes* à pH 4,0 et 7,0 respectivement (Figure 33) avec 0,6-0,4 extra log₁₀ cycles de survivants endommagés à pH 4,0 et 7,0 respectivement.

1.4. Inactivation microbienne par un traitement de haute pression hydrostatique

Puisque les souches d'*E. coli* et *L. monocytogenes* ont montré de grandes différences dans la résistance aux HPH, il n'était pas possible de définir un traitement unique pour toutes les souches qui nous permettra de mettre en évidence l'action synergétique de la combinaison des HPH et des huiles essentielles. La souche *E. coli* était plus résistante aux HPH que *L. monocytogenes*. En effet, 1-0,3 log₁₀ cycles d'inactivation d'*E. coli* ont été atteintes après un traitement de 400 MPa pendant 20 min aux pHs 4,0 et 7,0 respectivement (Figure 34). Un traitement HPH de 175 MPa pendant 20 min était capable d'inactiver 0,8 log₁₀ cycles cellulaires de *L. monocytogenes* au pH 4,0. A pH 7,0, alors q'un traitement HPH de 375 MPa pendant 20 min a pu inactiver 0,5 log₁₀ cycles cellulaires de *L. monocytogenes* (Figure 35). Tous les traitements appliqués aux deux pHs et aux deux souches ont pu causer des dommages sublétaux aux bactéries allant jusqu'à plus de 5 log₁₀ cycles cellulaires.

2. Evaluation de l'inactivation microbienne par les processus de préservation combinés avec les huiles essentielles

L'application combinée des processus de conservation et des huiles essentielles peut avoir des effets additifs quand le niveau d'inactivation obtenu est égal à l'addition des effets obtenus par les traitements de conservation et les huiles essentielles agissant séparément. Alors que les effets synergétiques sont obtenus lorsque les effets létaux du processus combiné sont significativement supérieurs à la somme obtenue en appliquant les deux traitements séparément.

2.1. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement thermique modéré

La Figure 36 montre l'inactivation d'*E. coli* O157: H7 et *L. monocytogenes* EGD-e par un traitement thermique modéré (54°C /10 min), seul ou en combinaison avec 0,2µl/ml

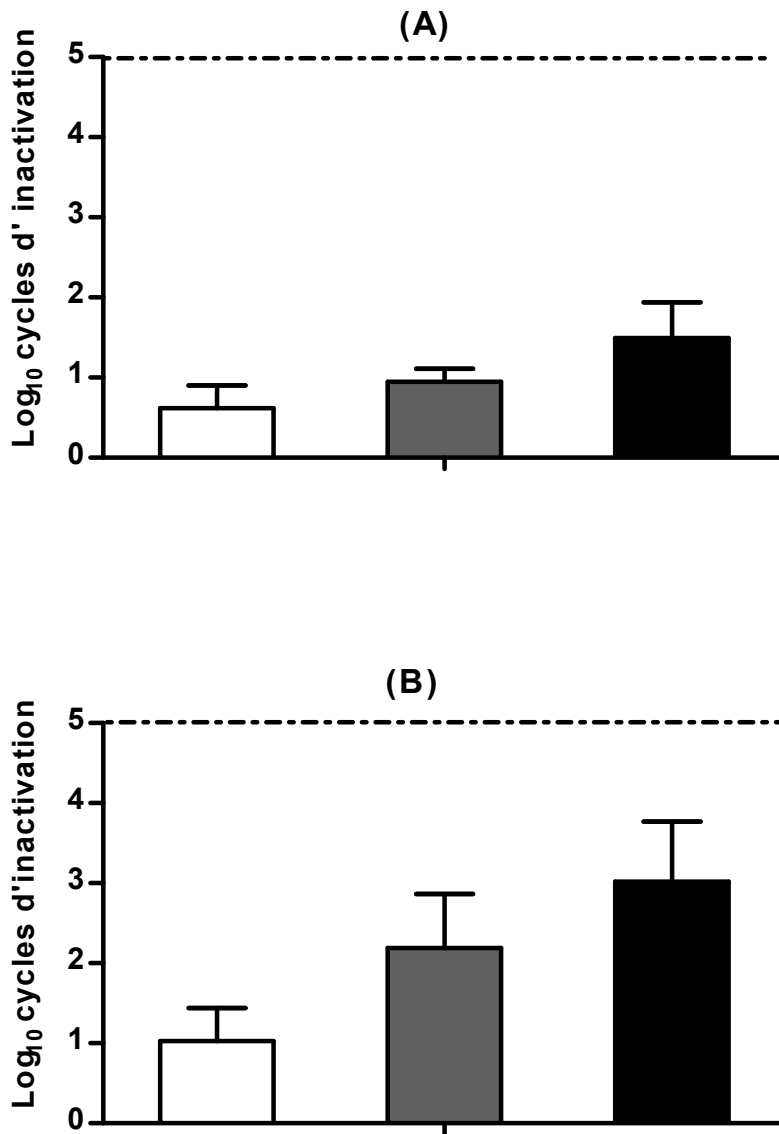


Figure 32. Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement au champ électrique pulsé (25 pulses, 30Kv/cm), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs : TSA à 3% NaCl (■) et TSA à 0,35% en Sels Biliaires (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

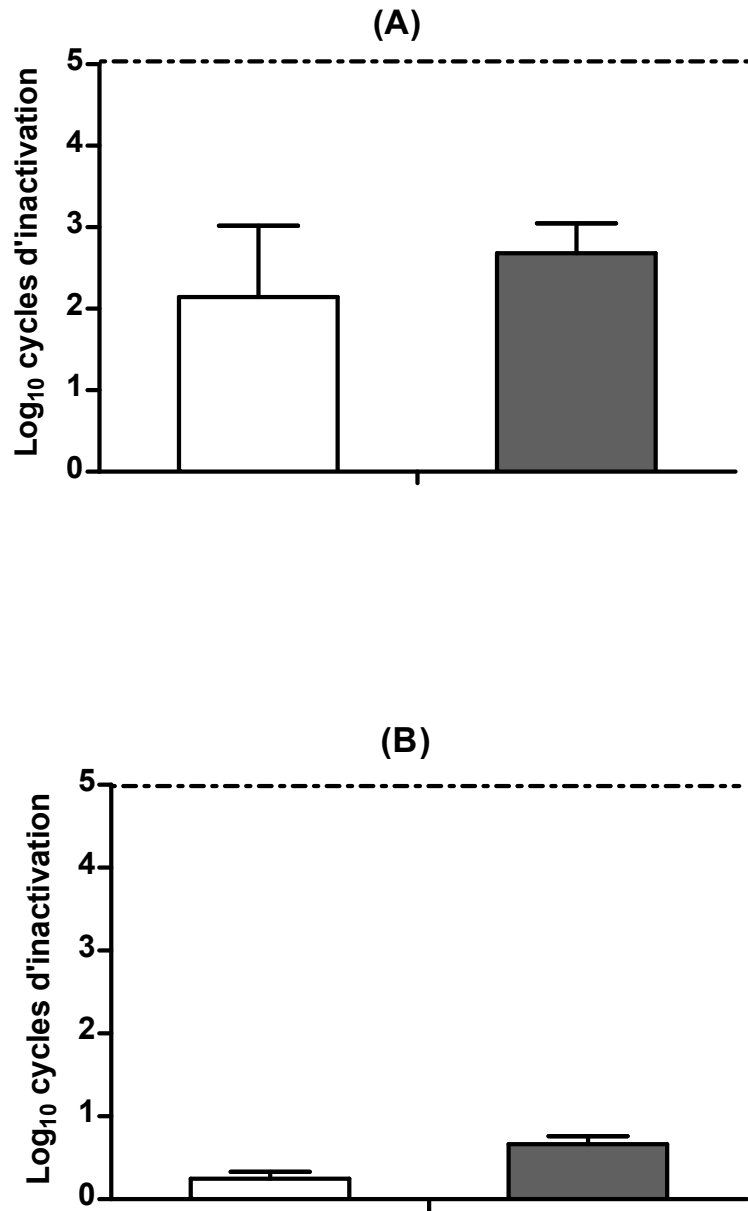


Figure 33. Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement au champ électrique pulsé (25 pulses, 30kV/cm), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs TSA à 6% NaCl (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

de chacune des huiles essentielles à un pH 4,0 ou 7,0. On remarque que l'action du traitement thermique en présence de 0,2 µl/ml de chacun des huiles essentielles était beaucoup plus efficace que la somme des deux méthodes agissant seules; un remarquable effet synergétique est donc observé. La combinaison de chacun des huiles essentielles avec la chaleur modérée cause l'inactivation de 5 log₁₀ cycles de *L. monocytogenes* à pH 4,0. Aussi, la combinaison de l'huile essentielle de *M. pulegium* et de *L. stoechas* avec la chaleur cause l'inactivation de 5 log₁₀ cycles de *L. monocytogenes* à pH 7,0 montrant de remarquables effets synergétiques létaux. L'effet des huiles essentielles de *L. nobilis* et de *M. communis* en combinaison avec la chaleur sur l'inactivation de *L. monocytogenes* à pH 7,0 est moins effectif atteignant 3,3 log₁₀ cycles.

Près de 4 à 4,25 log₁₀ cycles d'inactivation d'*E. coli* ont été atteinte lorsque 0,2 µl/ml des huiles essentielles de *L. nobilis* et *M. communis* ont été combinés avec la chaleur aux deux pHs. La combinaison des huiles de *M. pulegium* et *L. stoechas* était plus efficace dans l'inactivation de cette souche à pH 4,0 avec près de 5 cycles logarithmiques d'inactivation. L'huile de *S. calamintha* combinée avec le traitement thermique n'a pas montré la moindre efficacité dans l'inactivation d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* à pH 7,0.

2.2. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement au champ électrique pulsé

L'application simultanée de ce traitement (25 impulsions, 30 Kv/cm) avec les huiles essentielles (0,2 µl/ml) n'exerce pas d'effet synergique léthal sur l'inactivation de *L. monocytogenes* aux deux pHs dans les conditions expérimentales étudiées (Figure 37B). Des effets synergétiques faibles ont été observés seulement dans l'inactivation d'*E. coli* (Figure 37A) à pH 7,0 en présence de l'huile essentielle de *L. stoechas* (1,5 extra log₁₀ cycle d'inactivation), de *M. communis* et *L. nobilis* (0,7-0,4 extra log₁₀ cycle d'inactivation). Alors qu'aucun effet synergique ou additionnel est observé dans le cas de la combinaison du traitement avec les huiles essentielles de *S. calamintha* et *M. pulegium*.

Quand la souche d'*E. coli* est traitée à pH 4,0, seulement 0,7 extra log₁₀ cycle d'inactivation ont été enregistré en présence des huiles essentielles de *M. pulegium*, *M. communis* et *L. stoechas* et 0,8 extra log₁₀ cycle d'inactivation en présence de *L. nobilis*.

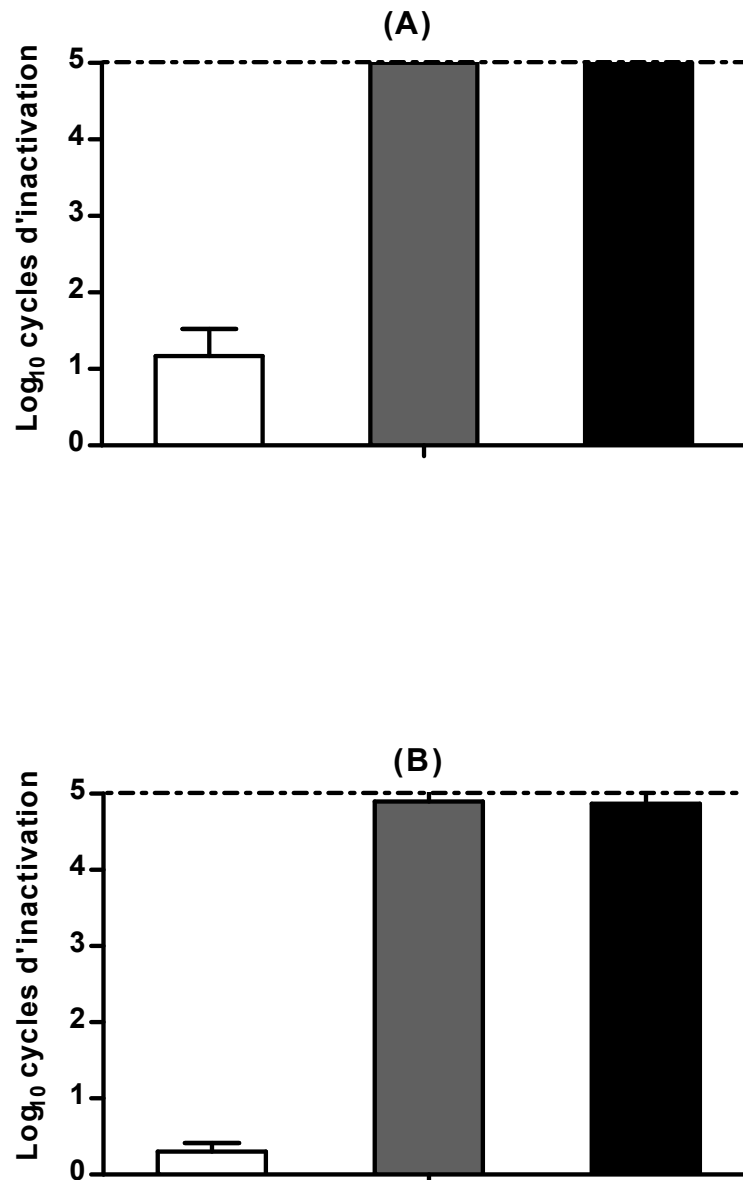


Figure 34. Cycles logarithmiques d'inactivation d'*E. coli* O157:H7 après un traitement aux hautes pressions hydrostatiques (400MPa, 20 min), dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) et pH 7,0 (B). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs : TSA à 3% NaCl (■) et TSA à 0,35% en Sels Biliaires (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

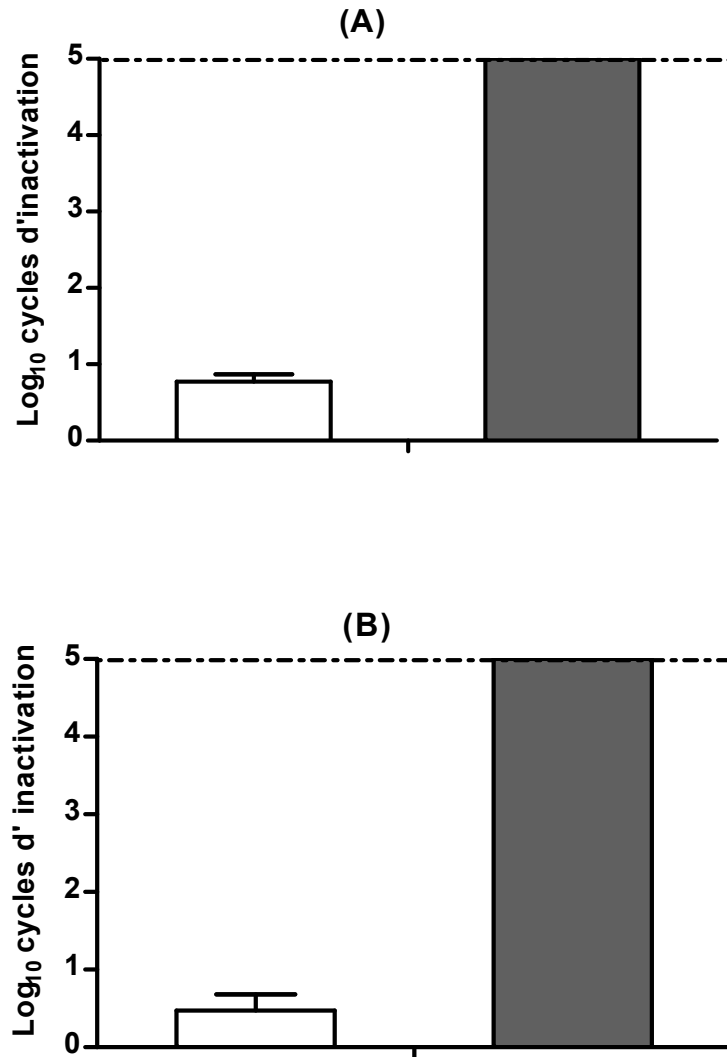


Figure 35. Cycles logarithmiques d'inactivation de *L. monocytogenes* EDG-e après un traitement aux hautes pressions hydrostatiques, dans un tampon citrate-phosphate de pH 4,0 (A) (175MPa, 20 min) et pH 7,0 (B) (325 MPa, 20 min). Les cellules survivantes ont été récupérées en milieu non sélectif TSAYE (□) et en milieux sélectifs TSA à 6% NaCl (■). Les résultats correspondent à la valeur moyenne de trois expériences indépendantes ± écart-type. La ligne en pointillés correspond à la limite de détection.

2.3. Combinaison des huiles essentielles avec un traitement aux hautes pressions hydrostatiques

Comme le montre la Figure 38, dans toutes les conditions testées, de remarquables effets synergétiques létales ont été observés lorsque les deux traitements sont appliqués simultanément. Ainsi, jusqu'à 4 extra \log_{10} cycles d'inactivation d'*E. coli* sont atteints quand ce procédé est combiné avec *L. stoechas* et *L. nobilis* au deux pHs et avec *M. communis* au pH 7,0. Alors que près de 3 extra \log_{10} cycles d'inactivation d'*E. coli* sont enregistrés en combinant ce procédé avec les huiles essentielles de *S. calamintha*, *M. pulegium* et *M. communis* à pH acide. L'huile essentielle de *M. communis* a montré plus d'efficacité en combinaison avec les HPH à pH basique que acide. A part le cas de la combinaison avec l'huile de *M. communis*, aucune différence significative n'a été observé en fonction du pH du milieu de traitement dans les processus combinés ($p < 0.05$).

En revanche, les huiles essentielles les plus efficaces (*L. stoechas*, *L. nobilis* et *S. calamintha*) en combinaison avec les HPH contre la souche *L. monocytogenes* dépendent du pH du milieu du traitement. En effet, les huiles essentielles de *L. stoechas*, *L. nobilis* et *S. calamintha* s'avèrent les plus efficaces en combinaison avec les HPH dans l'inactivation de *L. monocytogenes*.

Les huiles essentielles de *M. pulegium* et *M. communis* étaient les moins efficaces contre cette souche en combinaison avec ce traitement en comparaison avec les autres huiles. Cependant leurs effets synergitiques restent importants avec 2 extra cycles₁₀ cellulaires de réduction.

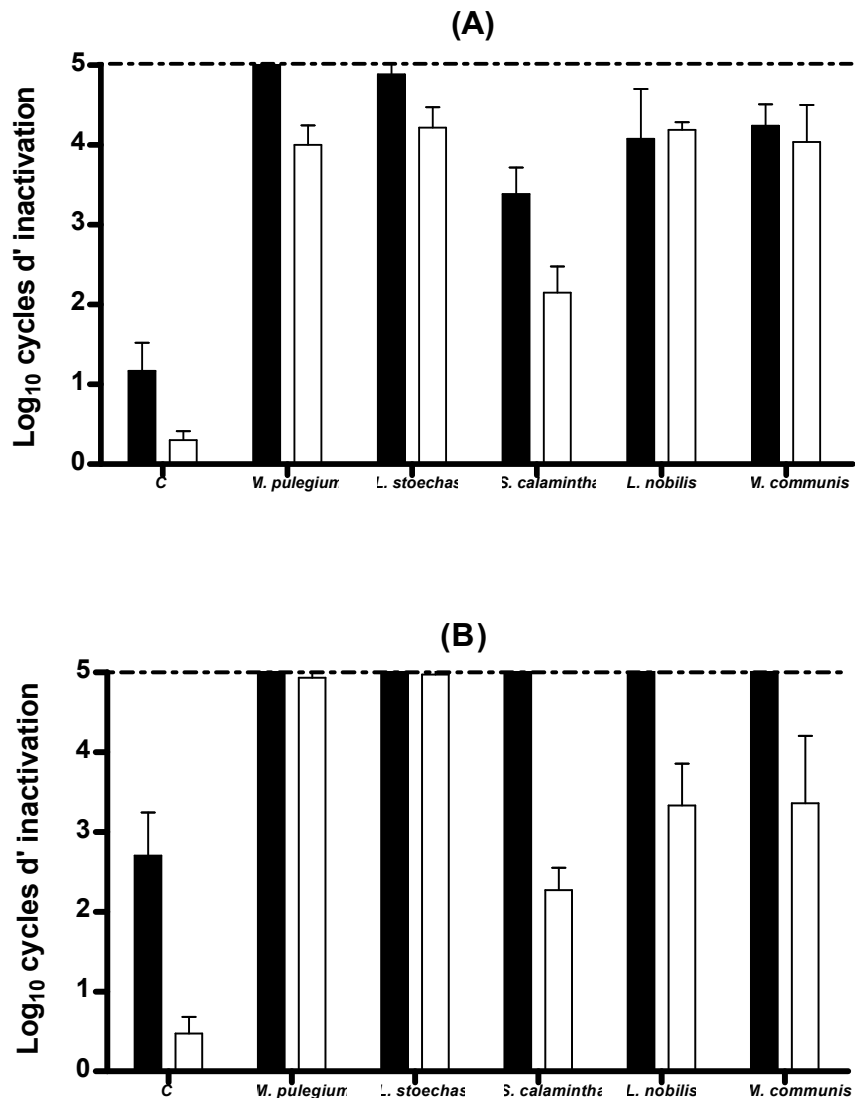


Figure 36. Inactivation d’*E. coli* O157:H7 (A) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) par un traitement thermique modéré (54°C, 10 min) (c) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*. Le traitement a été fait en tampon citrate-phosphate à pH 4,0 (■) et à pH 7,0 (□). Les cellules survivantes ont été récupérées sur TSAYE. Les résultats sont des moyennes de trois répétitions ± écarts-types. La ligne en pointillés représente la limite de détection.

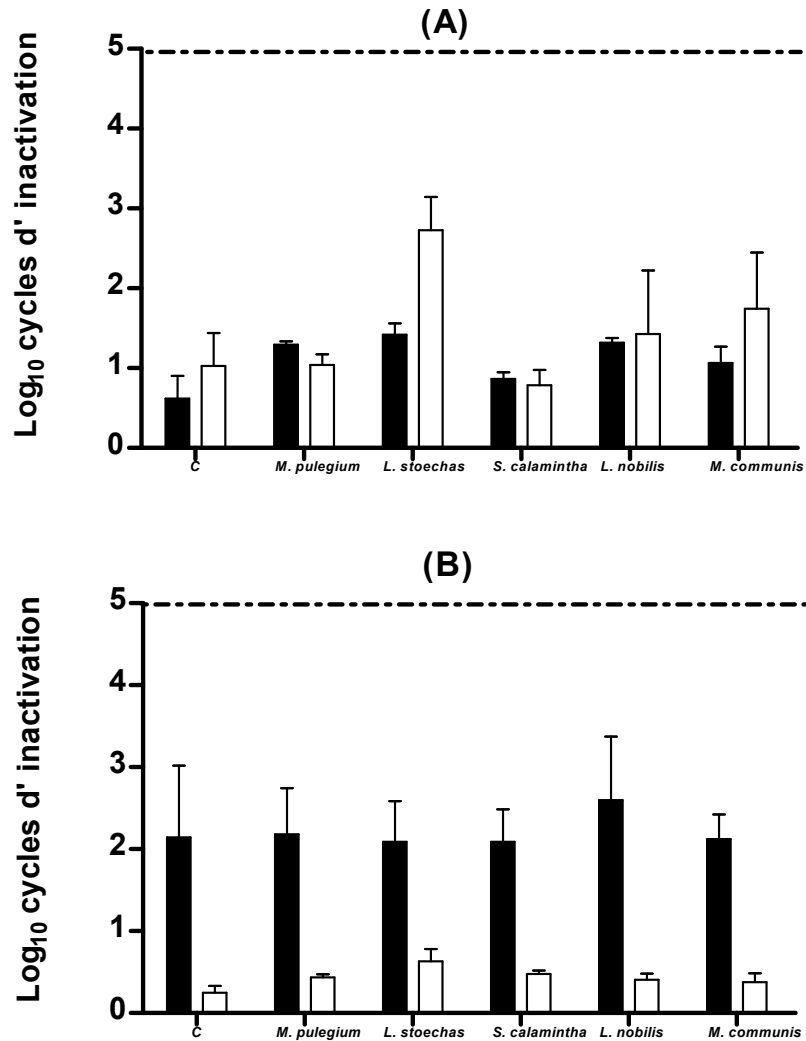


Figure 37. Inactivation d'*E. coli* O157:H7 (A) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) par un traitement au champ électrique pulsé (25 impulsions, 30 Kv/cm) (C) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*. Le traitement a été fait en tampon citrate-phosphate à pH 4,0 (■) et à pH 7,0 (□). Les cellules survivantes ont été récupérées sur TSAYE. Les résultats sont des moyennes de trois répétitions ± écarts-types. La ligne en pointillés représente la limite de détection.

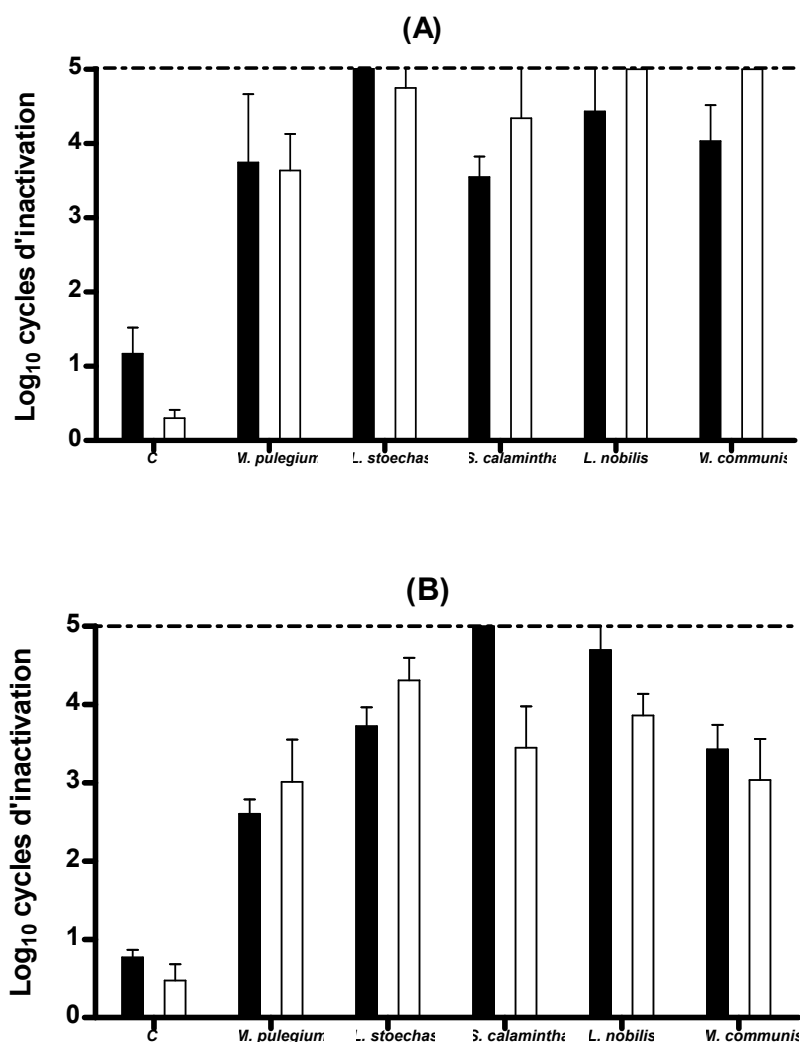


Figure 38. Inactivation d'*E. coli* O157:H7 (A) (400 MPa, 20 min) et de *L. monocytogenes* EGD-e (B) (175 MPa, 20 min à pH 4,0; 325 MPa, 20 min à pH 7,0) par un traitement des hautes pressions hydrostatiques (c) et en combinaison avec 0,2 µl/ml des huiles essentielles suivantes : *M. pulegium*, *L. stoechas*, *S. calamintha* Scheele, *L. nobilis* et *M. communis*. Le traitement a été fait en tampon citrate-phosphate à pH 4,0 (■) et à pH 7,0 (□). Les cellules survivantes ont été récupérées sur TSA YE. Les résultats sont des moyennes de trois répétitions ± écarts-types. La ligne en pointillés représente la limite de détection.

3. Conclusion

Les huiles essentielles appliquées seules à la concentration de 0,2 µl/ml ne présentaient pas d'action létale vis-à-vis des deux microorganismes étudiés. Dans le même sens, les trois traitements appliqués seuls aux conditions utilisées causent au plus 1 à 2 log₁₀ cycles d'inactivation. Cependant, le traitement thermique et les hautes pressions hydrostatiques montrent une haute proportion de cellules bactériennes d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* qui sont endommagées sub-létalement au niveau de la membrane et de la paroi bactérienne.

Des effets synergétiques remarquables atteignant jusqu' à 5 log₁₀ cycles cellulaires de réduction ont été obtenues en combinant les huiles essentielles avec un traitement thermique modéré (54°C/10 min) ou avec les hautes pressions hydrostatiques. Il faut noter l'efficacité des huiles essentielles de *M. pulegium*, *L. nobilis* et *L. stoechas* lorsqu'elles ont été combinées avec la température dans l'inactivation d'*E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes* EGD-e aux deux pHs. Aussi, les mêmes huiles essentielles ont montré l'efficacité en combinaison avec les HPH contre *E. coli* O157:H7. Les huiles essentielles de *S. calamintha* et *L. nobilis* étaient les plus efficaces contre *L. monocytogenes*. Cependant, l'application simultanée des huiles essentielles avec un traitement au champ électrique pulsé était beaucoup moins efficace avec des effets synergétiques faibles ou absents.

Les résultats obtenus confirment la possibilité de l'application d'alternatives aux traitements sévères, offrant un grand potentiel en réduisant l'intensité du traitement ainsi que les doses des antimicrobiens (les huiles essentielles) et par conséquent les effets négatifs sur les aliments tout en améliorant la sécurité alimentaire.

Chapitre 5 : Etude de l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*.

En industries agro-alimentaires, toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées par des micro-organismes et former des biofilms. En effet, la formation de biofilms surtout sur les chaînes de production entraîne souvent la contamination du produit avec comme risque final une infection du consommateur. Diverses souches bactériennes pathogènes et d'altération mais également des levures et des moisissures sont capables de s'implanter sur une surface et de former des biofilms qui leur confère une meilleure résistance aux traitements de désinfection et de nettoyage. Il est donc essentiel de mettre en place des mesures de prévention et de lutte. Dans l'objectif de maîtriser la sécurité microbiologique des aliments, il est donc nécessaire de posséder des techniques de lutte contre les biofilms notamment le nettoyage et la désinfection.

Dans ce chapitre, l'efficacité d'une solution désinfectante à base d'huile essentielle de *Laurus nobilis* a été démontrée dans le traitement des coupons d'acier inoxydable contenant des cellules de *Listeria innocua* LRGIA 01 en deux phases de formation de biofilms : phase d'adhésion (6 h) et un biofilm mature (48 h). L'huile essentielle a été testée à la concentration minimale inhibitrice (CMI= 8 µl/ml) auparavant déterminée sur des cellules en forme sessile.

1. Développement et désinfection d'un biofilm en phase d'adhésion

Une durée de culture de 6 h a été capable de former un biofilm de *L. innocua* en phase d'adhésion de 6,8 cycles cellulaires (Figure 39). Le nombre des cellules adhérees qui ont subi un traitement témoin sans huile essentielle n'as pas été affecté ni après 10 min ni après 30 min de contact avec la solution désinfectante témoin. Un nettoyage de 10 min avec une solution désinfectante à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* à la concentration de 8 µl/ml a pu réduire de 2 cycles cellulaires le nombre des cellules adhérees aux aciers inoxydables. Cependant, après 30 min de traitement avec une solution à base d'huile essentielle a pu réduire de 3 cycles cellulaires les cellules adhérees de *L. innocua*. Il apparaît qu'une augmentation du temps du traitement de 10 min à 30 min accroît de 1 Log₁₀ (UFC/ml) la réduction des cellules adhérees de cette souche.

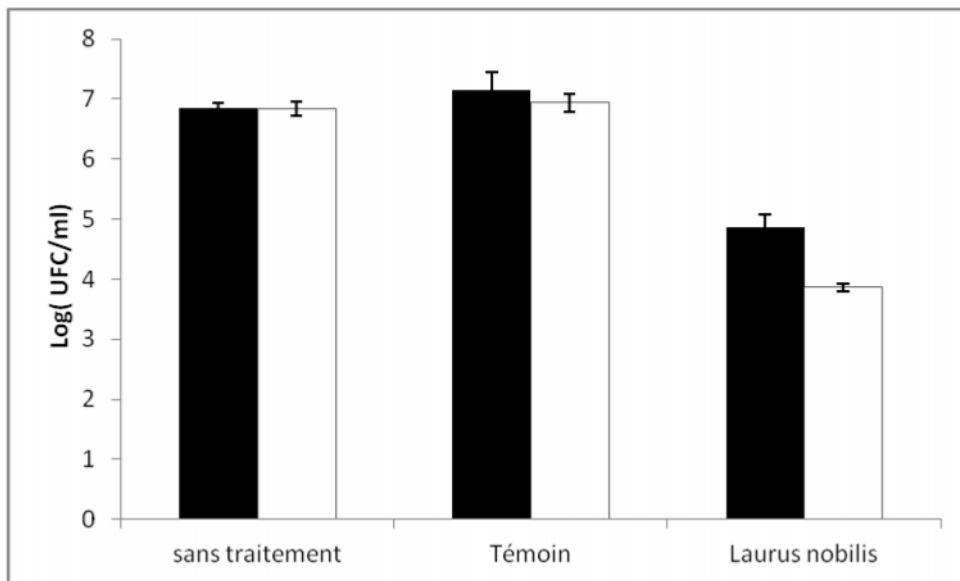


Figure 39. Nombre de cycles cellulaires de *L. innocua* LRGIA 01 adhérents aux coupons d'acier inoxydable AISI 304 obtenus d'une phase d'adhésion de 6 h après un traitement avec une solution désinfectante à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* testée à la concentration CMI (8 μ l/ml) comparés à un biofilm témoin et un biofilm sans traitement à deux temps de contact 10 min (■) et 30 min (□).

2. Développement et désinfection d'un biofilm mature de 48 h

Après 48 h de culture, un biofilm mature se forme sur les aciers inoxydables. Environ 6,7 Logs (UFC/ml) des cellules de *L. innocua* fixées sur les aciers inoxydables ont été atteints après 48 h de culture. L'utilisation de la solution témoin (sans ajout de l'huile essentielle) pendant 10 min ou 30 min de contact avec les aciers inoxydables, ne change pas le nombre des cellules fixées à la surface des coupons d'acier avec environ 6,7 Logs (UFC/ml) de cellules de *L. innocua*. Après un traitement de 10 min avec la solution désinfectante en présence de l'huile essentielle de *L. nobilis* à la concentration de 8 μ l/ml, environ 5,5 Logs (UFC/ml) de cellules de *L. innocua* fixées sur les coupons ont été dénombrés soit une réduction d'environ 1,21 Logs (UFC/ml). Un traitement de 30 min de contact avec la solution désinfectante à base de l'huile essentielle ne s'est pas avéré plus efficace avec 5 Logs (UFC/ml) de cellules de *L. innocua* fixées sur les coupons; soit environ 0,5 extra Logs (UFC/ml) de réduction en plus que ceux obtenus après un traitement de 10 min.

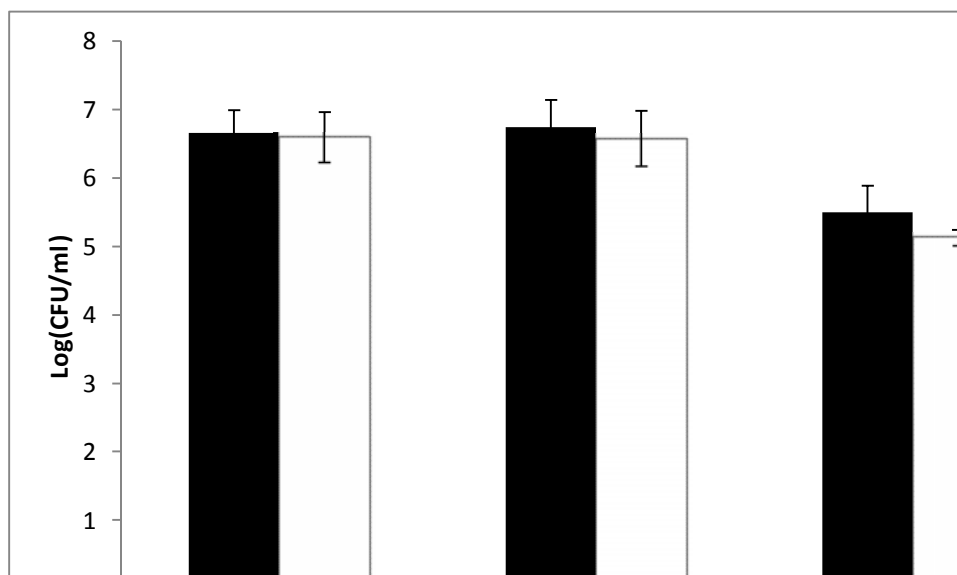


Figure 40. Nombre de cycles cellulaires de *L. innocua* LRGIA 01 adhérents aux coupons d'acier inoxydable AISI 304 obtenus d'une phase de formation de biofilm de 48 h après traitement avec une solution désinfectante à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* testée à la concentration CMI (8 µl/ml) comparés à un biofilm témoin et un biofilm sans traitement à deux temps de contact 10 min (■) et 30 min (□).

3. Conclusion

En conclusion, le nombre des cellules de *Listeria innocua* LRGIA 01 adhérentes aux coupons d'acier inoxydable au bout de 6 h de culture était d'environ 6,8 cycles cellulaires. L'augmentation du temps de culture à 48 h ne change pas le nombre des cellules déjà adhérentes aux coupons (6,7 Log (UFC/ml)) mais semble renforcer leur adhésion. L'efficacité de la solution désinfectante à base d'huile essentielle de *Laurus nobilis* contre le biofilm de 6 h de formation peut être attribuée au fait qu'à cette phase, les cellules sont encore à la phase d'adhésion réversible. Alors que l'élimination des cellules irréversibles (biofilm mature de 48 h) est plus difficile. Pour une plus grande efficacité dans l'élimination des biofilms, il est plus préférable d'augmenter le temps de traitement avec les solutions désinfectantes ou d'augmenter la concentration en huiles essentielles.

Discussion

Dans ce travail de recherche, dans un premier temps, on s'est centré sur la caractérisation de la composition chimique de cinq huiles essentielles extraites de plantes aromatiques et médicinales du Nord du Maroc (*Mentha pulegium*, *Satureja calamintha* Scheele, *Lavandula stoechas*, *Laurus nobilis* et *Myrtus communis*) ainsi que l'étude de leur capacité antioxydante par trois différents tests complémentaires. Deuxièmement, la détermination de l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles contre un large spectre de microorganismes pathogènes ou d'altération alimentaire (Gram-positives et Gram-négatives) ainsi que l'évaluation de leur activité antifongique vis-à-vis de deux souches fongiques, ont été étudiées. En visant d'approfondir la connaissance du mécanisme d'action des huiles essentielles, trois de ces huiles ont fait l'objet de l'étude de leurs effets sur l'intégrité membranaire, la fluidité membranaire ainsi que la viabilité cellulaire de deux souches bactériennes (*Listeria innocua* LRGIA01 et *Escherichia coli* CECT 471) et leurs capacités à affecter les enveloppes cellulaires. Nous avons aussi décrit le développement de processus combinés en évaluant l'existence des effets létaux synergétiques entre des traitements physiques et les cinq huiles essentielles selon le pH du milieu du traitement. Deux souches microbiennes ont été sélectionnées : *Listeria monocytogenes* EGD-e comme bactérie Gram positive et *Escherichia coli* O157: H7 comme bactérie Gram négative. Les huiles essentielles en faibles doses ainsi que les traitements physiques à la fois traditionnels (traitement thermique) où émergents tels que le champ électrique pulsé de haute intensité ou les hautes pressions hydrostatiques ont été aussi appliqués séparément et une description des dommages sub-létaux occasionnés par ces traitements physiques aux enveloppes cellulaires microbiennes a été réalisé. Finalement, l'effet anti-biofilm d'une huile essentielle (*Laurus nobilis*) a été testé sur un biofilm de *Listeria innocua* LRGIA01 en deux phase de formation; une phase d'adhésion de 6 h et un biofilm mature de 48 h.

1. Caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles

La caractérisation chimique des 5 huiles essentielles avait permis l'identification de 66 composés représentant 97,21% (*M. pulegium*), 83,38% (*S. calamintha*), 99,9% (*L. stoechas*), 82,54% (*L. nobilis*) et 99,97% (*M. communis*) des huiles essentielles (Tableau 8).

L'huile essentielle de *M. pulegium* était constituée de 8 composés dont les monoterpènes oxygénés représentaient la majorité (68,47%) et les hydrocarbures monoterpéniques (17,93%) suivies des sesquiterpènes hydrocarbures (5,58%) et oxygénés

(5,23%). Parmi les composés identifiés, on a noté la présence élevée du pulegone (33,65%), l'acétate α -Terpinenyl (24,29%), Bicyclo [3.1.0] hexane, 6-isopropylidene-1-méthyl- (12,59%), et le 1,8-Cineole (10,53%). Diverses études sur la composition chimique de cette huile essentielle ont été publiées, révélant une grande variabilité dans le profil chimique de cette plante (Lorenzo et al., 2002; Mkaddem et al., 2007; Mahboubi et Haghi, 2008; Hajlaoui et al., 2009; Derwich et al., 2010). En effet, certains composés sont fréquemment présents dans la composition de cette huile et deux chimiotypes peuvent être décrits; un chimiotype à pipéritone-piperitenone (Mahboubi et Haghi, 2008; Derwich et al., 2010) et un chimiotype à pulegone (Hajlaoui et al., 2009). La composition de l'huile essentielle de *M. pulegium* décrite dans cette étude est relativement en accord avec certains rapports qui ont montré que le pulegone est le composant majoritaire de cette huile (70-30%) soulignant que cette huile est du chimiotype pulegone (Lorenzo et al., 2002; Aghel et al., 2004; Benayad, 2008; Hajlaoui et al., 2009; Kamkar et al., 2010; Ait-Ouazzou et al., 2012a). En revanche, les composés pipéritone ou menthone n'ont pas été trouvés dans notre huile, alors que les composés 1,8-cineole, α -pinène et α -humulène sont présents mais en plus grande proportion.

La caractérisation chimique de l'huile essentielle de *L. stoechas* a montré un profil chimique distinct des autres huiles étudiées dans ce travail. En effet, le groupe majoritaire dans cette plante était les sesquiterpènes hydrocarbures (42,33%) et oxygénés (23,77%). Les monoterpènes ne représentaient que 18,62% du total de l'huile dont la majorité sont des oxygénés (14,46%). Parmi les 21 constituants identifiés dans cette huile essentielle, le 10s,11s-Himachala-3(12),4-diene (23,62%), le cubenol (16,19%), méthyl eugénol (6,19%), et δ -Cadinène (5,31%) étaient les composés majoritaires (Tableau 8). La comparaison de la composition chimique de cette plante avec ceux d'autres pays a montré des variations qualitatives et quantitatives importantes. Skoula et al., (1996) et Hassiotis (2010) travaillant sur l'huile essentielle de *L. stoechas* de la Grèce ont trouvé que le fenchone (44,8 – 45,2 %), 1,8 cineole (16,87 – 16,3 %) et le camphre (6,2 – 9,9 %) étaient les composés majeurs. D'autres études sur l'huile essentielle de la lavande de la Tunisie, de la Turquie et du Maroc ont rapporté aussi la présence du fenchone (68,2%, 32,03% et 30% respectivement) et le camphre (11,2%, 14,71%, 18% respectivement) comme constituants majoritaires (Zrira et Benjilali, 2003; Bouzouita et al., 2005; Sultan et al., 2007). En revanche comme le montre le tableau 8, le fenchone, le 1,8 cineole ont été identifiés dans

notre huile mais en faible pourcentage en comparaison avec la littérature, alors que le camphre était absent.

L'huile essentielle de *S. calamintha* était dominée par la présence de composés monoterpéniques dont 61,92% sont des hydrocarbures et 13,53% des oxygénés, alors que les sesquiterpènes se trouvaient en pourcentage très inférieur (7,93%). Entre les principaux constituants identifiés, on note la présence élevée du 1,8-cineole (42,94%) qui en plus de β -phellandrène (11,39%), pinocamphone (9,88%), cis-isopulegone (2,58%) et menthone (2,28%) constituent les composés majoritaires. Selon la présence et la quantité des composés dominants dans cette plante, on note une variabilité importante en comparaison avec les données précédemment publiées. La composition chimique de notre plante était différente de celle de la même plante d'origine du Portugal dont la composition était dominée par le cis-isopulegone (75,2%) et le pulegone (6,9%) (Castilho et *al.*, 2007). L'huile essentielle de la même plante d'origine turque, est constituée du cis-piperitoneoxide (21.8 %), limonène (15.7 %), piperitenoneoxide (10.5 %) et caryophyllèneoxide (4.0 %) comme composés majoritaires (Alan et *al.*, 2010).

La composition de l'huile essentielle de *L. nobilis* a été caractérisée principalement par la présence des monoterpènes hydrocarbures (32,55%) et oxygénés (40,59%) avec seulement 5,72% de composés sesquiterpéniques. Les composants majoritaires de cette huile sont le 1,8-cineole (39,81%), le 2-carene (13,08%), trans-ocimène (7,05%), sabinène (6,17%) et trans-caryophyllène (2,74%) (Tableau 8). Le profil chimique de l'huile essentielle de *L. nobilis* est en accord avec ceux observés de la même plante dans divers pays; du Maroc (Derwich et *al.*, 2009), Turquie (Sangun et *al.*, 2007), Tunisie, Algérie (BenJemâa et *al.*, 2012), Iran (Verdian-rizi et *al.*, 2009), Argentine (Di Leo Lira et *al.*, 2009) et Italie (Carreda et *al.*, 2002; De Corato et *al.*, 2007; 2010) avec une proportion élevée en 1,8 cineole. Cependant, on a noté l'absence ou la présence de certains composants. En effet, l'acétate d' α -Terpinyle présent dans la composition chimique de cette huile dans divers rapports (Politeo et *al.*, 2007; Derwich et *al.*, 2009; Di Leo Lira et *al.*, 2009) était absent dans notre huile essentielle. Un autre constituant le 2-carène présent à un pourcentage de 13,08% était absent dans la plupart des huiles essentielles de cette plante mais sa présence a été notée dans l'huile de *L. nobilis* du Maroc mais à plus faible proportion (5,62%) (Derwich et *al.*, 2009).

L'huile essentielle de *M. communis* a été aussi prédominée par la fraction monoterpénique (76,02% des monoterpènes oxygénés et 18,97% des monoterpènes

hydrocarbures) avec une absence de composés sesquiterpéniques. Le composant fondamental de cette huile est l'acétate de myrtényl (49,27%) conjointement avec le 1,8 cineole (26,93%), α -pinène (16,52%) et méthyl eugénol (4,8%) comme composés majoritaires. Diverses études ont mentionné la présence du l'acétate de myrtényl comme composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. communis* conjointement au 1,8 cineole et α -pinène mais avec des variations dans les proportions (Boelens et Jimenez, 1994; Gardeli et al., 2008; Pereira et al., 2009; Mimica-Dukić et al., 2010). Selon divers rapports, l'huile essentielle de Myrte peut être séparée en deux groupes dépendant de la proportion du l'acétate de myrtényl et du α -pinène et leur taux par rapport à 1,8 cineole (Yadegarinia et al., 2006; Aidi Wannas et al., 2010; Akin et al., 2010; Mahboubi et Ghazian Bidgoli, 2010).

Les différences dans la composition chimique de certaines huiles essentielles en comparaison avec celles dans d'autres études publiées peuvent être dues à divers facteurs tels que la différence dans les origines géographiques, les conditions climatiques et saisonnières, le temps de la collecte, le stade de développement de la plante, la méthode d'extraction des huiles essentielles mais aussi l'existence de divers chimiotypes (Burt, 2004; Ait-Ouazzou et al., 2011a). Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés majoritaires et minoritaires ce qui rend souvent difficile l'explication de leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Burt, 2004; Tepe et al., 2005).

2. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles peut être attribuée à divers mécanismes du fait que les huiles sont formées de mélanges complexes de composés chimiques et présentent divers groupes fonctionnelles (Tepe et al., 2006), ce qui peut mener à des résultats variables selon le test employé. Ainsi, l'utilisation de plusieurs méthodes analytiques complémentaires est recommandée pour l'évaluation de l'efficacité antioxydante des huiles essentielles (Sacchetti et al., 2005; Sarikurkcu et al., 2010). Dans notre travail, l'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée par trois différents tests: Le test du DPPH, le test du blanchissement du β -carotène et le test du pouvoir réducteur.

Pour une évaluation de la capacité des huiles essentielles à piéger les radicaux libres, on a utilisé le test au DPPH qui est un radical libre qui accepte un électron ou un radical hydrogène pour se convertir en une molécule stable. L'activité du piégeage des radicaux

libres reflète donc le potentiel d'un composé à retarder l'oxydation (Tepe et *al.*, 2005). La capacité de réduction du radical libre DPPH est déterminée en mesurant la diminution de son absorbance à 517nm induites par les antioxydants. Le pouvoir réducteur mesure la capacité d'un composé d'agir en tant que donneur d'électron et donc de réagir avec les radicaux libres les convertissant en des molécules plus stables et par conséquent terminer les réactions radicalaires en chaîne (Gholivand et *al.*, 2010). La mesure de ce pouvoir est basée sur la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence des antioxydants. Alors que le test du blanchissement du β -carotène est basé sur la décoloration du β -carotène suite à sa réaction avec les radicaux libres formés par l'oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. Les composés antioxydants interviennent en neutralisant les radicaux libres issus de l'oxydation de l'acide linoléique prévenant ainsi la décoloration du β -carotène (Bouhdid, 2009). Le choix du test à appliquer doit répondre aux objectifs qu'on veut atteindre dans chaque étude. Ainsi, par exemple si on recherche une huile essentielle active dans les aliments gras, il faut appliquer le test β -carotène/acide linoléique.

D'après les résultats obtenus, l'huile essentielle de *L. nobilis* a montré une efficacité antioxydante importante pour les trois tests réalisés et loin de celle exprimée par les autres huiles essentielles même à la plus faible concentration testée. Ce qui rend son éventuelle application intéressante dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique mais surtout dans le domaine agroalimentaire. Les huiles essentielles de *L. stoechas* et *M. pulegium* se sont avérées aussi des antioxydants actifs mais de moindre efficacité que *L. nobilis*, alors que les huiles de *M. communis* et *S. calamintha* ont montré le plus faible pouvoir antioxydant et cela par les trois tests. Les huiles essentielles testées dans cette étude ont montré des capacités antioxydantes plus importantes par le test de blanchissement au β -carotène et le test de piégeage du radical DPPH. Ce qui prouve que l'activité antioxydante des huiles essentielles dépend du système utilisé pour tester cette action (Tajkarimi et *al.*, 2010). L'estimation de l'effet antioxydant des huiles essentielles à différentes concentrations par les trois tests a permis de conclure que ces huiles inhibent l'oxydation d'une façon dose dépendante.

En relation avec nos résultats, de nombreux rapports ont démontré que l'huile essentielle de Laurier exprime une activité antioxydante importante par la méthode du piégeage du radical DPPH et le test de blanchissement du β -carotène (Politeo et *al.*, 2007; Ozcanet *al.*, 2010). Dans de nombreuses études, la performance antioxydante des huiles essentielles est due à la présence de composés phénoliques (Tepe et *al.*, 2005; Ozen et *al.*,

2011). Même s'il y a absence de composés phénoliques dans l'huile essentielle de *L. nobilis*, il a montré une forte capacité antioxydante. En fait, bien que certaines huiles essentielles ne soient pas riches en ces composés phénoliques, elles ont également montré un potentiel antioxydant (Mimica-Dukić et al., 2004). Des interactions synergétiques possibles entre les différents constituants de ces huiles peuvent expliquer cette activité (Tepe et al., 2007).

En comparaison avec nos résultats, Yadegarinia et al., (2006) ont trouvé aussi que l'huile essentielle de *M. communis* d'origine iranienne montre une faible activité du piégeage du radical libre DPPH. Cependant, nos résultats sur l'inhibition de la peroxydation lipidique n'étaient pas en accord avec ceux obtenues dans le même rapport; le pourcentage d'inhibition était plus important que celui obtenu dans notre étude.

Des études antérieures ont reporté une grande variation dans l'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle de *M. pulegium*. En fait, ces travaux ont montré l'activité antioxydante efficace de l'huile de cette plante mais moins puissante que les extraits à l'eau ou au méthanol de la même plante (Teixeira et al., 2008; Kamkar et al., 2010). Cette variation peut être attribuée à la présence de certains composés phénoliques et flavonoïdes dans ces extraits. Le pulégone qui représente 33,65% de la composition de l'huile essentielle de *M. pulegium* dans cette étude, a montré des activités antioxydantes moyennes lorsqu'il est testé à l'état pur (Ruberto et Baratta, 2000).

Conformément avec nos résultats, une étude sur l'huile essentielle de *L. stoechas* de l'Algérie a montré la capacité de cette huile à piéger les radicaux libres mais avec une moindre efficacité que les antioxydants synthétiques (Mohammedi et Atik, 2011). Cette activité peut être attribuée à la forte proportion de sesquiterpènes oxygénés. En outre, la présence du méthyl de l'eugénol peut jouer un rôle important dans les propriétés antioxydantes de cette huile essentielle (Ruberto et Baratta, 2000).

Aucune donnée n'a été publiée antérieurement sur l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *S. calamintha*. Toutefois, les activités antioxydantes d'autres espèces de *Satureja* ont été étudiées (Ozkan et al., 2006; Cávar et al., 2008). L'activité antioxydante faible de l'huile essentielle de *S. calamintha* peut être attribuée à l'absence des composés phénoliques connus par leurs forts pouvoirs antioxydants. Aussi, le 1,8 cineol présent dans cette huile en forte proportion (42.94 %) a montré une faible capacité dans l'inhibition de l'oxydation (Ruberto et Baratta, 2000).

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques et médicinales constituent l'une des sources de composés naturels de grande diversité qui permettent d'exercer un contrôle efficace contre un large spectre de microorganismes.

Avant de passer à la description du rôle des huiles essentielles dans le développement de processus de conservation alimentaire combinés, il est essentiel d'évaluer leurs capacités bactériostatiques et bactéricides. Cette évaluation a été faite contre des bactéries Gram positives et négatives appartenant à des groupes pathogènes et/ou d'altération alimentaire. Aussi, l'activité antifongique des huiles essentielles étudiées a été testée vis-à-vis deux souches fongiques. Diverses techniques ont été utilisées dans la littérature pour la détermination de l'effet antibactérien des huiles essentielles (Holley et pastel, 2005), d'où la difficulté de comparer les résultats obtenues avec ceux de la littérature de point de vue méthodologique ainsi que l'existence de nombreux facteurs qui peuvent influencer leurs effets (concentration initiale de l'inoculum et de l'huile essentielle, solubilité de l'huile, composition du milieu de culture...). Dans cette étude, la réalisation de cette partie a été faite par deux méthodes les plus couramment utilisées; la méthode de diffusion de disques en gélose qui est une méthode de criblage préliminaire et rapide ainsi que la méthode de microdilution pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) qui permet d'apporter des informations quantitatives et plus précises (Burt, 2004).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le plus souvent en corrélation avec leurs constituants chimiques et leurs groupes fonctionnels ainsi que les possibles interactions synergétiques entre les composés majoritaires et minoritaires (Dorman et Deans, 2000; Burt, 2004; Tajkarimi et *al.*, 2010; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011a).

Comme décrit auparavant, l'huile essentielle de *M. pulegium* avait montré une efficacité contre toutes les souches testées et une forte activité bactériostatique et bactéricide. Cette efficacité a été observée dans des études antérieures. Mahboubi et Haghgi (2008) ont reporté que cette huile a exprimé une activité antimicrobienne considérable contre *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus* et *E. coli* mais à des valeurs de CMI et CMB meilleures que celles obtenues dans notre étude. Cela peut être dû probablement à la différence de la composition chimique des huiles essentielles des deux études; notre huile était du chimiotype pulegone alors que l'huile de l'étude de Mahboubi

et Hagi (2008) était du chimiotype piperitone-piperiténone. Dans notre cas, l'activité antimicrobienne élevée de cette huile peut être attribuée à la proportion élevée en pulégone ou l'acétate de terpényle (Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012a) mais aussi la proportion élevée des monoterpènes oxygénés peut expliquer cette efficacité (Carson et Riley, 1995; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012a). D'autres auteurs ont également mis en évidence la forte activité antibactérienne de cette huile essentielle contre les souches de *L. monocytogenes* et *E. coli* (Marzouk et *al.*, 2008; Teixeira et *al.*, 2008).

L'huile essentielle de *L. nobilis* a exprimé une activité bactériostatique et bactéricide contre toutes les souches Gram positives et négatives testées. Cette huile a été plus active contre les deux souches de *Listeria* par rapport à l'huile essentielle de *M. pulegium* avec des valeurs de CMI plus basses. En général, les huiles qui ont montré une activité par la méthode des disques sont aussi actives par la méthode de microdilution. Cependant, il existe des exceptions. Il faut noter que *L. monocytogenes* CECT 4031 a montré une résistance à l'huile de *L. nobilis* avec la méthode de dilution en disques alors qu'avec la deuxième méthode, la souche était sensible à (CMI= 1 µl/ml et CMB= 8 µl/ml). Il est donc recommandé lors de l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de compléter les données en utilisant les deux méthodes simultanément. D'autres études sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *L. nobilis* d'origines différentes ont été réalisées. Derwich et *al.*, (2009) ont reporté que l'huile de Laurier d'origine marocaine est active contre *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Klebsiella pneumoniae*. Dadalioğlu et Evrendilek (2004) ont travaillé sur cette huile d'origine turque et ont montré son effet contre *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* et *S. aureus*. L'action de cette huile décrite dans ce travail peut être attribuée à la présence majoritaire du 1,8 cineole qui a montré une activité antimicrobienne relativement forte contre de nombreux microorganismes pathogènes (Sonboli et *al.*, 2006; Rosato et *al.*, 2007).

L'huile essentielle de *L. stoechas* a montré une activité bactériostatique contre toutes les souches testées mais à des concentrations supérieures à celles obtenues par l'huile de *M. pulegium* et *L. nobilis* (sauf dans le cas de *S. faecium*, *L. monocytogenes* EGD-e et *S. aureus*). Cette huile est non bactéricide pour trois des bactéries Gram négatives testées à savoir *S. Seftenberg*, *Y. enterocolitica* et *E. coli* CECT 471. Il est bien connu que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles réside généralement dans les monoterpènes (spécialement oxygénés) plutôt que dans les sesquiterpènes (Burt, 2004; Tajkarimi et *al.*, 2010). Cependant, cette huile est formée d'une grande proportion de composés

sesquiterpéniques (63,99%) et seulement de 18,62% de composés monoterpéniques, cependant elle exprime des activités antimicrobiennes intéressantes spécialement vis-à-vis les souches Gram-positives similairement à d'autres huiles essentielles riches en sesquiterpènes (Demerci et *al.*, 2008; Maxia et *al.*, 2009). Le nombre limité des études publiées sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *L. stochas*, tel que celui de la Turquie (Gören et *al.*, 2002; Kirmizibekmez et *al.*, 2009) et de la Tunisie (Bouzouita et *al.*, 2005) confirment l'action bactérienne de cette huile essentielle.

De nombreuses études ont été réalisées sur l'évaluation de l'effet antimicrobien des huiles essentielles des diverses espèces de *Satureja* (Azaz et *al.*, 2002; Vagionas et *al.*, 2007; Mihajilov-Krstev et *al.*, 2010; Karami-Osboo et *al.*, 2010) mais il existe un manque d'études concernant l'huile essentielle de *S. calamintha*. Dans ce travail, cette huile a montré des zones d'inhibition moyennes à faibles par la technique de diffusion en disques. Avec la technique de microdilution, elle a montré un effet efficace à modéré avec des valeurs de CMI allant de 0,5 à 14 µl/ml. Les souches de *L. monocytogenes* EGD-e et *S. aureus* sont les plus sensibles. L'huile de *S. calamintha* a montré des effets non bactéricides contre certaines souches à savoir *E. faecim*, *S. Seftemberg* et *Y. enterocolitica* aux concentrations testées. Autant que nous savons, on a trouvé un seul travail sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de cette plante au Portugal (Castilho et *al.*, 2007) et qui a montré une activité antimicrobienne remarquable vis-à-vis d'*E. coli*, *Agrobacterium tumefaciens* et *S. aureus*. Le constituant majeur de cette huile est le 1,8 cineole (42,94%), le même cas que deux huiles essentielles (*Eucalyptus globulus* (79,85%) et *Rosmarinus officinalis* (43,99%)) dans une étude de Ait-Ouazzou et *al.* (2011a) et dont l'activité aussi était modérée. Ait-Ouazzou et *al.*, (2011b) ont étudié l'effet antimicrobien de 11 constituants majeurs des huiles essentielles. Ils ont trouvé que le 1,8 cinéole montre une activité plutôt modérée en comparaison avec d'autres composés oxygénés tel que le carvacrole, thymol et linalool. Cependant, l'huile essentielle de *L. nobilis* dont le composant majeur était aussi le 1,8 cineole (39,81%) a exprimé une forte activité antibactérienne ce qui prouve que l'activité des huiles essentielles est due en grande partie aux interactions synergétiques entre les composés majoritaires et minoritaires (Dorman et Deans, 2000).

Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que l'huile essentielle de *M. communis* a montré l'activité antibactérienne la plus faible contre les souches étudiées avec des effets non bactéricides aux concentrations testées. Deux études (Yadergarinia et *al.*,

2006; Akin et *al.*, 2010) ont montré une activité bactérienne plus effective que celle de notre étude. Cette différence peut être attribuée à la variation de la composition chimique entre les deux huiles essentielles. L'huile de myrte de ces deux études a été caractérisée par la présence d'un composé, le linalool (10,4%; 12,65%) dont on a noté son absence dans notre composition. Il a été mis en évidence que le linalool exprime une forte activité antimicrobienne contre *E. coli* (CMI= 0,2 et CMB= 0,2 µl/ml) et *L. monocytogenes* (CMI<0,2 et CMB= 0,2 µl/ml) (Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b).

Il faut noter que les huiles essentielles testées étaient généralement plus actives contre les souches Gram-positives que Gram-négatives. En effet, de nombreux travaux portant sur l'action antibactérienne des huiles essentielles confirment que généralement ces huiles sont légèrement plus actives contre les bactéries Gram-positives que les Gram-négatives (Lambert et *al.*, 2001; Burt, 2004; Deba et *al.*, 2008; Bouhdid, 2009). La résistance des bactéries Gram-négatives à l'action des antimicrobiens peut être attribuée à la complexité de leur enveloppe cellulaire; Ces cellules possèdent une membrane externe entourant la paroi cellulaire qui limite la diffusion des composés hydrophobes à travers la couche lipopolysaccharide de la membrane plasmique (Vaara, 1992).

4. Evaluation de l'activité antifongique

Les 5 huiles essentielles ont été testées pour mettre en évidence leur éventuelle activité antifongique à différentes concentrations contre deux souches d'*Aspergillus flavus*. Suivant le même schéma que dans le cas de l'action antibactérienne, les huiles essentielles de *L. nobilis* et *M. pulegium* étaient les plus actives. Ils ont pu inhiber totalement la croissance mycélienne des champignons à une valeur de CMI de 4 µl/ml. L'huile essentielle de *L. stoechas* a été aussi efficace en inhibant totalement la croissance mycélienne à une concentration de 8 µl/ml. Les deux autres huiles essentielles (*M. communis* et *S. calamintha*) ont montré une moindre efficacité n'atteignant pas les 100% d'inhibition mycélienne aux concentrations testées. De nombreuses études ont été faites sur l'inhibition de la croissance mycélienne d'*A. flavus* par les huiles essentielles (Nguefack et *al.*, 2004b; Omidbeygi et *al.*, 2007; Tatsadjieu et *al.*, 2010; Tian et *al.*, 2011; Gonçalves et *al.*, 2012). L'activité antifongique des huiles essentielles testées a été étudiée contre divers souches fongiques mais peu de travaux ont été trouvés sur l'activité de ces huiles contre des souches d'*A. flavus*. L'huile essentielle de *L. stoechas* d'origine italienne a été trouvée efficace dans l'inhibition de la croissance de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* et *A.*

flavus (Angioni et al., 2006). Une autre étude a confirmé l'efficacité antifongique de l'huile de la lavande qui était capable d'inhiber totalement la croissance radiale de *Botrytis cinerea* à 1000 mg/ml (Dimitra et al., 2003). Atanda et al.,(2007) ont évalué le potentiel de l'huile essentielle de *L. nobilis* à contrôler la production des aflatoxines d'*Aspergillus parasiticus* CFR 233. Aussi, De corato et al., (2010) ont montré la capacité de cette huile à inhiber la croissance radiale de *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* et *Penicillium digitatum*. Une étude sur l'huile essentielle de *M. pulegium* d'origine marocaine a montré son action modérée contre *B. cinerea* (Chebli et al., 2003). L'huile essentielle de *M. communis* était capable d'inhiber 60% de la croissance de *Rhizoctonia solani* à une dose de 1600 ppm (Curini et al., 2003). L'activité antifongique de cette huile a été aussi étudiée contre des souches d'*Aspergillus* avec des effets efficaces vis-à-vis de tous les isolats (Mohammadi et al., 2008).

5. Mode d'action antibactérienne des huiles essentielles de *L. nobilis*, *M. pulegium* et *S. calamintha*

Afin de mettre en évidence certaines des éventuels effets cellulaires responsables de l'activité antibactérienne, trois des huiles essentielles ont été choisies pour l'étude de leur mode d'action antibactérien. En effet, deux des huiles essentielles choisies (*L. nobilis* et *M. pulegium*) étaient parmi les huiles testées les plus actives. L'huile de *S. calamintha* a aussi été choisie, du fait que peu d'études ont été réalisées sur cette lui. Le mode d'action de ces trois huiles essentielles a été étudié en utilisant deux souches bactériennes; *L. innocua* LRGA 01 comme modèle de bactéries Gram-positives et *E. coli* CECT 471 comme modèle de bactéries Gram-négatives.

De nombreux travaux ont été réalisés sur les mécanismes de l'effet antimicrobien des huiles essentielles ou de leurs constituants (Ultee et al., 1999; Lambert et al., 2001; Turgis et al., 2009; Paul et al., 2011; Lv et al., 2011). Cependant, les mécanismes exacts de cet effet restent encore mal élucidés et il est difficile de suggérer un mécanisme à généraliser à toutes les huiles essentielles et contre toutes les bactéries.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par les méthodes de culture ne permet pas de fournir des informations sur le mécanisme d'action des huiles essentielles ou pour détecter la présence des cellules viables non cultivables (VNC). C'est pourquoi, dans le présent travail les différents états physiologiques de *L. innocua* et *E. coli* en présence des huiles essentielles ont été évalués en utilisant le test de viabilité bactérienne (Kit Live/Dead

BacLight™) à l'aide du microscope d'épifluorescence en parallèle avec un dénombrement en milieu gélosé. La microscopie à épifluorescence est une méthode de détection directe des microorganismes. Elle permet après coloration des bactéries par des sondes de multiples investigations parmi autres la caractérisation des populations cellulaires et l'évaluation des dommages induits par les agents antimicrobiens.

Cette méthode permet de déterminer et de mettre en évidence les cellules à membranes endommagées, les cellules cultivables et les cellules viables, mais aussi la présence ou l'absence de cellules VNC. En effet, l'exposition des cellules bactériennes à un stress peut résulter en la formation de cellules VNC qui sont incapables de se développer sur les milieux de culture conventionnels mais qui préservent leur activité métabolique (Yamamoto, 2000; Oliver, 2005). Cette phase de dormance permet aux bactéries non sporulées de survivre aux conditions environnementales de stress telles que la température, salinité, faible teneur en nutriments, présence d'agents antimicrobiens (Jiang and Chai, 1996; Yamamoto, 2000; Oliver, 2005; Bouhdid *et al.*, 2010; Serpaggi *et al.*, 2012) et peut être également considérée comme un état physiologique transitoire avant la mort cellulaire (Coutard *et al.*, 2007). Par contre, les cellules qui sont marqués par l'IP ont une membrane irréversiblement endommagé et correspondent aux cellules mortes.

Après 24 h en présence des huiles essentielles et dans le cas des deux souches testées, le nombre des cellules viables dénombrés par microscope était plus élevé que le nombre des cellules cultivables à l'exception de *L. innocua* en présence de l'huile de *M. pulegium* probablement due à ce que dans ce cas l'huile a été testée à une valeur inférieure à la CMI. Cette différence entre les deux méthodes de dénombrement indique la présence de cellules ayant maintenu l'intégrité membranaire mais ayant perdu la capacité de former des colonies sur un milieu gélosé; ce sont les cellules en état VNC. Ces résultats suggèrent aussi que le dénombrement en milieu gélosé qui est une méthode analytique largement utilisée dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne sous-estime la population des cellules viables (Kell *et al.*, 1998; Serpaggi *et al.*, 2012). Cela peut être problématique car la présence de ces cellules VNC peut présenter un risque potentiel en particulier dans les industries agroalimentaires (Loughlin *et al.*, 2002; Khamisse *et al.*, 2012).

Une réduction du nombre des cellules cultivables et viables a été appariée à une augmentation du nombre des cellules endommagées déterminées par le marqueur IP qui est capable de pénétrer seulement les cellules à membranes endommagées et de se lier à l'ADN ou l'ARN et par conséquent conférer aux cellules une fluorescence rouge (Cox *et*

al.,2000; Lambert et *al.*, 2001; Gill et Holley, 2006; Berney et *al.*, 2007; Bouhdid et *al.*, 2010; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011b). Ces résultats indiquent que la membrane cytoplasmique est la cible des huiles essentielles testées. Cela peut entraîner la perte de la perméabilité sélective de la membrane, l'inhibition de l'activité respiratoire, la perte de certaines activités enzymatiques qui sont essentielles et par conséquent la mort cellulaire (Lambert et *al.*, 2001; Hyldgaard et *al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs qui ont montré que les huiles essentielles ou leurs composants agissent sur la perméabilité cellulaire. Une étude travaillant sur le dénombrement en agar en parallèle avec la coloration avec l'IP, a montré que deux composants de certaines huiles essentielles (eugénol et carvacrole) peuvent perturber les membranes cellulaires d'*E. coli* et *L. monocytogenes* (Gill et Holley, 2006). Cox et *al.*, (2000) ont aussi montré que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* endommage la structure des membranes cellulaires d'*E. coli*, *S.aureus* et *Candida albicans* provoquant des fuites des ions potassium. L'évaluation de la perméabilisation membranaire par Ait-Ouazzou et *al.*, (2011b) a permis de corréler l'apparition de cellules inactivées après 24 h d'incubation en présence de certains constituants des huiles essentielles (thymol, carvacrole, l'acétate d' α -térpinyl, p-cymène, Linalool, α -pinène et β -pinène) avec une forte perméabilisation membranaire des cellules d'*E. coli* et *L. monocytogenes*, signalant que les enveloppes cellulaires sont la cible du mécanisme d'inactivation de ces huiles essentielles.

Finalement, nos résultats obtenus avec le kit LIVE/DEAD BacLight™ et en comparaison avec la littérature, suggèrent que la membrane cytoplasmique est la cible de l'effet antibactérien des trois huiles essentielles étudiées lui provoquant une perméabilisation qui entraîne la mort cellulaire. En effet, la membrane plasmique est une barrière de perméabilité sélective qui organise les échanges entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. La perte de ce caractère est souvent identifiée comme indicateur de mortalité cellulaire. Aussi le traitement des deux souches avec les huiles essentielles provoque une perte de l'activité métabolique et de l'aptitude des cellules bactériennes à se multiplier.

Afin de mieux élucider et préciser comment agissent les 3 huiles essentielles, des tests d'anisotropie de fluorescence ont été réalisés. Dans ce travail, la perturbation de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH et du DPH dans les cellules de *L. innocua* et *E. coli* confirme l'interaction des huiles essentielles étudiées avec la membrane causant la modification de la fluidité de cette dernière. Ces deux sondes fluorescentes sont capables

de s'insérer dans la membrane. Le DPH est une molécule hydrophobe qui s'oriente parallèlement à la chaîne de phospholipides (Alonso-Hernando et al., 2010) et reflète les changements de fluidité à l'intérieur de la membrane cytoplasmique (Jasniewski et al., 2008). Le TMA-DPH est une molécule amphiphile possédant un domaine cationique qui lui permet de se lier à la surface entre les têtes hydrophiles des phospholipides en contact avec le milieu extérieur reflétant ainsi les changements de la fluidité à la surface de la membrane (Thibault et al., 2012). Une fois insérés dans la bicouche lipidique, l'interaction avec les chaînes acylés des lipides membranaires peut gêner leur mouvement de rotation et affecter la dépolarisation de la lumière d'excitation. C'est ce phénomène, impliquant une modification de l'anisotropie, qui nous indique une altération de la fluidité membranaire. L'anisotropie de fluorescence est inversement liée à la fluidité membranaire. Une diminution de polarisation indique une plus grande rotation de la sonde et donc une fluidité plus importante de la membrane et vice versa.

Les résultats obtenus indiquent que les huiles essentielles de *L. nobilis* et *S. calamintha* agissent sur les deux souches bactériennes en fluidisant la surface des membranes et en même temps une rigidification au centre de ces membranes plasmiques. Par contre, l'huile essentielle de *M. pulegium* agit différemment dans le cas des deux souches. On a noté une fluidisation à l'intérieur et à la surface des membranes plasmiques. Les valeurs de variations de l'anisotropie de fluorescence obtenues dans le cas de *L. innocua* sont plus élevées que celles obtenues dans le cas d'*E. coli*. Cette variation peut être expliquée par la différence dans la structure des membranes cellulaires entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. D'autres travaux ont aussi rapporté des valeurs d'anisotropie élevées lorsque des bactéries Gram-positives ont été traitées par des décontaminants chimiques tels que l'acide citrique ou le tétracycline (Vincent et al., 2004; Alonso-Hernando et al., 2010). Di Pasqua et al., (2006; 2007) ont démontré que des constituants des huiles essentielles (thymol, carvacrol, limonène, eugénol et cinnamaldéhyde) provoquent l'altération du profil lipidique des membranes cellulaires de *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* et *E. coli* par une baisse du taux des acides gras insaturés diminuant ainsi la fluidité membranaires de ces bactéries.

La fluidité membranaire est un caractère physique important des membranes cellulaires qui joue un rôle crucial dans le maintien des fonctions normales de la cellule (Liu et al., 2010) et aussi dans le maintien de la survie de la cellule (Yuk and Marshall, 2006).

6. Evaluation de l'efficacité létale de processus combinés de traitement thermique, le champ électrique pulsé ou les hautes pressions hydrostatiques avec les huiles essentielles

Le traitement thermique reste l'une des méthodes d'inactivation microbienne les plus utilisées dans la conservation alimentaire pour sa grande efficacité (Rajkovic et *al.*, 2010). Cependant, l'intensité sévère requise pour atteindre les niveaux d'inactivation souhaités peut causer des modifications dans les propriétés sensorielles et nutritionnelles des aliments (Pflug et Gould, 2000; Char et *al.*, 2009). Ces dernières années, de nombreux travaux ont été dédiés à la recherche et à l'étude de technologies alternatives et émergentes n'affectant pas les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Entre les méthodes émergentes proposées, la technologie du champ électrique pulsé et les hautes pressions hydrostatiques ont reçu une attention spéciale et ont fait l'objet de diverses études. Toutefois, ces méthodes peuvent présenter certaines difficultés à atteindre les niveaux d'inactivation adéquates qui garantissent la sécurité des aliments suite à la résistance de certains microorganismes spécialement les bactéries Gram-négatives (García et *al.*, 2005a; 2005b). D'où apparaît l'intérêt de développer un nouveau concept de processus qu'on appelle la technologie de barrières (Hurdle technology) qui consiste à combiner intelligemment différentes technologies pour atteindre le niveau d'inactivation microbienne requis tous en diminuant l'intensité de chaque traitement (Leistner, 2000).

Dans notre travail, l'application simultanée de traitements modérés de la température, le champ électrique pulsé ou les hautes pressions hydrostatiques conjointement avec une faible dose en huiles essentielles a été évaluée. L'étude de l'occurrence de dommages sub-létaux dans les membranes plasmiques ou les membranes externes des bactéries après les traitements physiques est aussi étudiée.

La plupart des travaux de recherches démontrent les effets antimicrobiens des huiles essentielles en déterminant leurs activités bactériostatiques et bactéricides. Les résultats obtenus à travers la détermination des valeurs de CMI et CMB apportent des informations précieuses mais obtenus à un pH neutre nécessaire pour favoriser la croissance des microorganismes testés. En conséquence, ces travaux ne fournissent pas des informations suffisantes sur l'influence du pH du milieu sur la capacité antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs composés purs, spécialement en conditions acides. D'où l'intérêt de décrire l'influence du pH sur la capacité inactivante de ces antimicrobiens ainsi que son

influence sur les méthodes de conservation appliquées seules ou en combinaison avec les huiles essentielles. Pour la réalisation de cette partie, le nombre des microorganismes étudiés a été réduit à deux; un représentant des bactéries Gram-positives *L. monocytogenes* EGD-e et un représentant des bactéries Gram-négatives *E. coli* O157:H7.

Le but de cette partie est d'exploiter le potentiel antimicrobien des huiles essentielles et des méthodes physiques de conservation en atteignant des niveaux adéquats d'inactivation microbienne. Il est donc primordial d'appliquer les processus combinés mais en diminuant l'intensité de chaque traitement. En plus, pour avoir un résultat optimum d'inactivation par les processus de combinaison, il est important de connaître le mécanisme d'action et l'efficacité de chaque méthodologie appliquée seule. L'inoculum initiale dans ces tests était de 10^7 UFC/ml de manière à pouvoir évaluer jusqu'à 5 cycles de réduction décimale de la population microbienne après l'application des processus combinés et ainsi établir les effets additifs ou synergétiques.

L'évaluation de l'inactivation microbienne des huiles essentielles appliquées seules a été réalisée en utilisant une concentration unique (0,2 µl/ml) qui est une concentration inférieure à ceux testées dans la détermination des valeurs de CMI et CMB, car de fortes concentrations en huiles essentielles rendent leur utilisation inappropriée dans divers applications de point de vue sensorielle et économique (Burt, 2004). Il est à noter aussi que la durée du traitement était de 10 min et de 24 h à température ambiante. Les résultats obtenus (Figures 28 et 29) montrent que ces traitements apportent des réductions insignifiantes (<0,5 cycles de réductions dans la plupart des cas) d'*E. coli* et *L. monocytogenes* et cela aux deux pHs. La prolongation de l'incubation durant 24 h des en présence de 0,2 µl/ml de chaque huile essentielle réussi à peine d'augmenter de peu les niveaux d'inactivation microbienne et ne réussissant pas ainsi à avoir les 5 cycles d'inactivation cellulaire. Des résultats similaires ont été trouvés dans un travail réalisé dans les mêmes conditions avec les huiles essentielles de *Thymus algeriensis*, *M. pulegium*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus phoenicea*, *Cyperus longus* et *Rosmarinus officinalis* (Ait-Ouazzou, 2012).

L'évaluation de chaque traitement physique séparément a été aussi réalisée. Après les différents traitements (température, HPH ou le champ électrique pulsé), les cellules survivantes ont été inoculées en milieux sélectives (NaCl ou SB) et non sélectives pour mettre en évidence le nombre des cellules inactivées ainsi que les cellules à membranes endommagées (membrane plasmique pour les deux souches et membrane externe dans le

cas d'*E. coli* seulement). Les différents traitements causent l'inactivation irréversible d'un faible pourcentage de la population microbienne d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* (0,2-2 cycles cellulaires et à peu près 3 cycles dans le cas de *L. monocytogenes* à pH 4,0 avec le traitement thermique modéré) mais en même temps, ils causent un nombre élevé de dommages sub-létaux aux cellules survivantes. Ces dommages que subissent les cellules sont particulièrement prononcés dans le cas du traitement thermique et du traitement HPH. Alors qu'un traitement avec le champ électrique pulsé aux conditions testées cause un faible pourcentage de dommages sub-létaux. On a remarqué aussi que les deux souches étaient plus résistantes au traitement thermique et aux HPP à pH neutre qu'à pH acide. Le contraire a été observé dans le cas du traitement avec le champ électrique pulsé et dont le même comportement a été enregistré dans d'autres travaux (Lu et *al.*, 2001; García et *al.*, 2005b; MañasetPagán, 2005; Ait-Ouazzou et *al.*, 2012).

La génération de dommages sub-létaux aux enveloppes et membranes cellulaires des microorganismes survivants aux méthodes de conservation physiques est très importante surtout lorsque ces méthodes sont appliquées dans des processus combinés (Mackey, 2000). Ces dommages sont généralement liés à la sensibilité des microorganismes survivants aux conditions du traitement. La détection et la quantification ainsi que la non réparation de ces dommages est d'une grande valeur pour le développement de processus combinés adéquats. Cela peut résulter en des effets létaux synergétiques et donc une augmentation considérable des niveaux d'inactivation. Ceci a été démontré dans nombre de travaux qui ont combinés ces traitements physiques avec des huiles essentielles ou des composés purs (Somolinos et *al.*, 2008b, 2010; Espina et *al.*, 2011, 2012; Ait-Ouazzou et *al.*, 2011, 2012b).

La température sélectionnée pour développer les processus combinés avec les huiles essentielles est de 54°C et la durée du traitement est de 10min; un temps qui nous a permis d'inactiver le moins de microorganismes mais de causer en même temps des dommages sub-létaux à un grand pourcentage des cellules survivantes d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* aux deux pHs. En ce qui concerne le champ électrique pulsé, il a été mis en évidence par d'autres études, la limitation de cette technique à endommager les enveloppes cellulaires des souches testées spécialement en milieu acide. Malgré cela, on a opté pour l'intensité du traitement la plus élevée qui peut être appliquée dans des aliments sans difficulté (30Kv/cm) et un nombre maximum de pulses (25 pulsations) qui ne cause pas d'échauffement du milieu du traitement (<35°C).

Comme les souches d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* ont montré de grandes différences dans la résistance aux HPH, il n'était pas possible de définir un traitement unique qui nous permettra d'avoir des effets synergétiques lorsque cette méthode sera combinée avec les huiles essentielles. Par conséquent, pour pouvoir illustrer des effets synergétiques entre les deux méthodes (HPH et huiles essentielles), l'intensité du traitement a été réduite dans le cas de *L. monocytogenes* à 175 et 325 MPa pendant 20 min à pH 4,0 et 7,0 respectivement.

Les résultats les plus importants des processus combinés soulignent l'efficacité létale de la combinaison spécialement du traitement thermique et des HPH avec les huiles essentielles qui se traduit par de forts effets synergétiques. Ainsi que la relation existante entre la présence des dommages sub-létaux dans les enveloppes cellulaires des bactéries et les effets synergétiques obtenus.

Dans toutes les combinaisons essayées, on observe que l'action simultanée du traitement thermique modéré ou des HPH en présence de 0,2 µl/ml de chaque huile essentielle cause une inactivation supérieure à celle atteinte en appliquant les deux méthodes séparément. On observe d'importants effets synergétiques qui peuvent atteindre les 5 cycles d'inactivation en fonction du microorganisme et du pH du milieu. Mêmes les huiles essentielles de *S. calamintha* et *M. communis* qui n'ont pas montré de forts capacités bactéricides et bactériostatiques par la méthode de microdilution, ont présenté une énorme capacité bactéricide en combinaison avec le traitement thermique et les HPH. Cela a été aussi observé dans une autre étude de Ait-Ouazzou et *al.*, (2012b) réalisée avec les huiles essentielles de *R. officinalis* et *C. longus* combinées avec un traitement thermique modéré dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus de la combinaison du traitement au champ électrique pulsé (30 Kv/25 pulses) et des huiles essentielles (0,2 µl/ml) montrent que ce procédé combiné n'est pas prometteur puisque des effets synergétiques très faibles (0,7-1,5 extra log₁₀ cycle d'inactivation) ont été observés seulement dans l'inactivation d'*E. coli* à pH 7,0 et 4,0. Ait-Ouazzou et *al.*, (2012b) ont constaté des conclusions similaires en combinant 6 huiles essentielles avec un traitement de champ électrique pulsé de la même intensité.

Les doses en huiles essentielles nécessaires pour atteindre l'effet bactéricide (2-56 µl/ml) sont élevées, ce qui rend difficile leurs utilisations dans l'industrie alimentaire. Ces

doses peuvent être réduites à 0,2 µl/ml lorsqu'elles sont appliquées en combinaison avec un traitement thermique modérée ou avec les HPH.

L'efficacité bactéricide et synergétique obtenue par les huiles essentielles lorsqu'elles sont combinées avec le traitement thermique ou les HPH peut être en relation directe avec la présence et l'efficacité de certains constituants de ces huiles essentielles. Le 1,8 cineole présent en proportion élevée chez *S. calamintha* (42,94%), *L. nobilis* (39,81%) et *M. communis* (26,93%) et en moindre proportion dans *M. pulegium* (10,53%) et *L. stoechas* (2,7%) a montré un comportement similaire dans l'inactivation d'*E. coli* et *L. monocytogenes* lorsqu'il était appliqué en combinaison avec la température (54°C/10 min) (Ait-Ouazzou et al., 2012). Autres constituants présents dans nos huiles essentielles telles que l' α -pinène (16,52% dans *M. communis*, 5,34% dans *M. pulegium* et 1,73% dans *S. calamintha*), l'acétate d' α -terpényle (24,29% dans *M. pulegium*) ainsi que le pulégone (33,65% dans *M. pulegium*) ont aussi démontré qu'ils sont capables d'agir synergiquement avec le traitement thermique (Ait-Ouazzou et al., 2011b; Ait-Ouazzou, 2012). Mais l'action de ces huiles en mode combinaison peut aussi s'expliquer par l'interaction entre les constituants majoritaires et les constituants minoritaires présents dans les huiles essentielles. La compréhension des différentes interactions entre ces constituants peut aider à intensifier l'action des huiles essentielles et par conséquent réduire les concentrations utilisées pour mieux éviter l'altération des propriétés sensorielles des aliments.

La présence d'une grande proportion de dommages sub-létaux après les traitements physiques dans les enveloppes cellulaires des microorganismes est liée à l'efficacité des huiles essentielles ou leurs constituants purs lorsqu'elles sont utilisés dans des processus combinés (Mackey, 2000; Arroyo et al., 2010; Somolinos et al., 2010; Espina et al., 2012; Ait-Ouazzou et al., 2011b, 2012b). Les dommages que subissent les cellules microbiennes pourraient faciliter l'accès et l'action des huiles essentielles (Luo et al., 2004; Park et al., 2009) et aussi faciliter leur transport à l'intérieur des cellules (Burt, 2004) augmentant ainsi leur efficacité dans les processus combinés. Par contre, le faible pourcentage des cellules endommagées d'*E. coli* et *L. monocytogenes* après le traitement au champ électrique pulsé est probablement la cause de la faible action des huiles essentielles lorsqu'elles sont appliquées simultanément avec ce procédé.

7. L'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*

L'efficacité des solutions désinfectantes à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* contre les cellules de *L. innocua* adhérentes aux coupons d'acier inoxydable après 6 h peut être attribuée au fait qu'à cette phase, les cellules sont encore à la phase d'adhésion réversible. En effet, l'adhésion bactérienne aux surfaces se produit en deux phases : adhésion réversible suivie de l'adhésion irréversible (Mittelman, 1998; Sutherland, 2001). Durant la phase réversible, les cellules bactériennes sont facilement éliminées par application de forces minimales (Watnick and Kolter, 2000; Chmielewski and Frank, 2003). D'autre part, l'élimination des cellules adhérentes irréversibles est difficile et requiert l'application de forces plus importantes (Sinde and Carballo, 2000).

En ce qui concerne les temps de traitement utilisés, on a observé que l'action des solutions désinfectantes à base de l'huile essentielle de *L. nobilis* a été plus efficace à 30 min de contact en comparaison avec les 10 min. Pour un biofilm de 48 h, il n'y avait pas de différences significatives dans l'efficacité entre les deux temps de traitement.

Pour une plus grande efficacité dans l'élimination des biofilms, il est préférable d'augmenter le temps de contact avec les solutions désinfectantes ou d'augmenter la concentration en huiles essentielles. Il a été confirmé dans des études antérieures que le temps de traitement joue un rôle important dans l'efficacité des solutions désinfectantes à base d'huiles essentielles. De Oliveira et al., (2010) ont trouvé que l'action de solutions désinfectantes à base d'huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* ou leurs combinaisons est plus efficace après 60 min de traitement en comparaison avec 15 min contre deux phases de formation d'un biofilm de *L. monocytogenes* (3 h et 240 h). Gursoy et al., (2009) ont montré l'effet anti-biofilm de l'huile essentielle de *Satureja hortensis* vis à vis un biofilm de *Prevotellani grescens*. Une autre étude a montré que deux composés purs de diverses huiles essentielles (thymol et carvacrol) inhibent la croissance d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (El abed et al., 2011).

Conclusions et perspectives

Conclusions

Dans le présent travail de recherche, nous avons évalué la composition chimique et les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de 5 huiles essentielles du Nord du Maroc, le mode d'action antibactérien de certaines huiles sélectionnées, leurs efficacités dans des processus combinés (traitement thermique modéré, les HPH ou le champ électrique pulsé) ainsi qu'une étude préliminaire sur l'effet anti-biofilm d'une huile essentielle sélectionnée. Les résultats obtenus ont permis de tirer les conclusions suivantes:

1. L'étude de la caractérisation chimique des 5 huiles essentielles d'origine méditerranéenne par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie en masse indique une variabilité intraspécifique et interspécifique dans le profil chimique d'une huile à une autre.
2. L'évaluation de l'activité antioxydante des 5 huiles essentielles a révélé que l'huile essentielle de *Laurus nobilis* exprime la plus forte activité antioxydante dans les trois systèmes employés et qui dépasse de loin celle des autres huiles étudiées.
3. L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode classique de diffusion en agar a été utilisée comme méthode approximative et les résultats sont ensuite complétés par la détermination des valeurs de CMI et CMB.
4. Les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Laurus nobilis* étaient les plus efficaces, exprimant une forte activité antibactérienne contre les souches bactériennes testées (Gram-positives et Gram-négatives).
5. Les huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Satureja calamintha* Scheele ont montré aussi une bonne activité antibactérienne tout en étant non bactéricide envers certaines souches Gram-négatives. Alors que l'huile essentielle de *Myrtus communis* a montré une activité modérée avec des effets non bactéricides contre toutes les souches testées.
6. Les huiles essentielles de cette étude se sont révélées efficaces dans l'inhibition de la croissance mycélienne de deux souches d'*Aspergillus flavus*.

7. Le dénombrement sur milieu gélosé sous-estime la population bactérienne viable. L'utilisation du Kit de viabilité LIVE/DEAD® BacLight™ met en évidence la présence de cellules viables non cultivables (VNC) qui est un état intermédiaire avant la mort cellulaire.
8. L'analyse par la microscopie à épifluorescence combinée au marquage à l'IP révèle que les huiles essentielles provoquent une perte de viabilité. Mais aussi la perte de l'intégrité membranaire en induisant des dommages aux membranes cellulaires d'*E. coli* CECT 474 et de *L. innocua* LRGIA01.
9. La technique d'anisotropie de fluorescence par les deux marqueurs (TMA-DPH et DPH) confirme que la membrane cytoplasmique des cellules bactériennes a été la cible de l'effet des huiles essentielles affectant leur fluidité membranaire.
10. L'huile de *Mentha pulegium* agit différemment des deux autres huiles par fluidisation de la membrane à la face externe et interne. Tandis que les huiles essentielles de *Laurus nobilis* et *Satureja calamintha* donnent une membrane plus fluide à la surface et en même temps une rigidification de la bicouche lipidique.
11. Les 5 huiles essentielles étudiées agissent de manière synergétique en combinaison avec le traitement thermique modéré et les hautes pressions hydrostatiques permettant d'atteindre jusqu'à 5 cycles de réductions décimales d'*E. coli* O157:H7 et de *L. monocytogenes* EGDe selon le pH du milieu du traitement.
12. La combinaison d'un traitement thermique modéré ou des hautes pressions hydrostatiques avec de faibles doses en huiles essentielles résulte en des effets létales synergétiques beaucoup plus efficaces que ceux basés sur la combinaison avec le champ électrique pulsé. Cela est probablement dû à la plus grande capacité de ces deux traitements physiques (température et pressions) à endommager les enveloppes cellulaires des cellules bactériennes en comparaison avec le traitement avec le champ électrique pulsé.
13. L'huile essentielle de *Laurus nobilis* a exprimé un effet anti-biofilm intéressant et a été capable de réduire le nombre de cellules de *L. innocua* adhérees sur les aciers inoxydables.

Perspectives de recherche

A l'issue de ce travail, diverses perspectives de recherches peuvent apparaître liées principalement avec le mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles d'une part et d'autre part à l'aspect application des huiles essentielles à propriétés antioxydantes et antimicrobiennes dans divers domaines mais principalement le domaine des industries agro-alimentaires. Il serait donc intéressant de pouvoir procéder à :

- L'évaluation de l'efficacité des huiles essentielles en combinaison avec d'autres procédés de conservation (Activité de l'eau, des impulsions lumineuses intenses, les ultrasons, les emballages actifs...).
- L'évaluation de l'efficacité des huiles essentielles combinées ou seules à inactiver les microorganismes altérants dans des matrices alimentaires ou évaluer leur aptitude à prolonger la durée de vie de certains aliments (des jus de fruits, des sauces, produits laitiers, viande...).
- Une étude plus approfondie sur le mode d'action des huiles essentielles pour plus de compréhension et de précision. Il serait donc intéressant d'essayer divers autres marqueurs qui permettront de suivre différentes activités métaboliques et mettre en évidence l'effet des huiles essentielles sur d'autres fonctions ou structures cellulaires tels que l'activité respiratoire, l'activité des pompes membranaires, l'activité enzymatique, les changements ultra-structuraux ou physiologiques...
- L'approfondissement de l'étude des effets anti-biofilm des huiles essentielles notamment sur des biofilms d'autres souches bactériennes ou en forme multi-microbiens mais aussi les tester sur des matrices alimentaires ou sur des biofilms adhérents sur d'autres matériaux que les aciers inoxydables.

Références bibliographiques

A

- Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A. and Pourmortazavi S.M. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*, 62, 407-411.
- Aidi Wannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M.E. and Marzouk B. (2010). Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1362-1370.
- Ait-Ouazzou A., Lorán S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. and Conchello P. (2011a). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14), 2643-2651.
- Ait-Ouazzou A., Cherrat L., Espina L., Lorán S., Rota C. and Pagán R. (2011b). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 320-329.
- Ait-Ouazzou A. (2012). Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas de origen mediterráneo y evaluación de su actividad antimicrobiana en combinación con otros métodos de conservación de alimentos. Tesis doctoral de la Universidad de Zaragoza. Espagne.
- Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. and Conchello P. (2012a). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313-319.
- Ait-Ouazzou A., Espina L., Cherrat L., Hassani M., Laglaoui A., Conchello P. and Pagán R. (2012b). Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, doi:doi:10.1016/j.ifset.2012.07.002.
- Akin M., Aktumsek A. and Nostro A. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology*, 9 (4), 531-535.
- Alan S., Kürkcüoğlu M. and Can baser K.H. (2010). Composition of the essential oils of *Calamintha sylvatica* Bromf. subsp. *sylvatica* and *Calamintha sylvatica* Bromf. subsp. *ascendens* (Jordan) P.W. Ball. *The Journal of Essential Oil Research*, 22 (4), 325-327.
- Alonso-Hernando A., Alonso-Calleja C. and Capita R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 130-136.
- Álvarez I. (2003). Inactivación microbiana por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Espagne.
- Álvarez I., Raso J., Sala F.J. and Condón S. (2003a). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 20, 691-700.

Références bibliographiques

- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. and Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14(1), 141-148.
- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S. and Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54 (12), 4364-4370.
- Anthony J.P., Fyfe L. and Smith H. (2005). Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21(10), 462-468.
- Araya M., Toshifumi Y., Watanabe T., Kashihara J. and Sumida Y. (2007). Application to cleaning of waste plastic surfaces using atmospheric non-thermal plasma jets. *Thin Solid Films*, 515, 4301-4307.
- Arroyo C., Condón S. and Pagán R. (2011). Inactivación of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *International journal of food microbiology*, 144, 446-454.
- Atanda O.O., Akpan I. and Oluwafemi F. (2007). The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18, 601-607.
- Azaz D., Demirci F., Satil F., Kürkçüoğlu M. and Can Başer K.H. (2002). Antimicrobial Activity of Some *Satureja* Essential Oils. *Z. Naturforsch*, 57c, 817-821.
- B**
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Banerjee S., Ecavad A. and Rao A.R. (1993). Modulatory influence of sandalwood oil on mouse hepatic glutathione-s-transferase activity and acid-soluble sulfhydryl level. *Cancer Letters*, 68, 105-109.
- Barbosa-Cánovas G.V., Pothakamury U.R., Palou E. and Swanson B.G. (1998). Biological effects and applications of pulsed electric fields for the preservation of foods. In *Nonthermal Preservation of Foods*, pp. 73-112. New York: Marcel Dekker Inc.
- Baskaran S.A., Amalaradjou M.A.R., Hoagland T. and Venkitanarayanan K. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice and apple cider by trans-cinnamaldehyde. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 126-129.
- Bauer K., Garbe D. and Surburg H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293. In: Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Baydar H., Sagdic O., Ozkan G. and Karadogan T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15, 169-172.

Références bibliographiques

- Beaudeau J.L., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D, Therond P., Delattre J. and Legrand A. (2006). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64, 373-381.
- Belyagoubi L. (2005). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie. Université Abu Bekr Belkaid. Faculté des Sciences. Algérie.
- Ben Jemâa J.M., Tersim N., Taleb Toudert K. and Khouja M.L. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*, 48, 97-104.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini A.F. and Costa J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106, 132-139.
- Benayad N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockés. Projet de recherche. Rapport d'activité. Faculté des Sciences-Rabat, Maroc.
- Berney M., Hammes F., Brosshard F., Weilenmann H.U. and Egli T. (2007). Assessment and interpretation of bacterial viability by using the Live/Dead BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 3283-3290.
- Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- Boelens M.H. and Jimenez R. (1992). The chemical composition of Spanish myrtle oils. II. *Journal of Essential Oil Research*, 4(4), 349-353.
- Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Christaki E. and Spais A.B. (2003). Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Research International*, 36, 207-213.
- Bouhdid S. (2009). Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles. Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse pour l'obtention du doctorat en sciences. Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences de Tétouan. Maroc.
- Bouhdid S., Abrini J., Amensour M., Zhiri A., Espuny M.J. and Manresa A. (2010). Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1139-1149.
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. and Desjardins R. (1999). Live/Dead® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 77-86.
- Bouzouita N., Kachouri F., Hamdi M. and Chaabounr M.M. (2005). Volatile constituents and antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 584-586.

Références bibliographiques

- Bower C.K., McGuire J. and Daeschel M.A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 152-157.
- Brandi G., Amagliani G., Schiavano G.F., De Santi M. and Sisti M. (2006). Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2274-2279.
- Brul S. and Coote P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
- Burfoot D. and Middleton K. (2009). Effects of operating conditions of high pressure washing on the removal of biofilms from stainless steel surfaces. *Journal of Food Engineering*, 90, 350-357.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Busatta C., Vidal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., Dariva C. and Rodrigues M.R.A. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, 207-221.
- C**
- Calderón-Miranda M.L., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G. (1999). Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk. *International Journal of Food Microbiology*, 51, 31-38.
- Carreda A., Marongiu A., Porcedda B. and Soro C. (2002). Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(6), 1492-1496.
- Carson C.F. and Riley T.V. (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Food Microbiology*, 78, 264-269.
- Casp A. and Abril J. (2003). Procesos de conservación de alimentos. Colección Tecnología de alimentos. Ediciones Mundi-Prensa.
- Castillejos L. (2005). Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Barcelona. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Barcelona, Espagne.
- Castilho P., Liu K., Rodrigues A.I., Feio S., Tomi F. and Casanova J. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 139-144.
- Castro A.J., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G. (1993). Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 47-73.
- Cávar S., Maksimović M., Šolić M.E., Jerković-Mujkić A. and Bešta R. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111, 648-653.

Références bibliographiques

- Chadeau E. (2011). Caractérisation des propriétés antibactériennes de textiles fonctionnalisés avec de l'argent ou du PolyHexaMéthylène Biguanide (PHMB). Thèse de L'Université Claude Bernard Lyon 1. France.
- Chaibi A., Ababouch L.H., Belasri K., Boucetta S. and Busta F.F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* spores by essential oils. *Food microbiology*, 4, 161-174.
- Char C., Guerrero S. and Alzamora S.M. (2009). Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. *Food Control*, 20, 67-74.
- Characklis W.G. and Marshall K.C. (1990). Biofilms. *John Wiley*, New York, USA.
- Chavalet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse pour le doctorat vétérinaire. La faculté de médecine de Créteil. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- Chea F.P., Chen Y., Montville T.J. and Schaffner D.W. (2000). Modeling the germination kinetics of *Clostridium botulinum* 62 A spores affected by temperature, pH and sodium chloride. *Journal of Food Protection*, 63, 1071-1079.
- Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. and Hmamouchi M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 165-169.
- Chen H. and Hoover D.G. (2003). Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 161-171.
- Chéraïf I., Ben Jannet H., Hammami M., Khouja M.L. and Mighri Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 12, 813-820.
- Chmielewski R.A.N. and Frank J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22-32.
- Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F. and Chikindas M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Conner D.E. (1993). Naturally occurring compounds. In *Antimicrobials in Foods* (P.M. Davidson and A.L. Branen, eds.) pp. 441-468, Marcel Dekker, New York, NY.
- Cornwell D.G., Jones K.H., Jiang Z., Lantry L.E., Southwell K.P. and Kohar I. (1998). Cytotoxicity of tocopherols and their quinones in drug-sensitive and multidrug-resistant leukemia cells. *Lipids*, 33, 295-301.
- Coutard F., Crassous P., Droquet M., Gobin E., Colwell R.R., Pommepuy M. and Hervioheath D. (2007). Recovery in culture of viable but non culturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? *ISME Journal*, 1, 111-120.
- Cowan M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.

Références bibliographiques

- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. and Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170-175.
- Crawford Y.J., Murano E.A., Olson D.G. and Shenoy K. (1996). Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogenes* spores in chicken breast. *Journal of Food Protection*, 59, 711-715.
- Cserhalmia Zs., Vidácsa I., Beczner J. and Czukor B. (2002). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 41-45.
- Curini M., Bianchi A., Epifamo F., Bruni R., Torta L. and Zambonelli A. (2003). In vitro antifungal activity of essential oils of *Erigeron Canadensis* and *Myrtus communis* from France. *Chemistry of Natural Compounds*, 30(2), 191-194.
- D**
- Dadalioglu I. and Evrendilek G.A. (2004). Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 8255-8260.
- Dafereraa D.J., Ziogas B.N. and Polissiou M.G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Daljit S.A. and Kaur J. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 257-262.
- De Corato U., Trupo M., Leone G.P., Di Sanzo G., Zingarelli G. and Adami M. (2007). Antifungal activity of the leaf extracts of laurel (*Laurus nobilis* L.), orange (*Citrus sinensis* Osbeck) and olive (*Olea europaea* L.) obtained by means of supercritical carbon dioxide technique. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3), Special Issue.
- De Corato U., Maccioni O., Trupo M. and Di Sanzo G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post-harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29, 142-147.
- De feo V., De simone F. and Senatore F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61, 573-578.
- De Oliveira M.M.M., Brugnera D.F., Cardoso M.D., Alves E. and Piccoli R.H. (2010). Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food control*, 21(4), 549-553.

Références bibliographiques

- Deba F., Tran Dang X., Masaaki Y. and Shinkichi T. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*, 19, 346-352.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
- Demirci F., Guven K., Demirci B., Dadandi M.Y. and Baser K.H.C. (2008). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 19, 1159-1164.
- Descalzo A.M. and Sancho A.M. (2008). A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 423-436.
- Derwich E., Benziane Z. and Boukir A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.
- Derwich E., Benziane Z. and Boukir A. (2010). GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha Pulegium* grown in Morocco. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6 (3), 191-198.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G. and Mauriello G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(7), 2745-2749.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D. and Mauriello G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(12), 4863-4870.
- Di Leo Lira P., Retta D., Tkacik E., Ringuet J., Coussio J.D., van Baren C. and Bandoni A.L. (2009). Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. *Industrial Crops and Products*, 30, 259-264.
- Dimitra J.D., Basil N.Z. and Moschos G.P. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 39-44.
- Dogan Z., Weidendorfer K., Müller-Merbach M., Lembke F. and Hinrichs J. (2009). Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 81-86.
- Donlan Rodney M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Dorman H.J.D. and Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.

Références bibliographiques

Dorman H.J.D. and Hiltunen R. (2004). Fe (III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry*, 88, 193-199.

Dwivedi C. and AbuGhazaleh A. (1997). Chem-opreventive effects of sandalwood oil on skin papillomas in mice. *European Journal of Cancer Prevention*, 6, 399-401.

E

Ebrahimabadi A.H., Mazoochi A., Kashi F.J., Djafari-Bidgoli Z. and Batooli H. (2010). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1371-1376.

Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytoterapy Research*, 21, 308-321.

El abed S., Ibsouda koraichi S., Latrache H., Zineb G., Mouradi H. and Remmal A. (2011). Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3229-3232.

Eminagaoglu O., Tepe B., Yumrutas O., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. and Sokmen A. (2007). The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. And *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*, 100, 339-343.

Erler F., Ulug I. and Yalcinkaya B. (2006). Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, 77, 491-494.

Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D. and Pagán R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22(6), 896-902.

Espina L., Somolinos M., Ait-Ouazzou A., Condón S., García-Gonzalo D. and Pagán R. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 9-16.

Evrendileka G.A. and Balasubramaniam V.M. (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food control*, 22(8), 1435-1441.

F

Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Pedro L.G. (2002). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.

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

Références bibliographiques

- Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M. and Zervas G. (2007). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry*, 106, 1188-1194.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Ferreira C., Pereira A.M., Melo L.F. and Simões M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A Méndez-Vilas (Ed). pp. 845-854.
- Friedman M., Henika P.R. and Mandrell R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65 (10), 1545-1560.
- Friedman M., Henik P.R., Levin C.E. and Mandrell R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6024-6028.
- G**
- Galvez M., Martin-Cordero C., Houghton P.J. and Ayuso M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1927-1933.
- Garcia-Graells C., Masschalck B. and Michiels C.W. (1999). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *Journal of Food Protection*, 62, 1248-1254.
- García D., Hassani M., Mañas P., Condón S. and Pagán, R. (2005a). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage under refrigeration of apple juice treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Safety*, 25 (1), 30-42.
- García D., Gómez N., Raso J. and Pagán R. (2005b). Bacterial resistance after pulsed electric fields depending on the treatment medium pH. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 6, 388-395.
- García D., Gómez N., Mañas P., Condón S., Raso J. and Pagán R. (2005c). Occurrence of sublethal injury after pulsed electric field depending on the microorganism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 94-104.
- Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K. and Komaitis M. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107, 1120-1130.
- Ghasemi P.A., Rahimmalek M., Malekpoor F. and Karimi A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. *Plant Omics Journal*, 4(4), 209-214.

Références bibliographiques

- Gholivand M.B., Rahimi-Nasrabadi M., Batooli H. and Ebrahimabadi A.H. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 24-28.
- Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E. and Holah J.T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 41-49.
- Gill A.O., Delaquis P.R. and Holley R.A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.
- Gill A.O. and Holley R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 1-9.
- Gómez N., García D., Alvarez I., Condón S. and Raso J. (2005). Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 199-206.
- Gonçalves M.J., Tavares A.C., Cavaleiro C., Cruz M.T., Lopes M.C., Canhoto J. and Salgueiro L. (2012). Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 39, 204-209.
- Góngora-Nieto M.M., Sepúlveda D.R., Pedrow P., Barbosa-Cánovas G.V. and Swanson B.G. (2002). Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 375-388.
- Gören A.C., Topçu G., Bilsel G., Bilsel M., Aydoğmuş Z. and Pezzuto J.M. (2002). The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *Stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57, 797-800.
- Gould G.W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *Food Microbiology*, 33, 51-64.
- Govaris A., Florou-Panerib P., Botsogloub E., Giannenasb I., Amvrosiadisc I. and Botsoglou N. (2007). The inhibitory potential of feed supplementation with rosemary and/or a-tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *LWT journal*, 40, 331-337.
- Grisham M.B. (2000). A radical approach to treating inflammation. *Trends in Pharmacology Science*, 21, 119-120.
- Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. and Ozkan H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456.
- Gursoy U.K., Gursoy M., Gursoy O.V., Cakmakci L., Könönen E. and Uitto V.J. (2009). Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*, 15, 164-7.

Références bibliographiques

Gutierrez J., Bourke P., Lonchamp J. and Barry-Ryan C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 195-202.

H

Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R. and Bakhrouf A. (2009). Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 2227-2238.

Halliwel B. and Gutteridge J.M.C. (2007). Free radicals in biology and medicine. UK. Clarendon Press, Oxford (fourth edition). In: Bouhdid Samira (2009). Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles. Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse pour l'obtention du doctorat en sciences. Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences de Tétouan. Maroc.

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

Hassani M., Alvarez I., Raso J., Condón S. and Pagán R. (2005). Comparing predicting models for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pH. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 213-222.

Hassani M., Mañas P., Pagán R. and Condón S. (2007). Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 228-238.

Hassiotis C. N. (2010). Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 493-501.

Hayouni E.A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Hammami M. and Hamdi M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242-251.

Hegazy M.I. (2012). Efficacy of plant essential oils against *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *L. monocytogenes* in fruit juices. *Journal of American Science*, 8(9), 184-190.

Herrero A.M. and Romero de Avila M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de Universidad de Navarra*, 50(4), 71-74.

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

Hood S.K. and Zottola E.A. (1995). Biofilms in food processing. *Food Control*, 6(1), 9-8.

Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Références bibliographiques

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H. and Przybylski R. (2008). Chemical composition, Antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986-995.

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

I

Ijaz H.A. (2009). Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. A thesis submitted for the degree of doctor of Philosophy in Chemistry. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

Ilkka M., Alakomi H.H., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. and Von Wright A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

J

Jasniewski J., Cailliez-Grimal C., Younsi M., Millière J.B. and Revol-Junelles A.M. (2008). Fluorescence anisotropy analysis of the mechanism of action of mesenterocin 52A: speculations on antimicrobial mechanism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 339-347.

Jessen B. and Lammert L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 265-269.

Jeyamkondan S., Jayas D.S. and Holley R.A. (1999). Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection*, 62, 1088-1096.

Jiang X.P. and Chai T.J. (1996). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1300-1305.

Jordan S.L., Pascual C., Bracey E. and Mackey B.M. (2001). Inactivation and injury of pressure-resistant strain of *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 463-469.

Jung In Y., Vivek K.B and Sun C.K. (2010). Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 109-114.

Juven B.J., Kanner J., Schved F. and Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626-631.

K

Kamkar A., Javan A.J., Asadi F. and Kamalinejad M. (2010). The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1796-1800.

Références bibliographiques

- Karaman S., Digrak M., Ravid U. and Ilcim A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 183-186.
- Karami-Osboo R., Khodaverdi M. and Ali-Akbari F. (2010). Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora*. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 12, 35-45.
- Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R. and Barer M.R. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Leeuwenhoek*, 73(2), 169-187.
- Khamisse E., Firmesse O., Christeans S., Chassain D. and Carpentier B. (2012). Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 158, 163-168.
- Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston I.F. and Wei C.I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cubes. *Journal of Food Science*, 60, 1364-1368.
- Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferera D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S. and Polissiou M.G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem*, 13, 54-60.
- Kirmizibekmez H., Demirci B., Yeşilada E., Başer K.H. and Demirci F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Turkey. *Natural Product Communications*, 4(7), 1001-1006.
- Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. and Milos M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85, 633-640.
- Kumar C.G. and Anand S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- Kumar A., Shukla R., Singh P., Shekhar Prasad C. and Dubey N.K. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 575-580.

L

- Lado B.H. and Yousef A.E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.
- Lang G. and Buchbauer G. (2011). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 13-39.

Références bibliographiques

- Lawrence H.A. and Enzo A.P. (2009). Activity of Essential Oils against *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(12), 1590-1595.
- Lee Y.K., Choi J.H., Lee E.S., Lee S.J., Song K.M. and Baik H.K. (2003). Investigation of sterilization mechanism by atmospheric pressure plasma jet system. Plasma Science. ICOPS 2003. IEEE Conference Board – abstracts. The 30 th International Conference. pp 293.
- Leistner L. and Gorris L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 41-46.
- Liu H., Qiu N., Ding H. and Yao R. (2008). Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Research International*, 41, 363-370.
- Liu X., Yousef A.E. and Chism G.W. (1997). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by the combination of organic acids and pulsed electric field. *Journal of Food Safety*, 16, 287-299.
- Lopez-Bote C.J., Gray J.I., Gomaa E.A. and Flegal C.J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *British Poultry Science*, 39, 235-240.
- Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R. and Cañigüeral S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 519-524.
- Loughlin M.F., Jones M.V. and Lambert P.A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial of Chemotherapy*, 49(4), 631-639.
- Lu J., Mittal G.S. and Griffiths M.W. (2001). Reduction in levels of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 64, 964-969.
- Luo M., Jiang L.K., Huang Y.X., Xiao M., Li B. and Zou G.L. (2004). Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36, 277-283.
- Lv F., Liang H., Yuan Q. and Li C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057-3064.

M

- Mackey B.M. (2000). Injured bacteria. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, & G.W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 315-341). Gaithersburg: Aspen Publisher Inc.
- Mahboubi M. and Haghi G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 325-327.
- Mahboubi M. and Ghazian Bidgoli B. (2010). In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 17, 771-774.

Références bibliographiques

- Manás P., Pagán R., Álvarez I. and Condón S.U. (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology*, 20, 593-600.
- Mañas P. and Pagán R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6), 1387-1399.
- Mann C.M. and Markham J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
- Mao L.C., Pan X., Que F. and Fang X.H. (2006). Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. *European Food Research and Technology*, 222, 236-241.
- Marchal M. (2010). Etude de biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de docteur. Université de Strasbourg. France.
- Marzouk B., Fredj M.B.H., Chraief I., Mastouri M., Boukef K., and Marzouk Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6, 78-82.
- Mau J.L., Huanj P.N., Huang S.J. and Chen C.C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camhorota* mycelia. *Food Chemical*, 86, 25-31.
- Maxia A., Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., Gonçalves M.J., Cavaleiro C. and Salgueiro L. (2009). Chemical characterization and biological activity of essential oils from *Daucus carota* L. subsp. *carota* growing wild on the Mediterranean coast and on the Atlantic coast. *Fitoterapia*, 80, 57-61.
- Melo L.F. (2003). Biofilm formation and its role in fixed film processes. In: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. London, UK, Academic Presspp. 337-349.
- Mendoza-Yepes M.J., Sanchez-Hidalgo L.E., Maertens G. and Marin-Iniesta F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) en Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, 47-55.
- Mertens B. and Deplace G. (1993). Engineering aspects of high-pressure technology in the food industry. *Food Technology*, 47, 164-169.
- Midelet G. and Carpentier B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 262-270.
- Mihajilov-Krstev T., Radnović D. and Kitić D. (2010). Antimicrobial activity of *Satureja* L. essential oils against phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. *Biologica Nissana*, 1, 95-98.
- Miller H.E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 48, 91-97.
- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M. and Simin N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 2485-2489.

Références bibliographiques

- Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Orčić D., Jovin E. and Couladis M., (2010). Essential Oil of *Myrtus communis* L. as a Potential Antioxidant and Antimutagenic Agents. *Molecules*, 15, 2759-2770.
- Mittelman M.W. (1998). Structural and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81, 2760-2764.
- Mkaddem M., Boussaid M. and Ben Fadhel N. (2007). Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 19, 211-214.
- Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse pour l'obtention du diplôme du magistère en Biologie. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. Algérie.
- Mohammadi R., Esfahani S.H.M., Shadzi S. and Moattar F. (2008). Antifungal activity of *Myrtus communis* L. essential oil against clinical isolates of *Aspergillus*. *Journal of Isfahan Medical School*, 26(89), 105-111.
- Mohammedi Z. and Atik F. (2011). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Nature and Technologie*, 6, 34-39.
- Morgan S.M., Ross R.P., Beresford T. and Hill C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 414-420.
- Mosqueda-Melgar J., Raybaudi-Massilia R.M. and Martín-Belloso O. (2008). Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology*, 25, 479-491.
- Muñoz-Cuevas M., Guevara L., Aznar A., Martínez A., Periago P.M. and Fernández P.S. (2013). Characterisation of the resistance and the growth variability of *Listeria monocytogenes* after high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 29(2), 409-415.
- Mykytczuk N.C.S., Trevors J.T., Leduc L.G. and Ferroni G.D. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 95, 60-82.
- N**
- Najjaa H., Neffati M., Zouari S. and Ammar E. (2007). Essential oil composition and antibacterial activity of different extracts of *Allium roseum* L., a North African endemic species. *Comptes Rendues Chimie*, 10, 820-826.
- Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Bando E., Negrão M.A.F., Aparício Garcia C.D. and Dias F.B.P. (1999). Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 94(5), 675-678.

Références bibliographiques

- NCCLS (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-Fifth edition. NCCLS document M7-A5. [ISBN 1-56238-394-9] NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA, 19087-1898. USA.
- Nejad E.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A. and Yousefzadi M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry*, 110, 927-931.
- Nguefack J., Budde B.B. and Jakobsen M. (2004a). 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. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 395-400.
- Nguefack J., Letha V., Amvam Z.P.H. and Mathur S.B. (2004b). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 329-334.
- Nguefack J., Lekagne Dongmo J.B., Dakole C.D., Leth V., Vismer H.F., Torp J., Guemdjom E.F.N., Mbeffo M., Tamgue O., Fotio D., Amvam Zollo P.H. and Nkengfack A.E. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 151-156.
- Nickavar B., Alinaghi A. and Kamalinejad M. (2008). Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 203-209.
- Q**
- Oliver J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, 93-100.
- Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. and Naghdibadi H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus Xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518-1523.
- Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Bégin A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.
- Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Boistier E., Blum L.J. and Bonneau M. (2000). The development of an ultrasonic apparatus for the non-invasive and repeatable removal of fouling in food processing equipment. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 47-52.
- Oulahal-Lagsir N., Martial-Gros A., Bonneau M. and Blum L.J. (2003). *Escherichia coli*-milk Biofilm Removal from Stainless Steel Surfaces: Synergism between Ultrasonic Waves and Enzymes. *Biofouling*, 19(3), 159-168.
- Oulahal N., Martial-Gros A., Bonneau M. and Blum L.J. (2004). Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to “*Escherichia coli* milk” and “*Staphylococcus aureus* milk” biofilms. *Biofilms*, 1, 65-73.

Références bibliographiques

- Oussou K.R., Kanko C., Guessend N., Yolou S., Koukoua G., Dosso M., N'Guessan Y.T., Figueredo G. and Chalchat J.C. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. Mémoire / Full paper. *Comptes rendues Chimie*, 7, 1081-1086.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozen T., Demirtas I. and Aksit H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124, 58-64.
- Ozkan G., Simsek B. and Kuleasan H. (2006). Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and in vitro. *Journal of Food Engineering*, 79 (4), 1391-1396.
- Ozcan B., Esen M., Sangun M.K., Coleri A. and Caliskan M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*, 31(5) 637-641.
- P**
- Packiyasothy E.V. and Kyle S. (2002). Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*, 54 (9), 384-387.
- Pagán R., Condón S. and Sala F.J. (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3225-3232.
- Pagán R., Manas P., Alvarez I. and Condon S. (1999). Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Food Microbiology*, 16, 139-148.
- Palhan F.L., Vilches T.T.B., Santos R.B., Orlandoc M.T.D., Venturad J.A. and Fernandes P.M.B. (2004). Inactivation of *Colletotrichum gloeosporioides* spores by high hydrostatic pressure combined with citral or lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 61-66.
- Pang Chee Meng (2007). Biofilms in water separation membrane processes: from community structure and ecological characteristics to monitoring and control. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy department of civil engineering, National University of Singapore. Singapore.
- Park M.J., Gwak K.S., Yang I., Kim K.W., Jeung E.B., Chang J.W. and Choi I.G. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 80, 290-296.
- Patterson M.F. and Kilpatrick D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection*, 61(4), 432-436.
- Paul S., Dubey R.C., Maheswari D.K. and Chul Kang S. (2011). *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control*, 22, 725-731.

Références bibliographiques

- Pereira P.C., Cebola M.J. and M. Gabriela Bernardo-Gil M.G. (2009). Evolution of the Yields and Composition of Essential Oil from Portuguese Myrtle (*Myrtus communis* L.) through the Vegetative Cycle. *Molecules*, 14, 3094-3105.
- Perni S., Chalise P.R., Shama G. and Kong M.G. (2007). Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 311-314.
- Pflug I. and Gould G.W. (2000). Heat Treatment. In B.M. Lund A. Baird-Parker and G.M. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland: Aspen Publishers Inc. pp. 36-64.
- Pibiri M.C. (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en sciences. École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Suisse.
- Pol I.E., Mastwijk H.C., Bartels P.V. and Smid E.J. (2000). Pulsed electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 428-430.
- Politeo O., Juki M. and Milo M. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of free volatile aglycones from Laurel (*Laurus nobilis* L.) compared to its essential oil. *Croatica Chemica Acta*, 80(1), 121-126.
- Potthoff A., Serve W. and Macharis P. (1997). The cleaning revolution. *Dairy Industries International*, 64(6), 25-29.
- Prabuseenivasan S., Jayakumar M. and Ignacimuthu S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), 1-8.
- R**
- Rahman A. and Kang S.C. (2009). In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*, 116, 670-675.
- Rajkovic A., Smigic N. and Devlieghere F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29-S42.
- Raso J., Palop A., Pagan R. and Condon S. (1998). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 849-854.
- Rasooli I. (2007). Food Preservation - A Biopreservative Approach. *Food*, 1(2), 111-136.
- Ravishankar S., Fleischman G.J. and Balasubramaniam V.M. (2002). The inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiology*, 19, 351-361.
- Reichling J., Schnitzler P., Suschke U. and Saller R. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties - an Overview. *Forsch Komplementmed*, 16, 79-90.

Références bibliographiques

- Rendueles E., Omer M.K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R. and Prieto M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 1251-1260.
- Rentsenkhand T., Miklós T., László G., Papp T., Pesti M., Csaba V., Almássy K. and Krisch J. (2011). Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 480-486.
- Ríos J.L. and Recio M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
- Rodrigues V.M., Paulo T.V.R., Marques M.O.M., Petenate A.J. and Meireles M.A.A. (2003). Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(6), 518-1523.
- Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D. and Milillo M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727-732.
- Rossa A.I.V., Griffithsa M.W., Mittalc G.S. and Deeth H.C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms-review. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125-138.
- Ruberto G. and Baratta M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167-174.
- S**
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. and Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621-632.
- Salamci E., Kordali S., Kotan R., Cakir A. and Kaya Y. (2007). Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 569-581.
- Saldaña G., Puértolas E., López N., García D., Álvarez I. and Raso J. (2009). Comparing the PEF resistance and occurrence of sublethal injury on different strains of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in media of pH 4 and 7. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 160-165.
- Sandasi M., Leonard C.M. and Viljoen A.M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 1070-1075.
- Sandri I.G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L. and Echeverrigaray S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Food Chemistry*, 103, 823-828.

Références bibliographiques

- Sangun M.K., Aydin E., Timur M., Karadeniz H., Caliskan M. and Ozkan A. (2007). Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 28(4) 731-733.
- Sarikurkcu C., Ozer M.S., Eskici M., Tepe B., Şendil C. and Mete E. (2010). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1801-1805.
- Sarker S.D., Nahar L. and Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.
- Sárraga C. and Garcia Regueiro J.A. (1999). Membrane lipid oxidation and proteolytic activity in thigh muscles from broilers fed different diets. *Meat Science*, 52, 213-219.
- Sauer K. and Camper A.K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology*, 183, 6579-6589.
- Schlesier K., Harwat M., Bohm V. and Bitsch R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177-187.
- Schnitzler P., Schon K. and Reichling J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie*, 56, 343-347.
- Schnitzler P., Koch C. and Reichling J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop and sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1859-1862.
- Sergelidis D. and Abraham A. (2009). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control*, 20, 1-10.
- Serpaggi V., Remize F., Recorbet R., Gaudot-Dumas E., Sequeira-Le Grand A. and Alexandre H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*, 30, 438-447.
- Shekarforoush S.S., Nazer A.H.K., Firouzi R. and Rostami M. (2007). Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. *Food Control*, 18, 1428-1433.
- Sikkema J., DeBont J.A.M. and Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*, 59, 201-222.
- Simić M., Kundaković T. and Kovačević N. (2003). Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, 74, 613-616.
- Simoš M., Simoš L.C., Machado I., Pereira M.O. and Vieira M.J. (2006). Control of flow-generated biofilms using surfactants - evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 338-345.

Références bibliographiques

- Sinde E. and Carballo J. (2000) Attachment of *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439-447.
- Singha A., Singh R.K., Bhunia A.K. and Singh N. (2003). Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 36, 787-794.
- Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K. and Nychas G.J.E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*, 13(1), 65-75.
- Skoula M., Abidi C. and Kokkalou E. (1996). Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* Growing Wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 255-260.
- Smelt J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 152-158.
- Smelt J.P.P.M., Bos A.P., Kort R. and 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.
- Smid E.J. and Gorris L.G.M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman MS (Ed) *Handbook of Food Preservation*, Marcel Dekker, New York, pp 285-308.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. (2002). Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific phospholipase C production by *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *Journal of Medical Microbiology*, 51, 1-8.
- Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L. (2004). Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and Æ -toxin by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 1023-1027.
- Solomakos N., Govaris N., Koidis P. and Botsoglou N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159-166.
- Solórzano-Santos F. and Miranda-Navales M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 136-141.
- Somolinos M., García D., Pagán R. and Mackey B. (2008a). Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-Butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7570-7577.
- Somolinos M., Mañas P., Condón S., Pagán R. and García D. (2008b). Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* sublethally injured cells after Pulsed Electric Fields. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 352-356.

Références bibliographiques

- Somolinos M., García D., Condón S., Mackey B. and Pagán R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1928-1939.
- Sonboli A., Babakhani B. and Mehrabian A.R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61, 160-164.
- Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E.O. and Trajano V.N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.
- Strevett K.A. and Chen G. (2003). Microbial surface thermodynamics and applications. *Research in Microbiology*, 154, 329-335.
- Su Y., Zhang Q.H. and Yin Y. (1996). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high voltage pulsed electric fields. IFT Annual Meeting Book of Abstracts, 1996, Session 26A-14. In: Rossa A.I.V., Griffithsa M.W., Mittalc G.S. and Deeth H.C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms-review. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125-138.
- Sultan G.E., Kırıcı S., Alpaslan K.D., Türk M., Sönmez Ö. and İnan M. (2007). Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*, 74(4), 930-935.
- Sutherland I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Svoboda K.P. and Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Proceedings NAHA, 25-28 september, St. Louis Missouri, USA 105-127.
- I**
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A. and Cliver D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tanabe H., Yoshida M. and Tomita N. (2002). Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animal Science Journal*, 73, 389-393.
- Tassou C., Drosinos E.H. and Nychas G.J.E. (1995). Effects of essential essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 C and 10 C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.
- Tatsadjieu N.L., Yaouba A., Nukenine E.N., Ngassoum N.B. and Mbofung C.M.F. (2010). Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Food Control*, 21, 186-190.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Saraiva J.A. and Nunes M.L. (2008). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36, 81-87.

Références bibliographiques

- Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Daferera D., Polissiou M. and 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.
- Tepe B., Akpulat H.K., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E., Polissiou M. and Sokmen A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97, 719-724.
- Tepe B., Daferera D., Tepe A., Polissiou M. and Sokmen A. (2007). Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepta flavida* Hud.-Mor. from Turkey. *Food Chemistry*, 103, 1358-1364.
- Terebiznik M.R., Jagus R.J., Cerrutt P., De Huergo M. and Pilosof A.M.R. (2000). Combined effect of nisin and pulsed electric fields on the inactivation of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 63, 741-746.
- Thibaut J., Cailliez G.C., Francius G., Borges F., Imran M., Duval J.F.L. and Revol-Junelles A.M. (2012). Antibacterial activity of class IIa bacteriocin Cbn BM1 depends on the physiological state of the target bacteria. *Research in Microbiology*, 163 (5), 323-331.
- Tian J., Ban X., Zeng H., He J., Huang B. and Wang Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 464-470.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C., Muthukumarappan K., Bourke P. and Cullen P.J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.
- Trachoo N. (2003). Biofilms and the food industry. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25(6), 807-815.
- Trevors J.T. (2003). Fluorescent probes for bacterial cytoplasmic membrane research. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 57, 87-103.
- Tsong T.Y. (1990). Electrical modulation of membrane proteins: enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions. *Annual Review of Biophysics and Chemistry*, 19, 83-106.
- Turgis M., Han J., Caillet S. and Lacroix M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20, 1073-1079.

U

- Ultee A., Kets E.P.W. and Smid E.J. (1999). Mechanisms of Action of Carvacrol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606-4610.
- Ultee A., Bennink M.H.J. and Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4, 1561-1568.

V

Références bibliographiques

- Vaara M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56 (3), 395-411.
- Vagionas K., Graikou K., Ngassapa O., Runyoro D. and Chinou I. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 103, 319-324.
- Van Opstal I., Vanmuysen S.C.M., Wuytack E.Y., Masschalck B. and Michiels C.W. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* by high hydrostatic pressure at different temperatures in buffer and carrot juice. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 179-191.
- Vansant G. (2004). Radicaux libres et antioxydants: principes de bases, Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- Vega-Mercado H., Martin-Belloso O., Qin B.L., Jung Chang F., Gbngora-Nieto M.M., Barbosa-Gnovas G.V. and Swanson B.G. (1996). Non-thermal food preservation: Pulsed electric fields. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 151-157.
- Verdian-rizi M. (2009). Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages cultivated in Iran. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(1), 33-36.
- Vijay K.J., Thippareddi H. and Friedman M. (2006). Control of *Clostridium perfringens* in Cooked Ground Beef by Carvacrol, Cinnamaldehyde, Thymol or Oregano Oil during Chilling. *Journal of Food Protection*, 69(7), 546-551.
- Vijay K.J. and Friedman M. (2007). Carvacrol, Cinnamaldehyde, Oregano Oil, and Thymol Inhibit *Clostridium perfringens* Spore Germination and Out growth in Ground Turkey during Chilling. *Journal of Food Protection*, 70(1), 218-222.
- Vincent M., England L.S. and Trevors J.T. (2004). Cytoplasmic membrane polarization in Gram-positive and Gram -negative bacteria grown in the absence and presence of tetracycline. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1672, 131-134.
- Vivek K.B., Atiqur R., Choi U.K., Youn S.J. and Kang S.C (2007). Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 105, 1061-1066.
- Vlková H., Babák V., Seydlová R., Pavlík I. and Schlegelová J. (2008): Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms— a review. *Czech Journal of Food Science*, 26, 309-323.

W

- Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L. and Bartolo R.G. (2003). Activity and mechanism of action of selective biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 240-247.

Références bibliographiques

- Wan J., Coventry J., Swiergon P., Sanguansri P. and Versteeg C. (2009). Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety e pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science and Technology*, 1-11.
- Watnick P. and Kolter R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-2679.
- Wei A. and Shibamoto T. (2010). Medicinal activities of essential oils: Role in disease prevention. *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. Chapter 4. pp. 59-70.
- Willcox J.K., Ash J.L. and Catignani G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 275-295.
- Wong J.W., Hashimoto K. and Shibamoto T. (1995). Antioxidant activities of Rosemary and Sage extracts and vitamin E in a model meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2707-2712.
- Wratten S.D., Sven E.J. and Brian F. (2008). Conservation biological control and biopesticides in agricultural. In *Encyclopedia of Ecology*. Oxford: Academic press. 744-747.
- X**
- Xianming S. and Zhu X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 407-413.
- Y**
- Yadegarinia D., Gachkar L., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67, 1249-1255.
- Yamamoto H. (2000). Viable but non culturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. *Journal of Infectiology Chemotherapy*, 6, 112-114.
- Yuk H.G. and Marshall D.L. (2006). Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 39-44.
- Z**
- Zheng G.Q., Kenney P.M. and Lam L.K.T. (1992). Myristicin - a potential cancer chemopreventive agent from parsley leaf oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 107-110.
- Zimmermann U. (1986). Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews on Physiological Biochemical Pharmacology*, 105, 175-256.
- Zrira S. and Benjilali B. (2003). The constituents of the oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Atlatica* and *L. stoechas* ssp. *Stoechas* from Morocco. *Journal of Essential Oil Research*, 15, 68-69.
- Zsuzsanna S., Hohmann J. and Molnar J. (2010). Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. *Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics*. 179-201 ISBN: 978-81-308-0390-6. Editor: Debprasad Chattopadhyay.

Annexes

Annexe1: Composition des milieux de cultures utilisés

Milieu TSA (Tryptone Soy Agar)

Peptone de caséine :.....15 g/l.

Peptone de Soja :.....5 g/l.

Chlorure de sodium :.....5 g/l.

Agar :.....15 g/l.

pH 7,3±0,2

Milieu TSB (Tryptone Soy Broth)

Peptone de caséine :.....17 g/l.

Peptone de Soja :.....3 g/l.

Chlorure de sodium :.....5 g/l.

Phosphate de dipotassique :.....2,5 g/l.

Glucose :.....2,5 g/l.

pH 7,3±0,2

Milieu BHI (Bouillon Cœur Cervele)

Extrait de cœur-cervele:.....17,5 g/l.

Peptone:.....10 g/l.

Chlorure de sodium :.....5g /l.

Phosphate disodique :.....2,5 g/l.

Glucose :.....2 g/l.

pH 7,3±0,2

Milieu MHB et MHA (Bouillon Muller-Hinton et Gélose Muller-Hinton)

Extrait de viande de bœuf :.....2 g/l.

Hydrolysate de caséine :.....17,5 g/l.

Amidon :.....1,5 g/l.

pH 7,0

La gélose de MHA est préparée par ajout de 17 g/l.

Gélose PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato Infusion from 200 g :.....4 g/l.

Dextrose:20 g/l.

Agar:.....15 g/l.

pH 5.6 ± 0.2

Annexe 2: Composition des solutions

Tampon McIlvaine (Tampon citrate-phosphate)

Acide citrique	0,1 M.
Sodium Hydrogen phosphate anhydride	0,2 M.
Ajustement du pH à 4 ou 7	

Tampon d'anisotropie

Di-sodium hydrogenophosphate anhydre	3 g/l.
Potassium dihydrogenophosphate	6 g/l.
Chlorure de sodium	2 g/l.
Ammonium phosphate	8 g/l.
pH 7,6	

Préparation d'une solution mère de TMA-DPH ou DPH de 4,4mM

TMA-DPH : 4 mg/4 ml du Tétrahydrofurane.

DPH: 8 mg/4 ml du DMSO.

Annexe 3: Suivi de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 en présence de différentes concentrations des huiles essentielles de *L. nobilis*, *S. calamintha* et *M. pulegium*

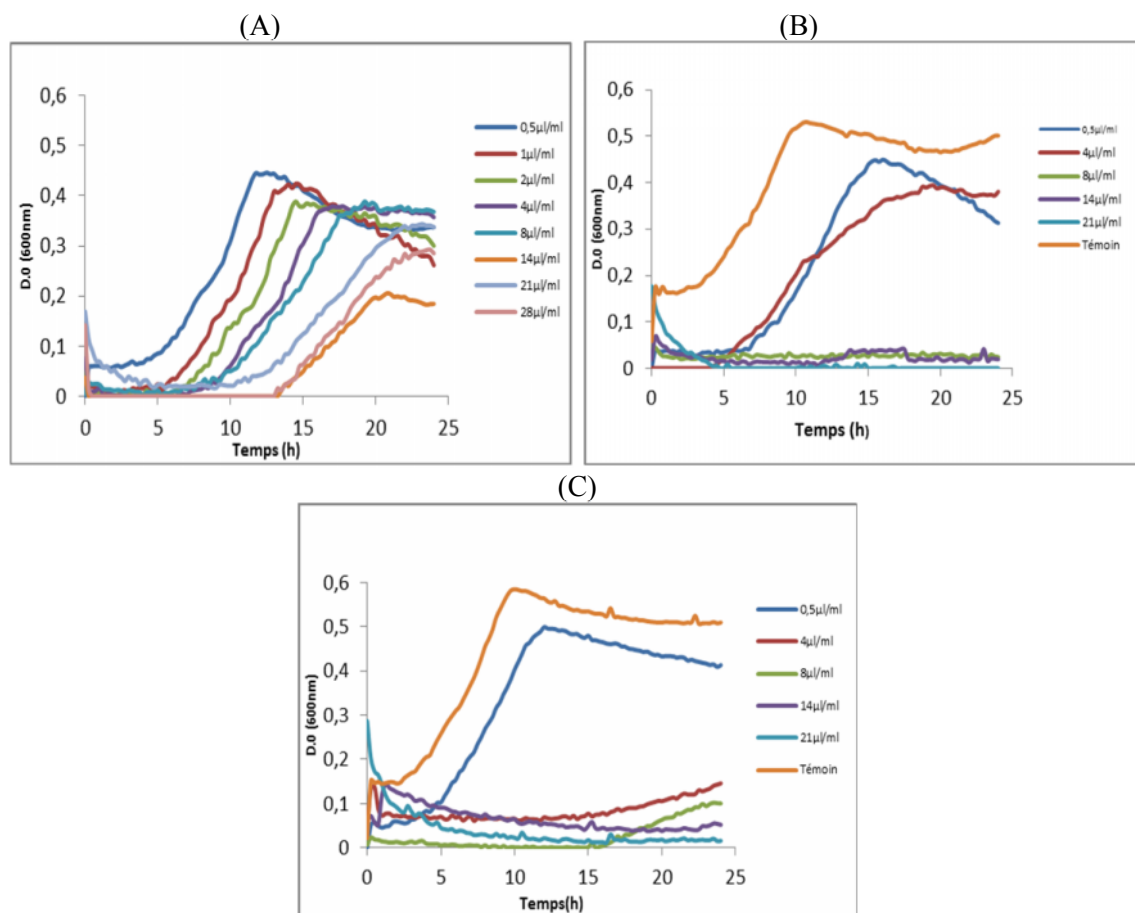


Figure 1. Suivi de la croissance de *L. innocua* LRGIA 01 en présence de différentes concentrations des huiles essentielles de *L. nobilis* (A), *M. pulegium* (B) et *S. calamintha* (C).

Annexe 4: Suivi de l'anisotropie de fluorescence du DPH ou TMA-DPH de *L. innocua* LRGIA 01 pendant 280min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis*, *S. calamintha* et *M. pulegium*

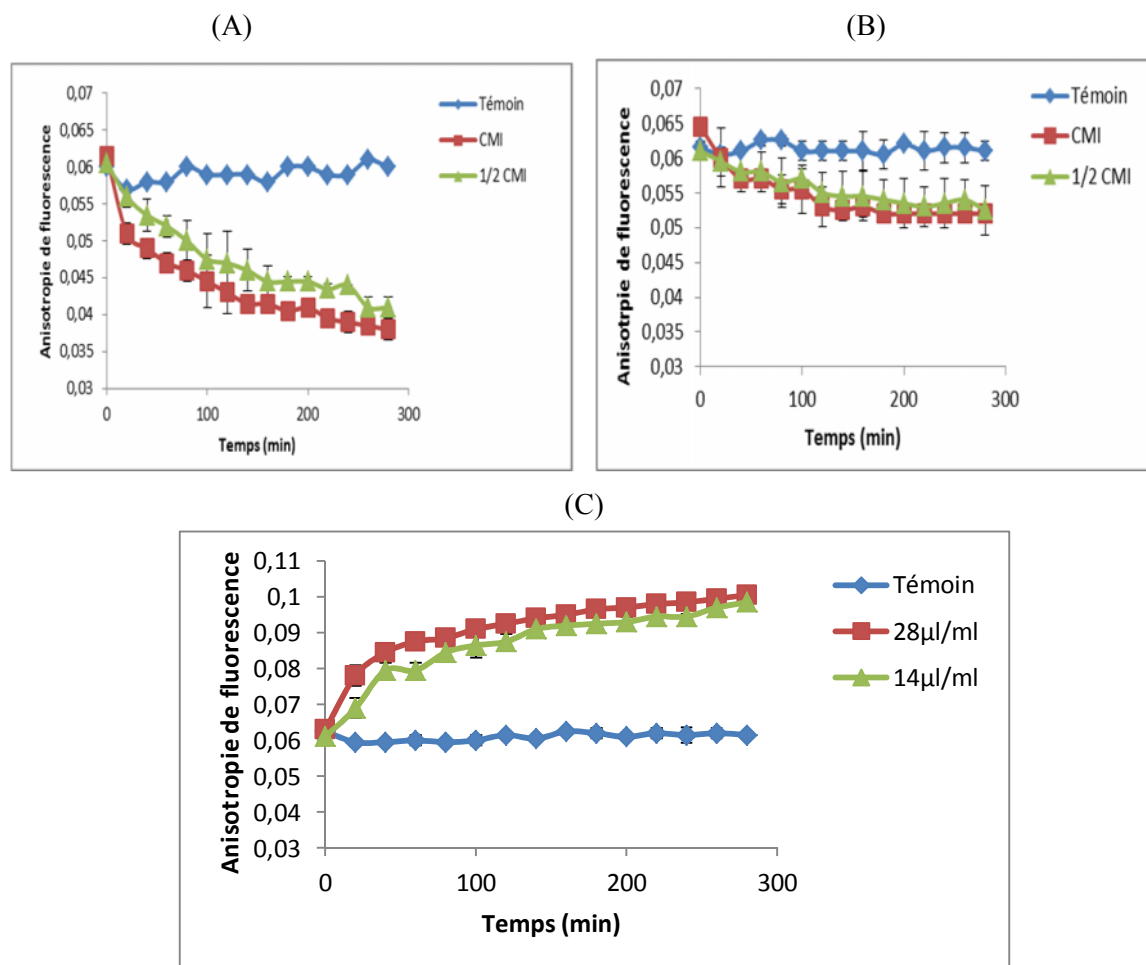


Figure 2. Suivi de l'anisotropie de fluorescence du DPH de *L. innocua* LRGIA 01 pendant 280 min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis* (A), *S. calamintha* (B) et *M. pulegium* (C).

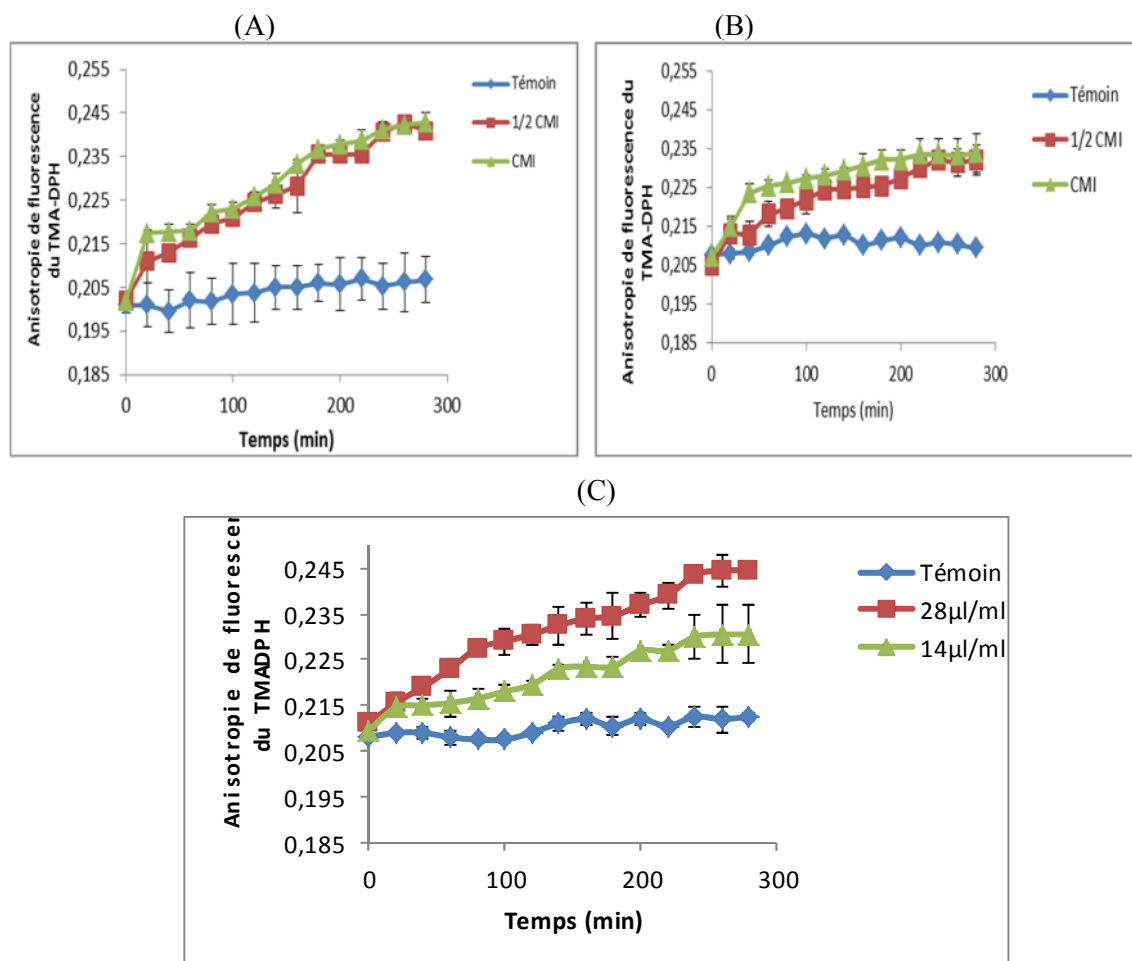


Figure 3. Suivi de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH de *L. innocua* LRGIA 01 pendant 280 min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis* (A), *S. calamintha* (B) et *M. pulegium* (C).

Annexe 5: Suivi de l'anisotropie de fluorescence du DPH ou TMA-DPH d'*E. coli* CECT 471 pendant 280min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis*, *S. calamintha* et *M. pulegium*

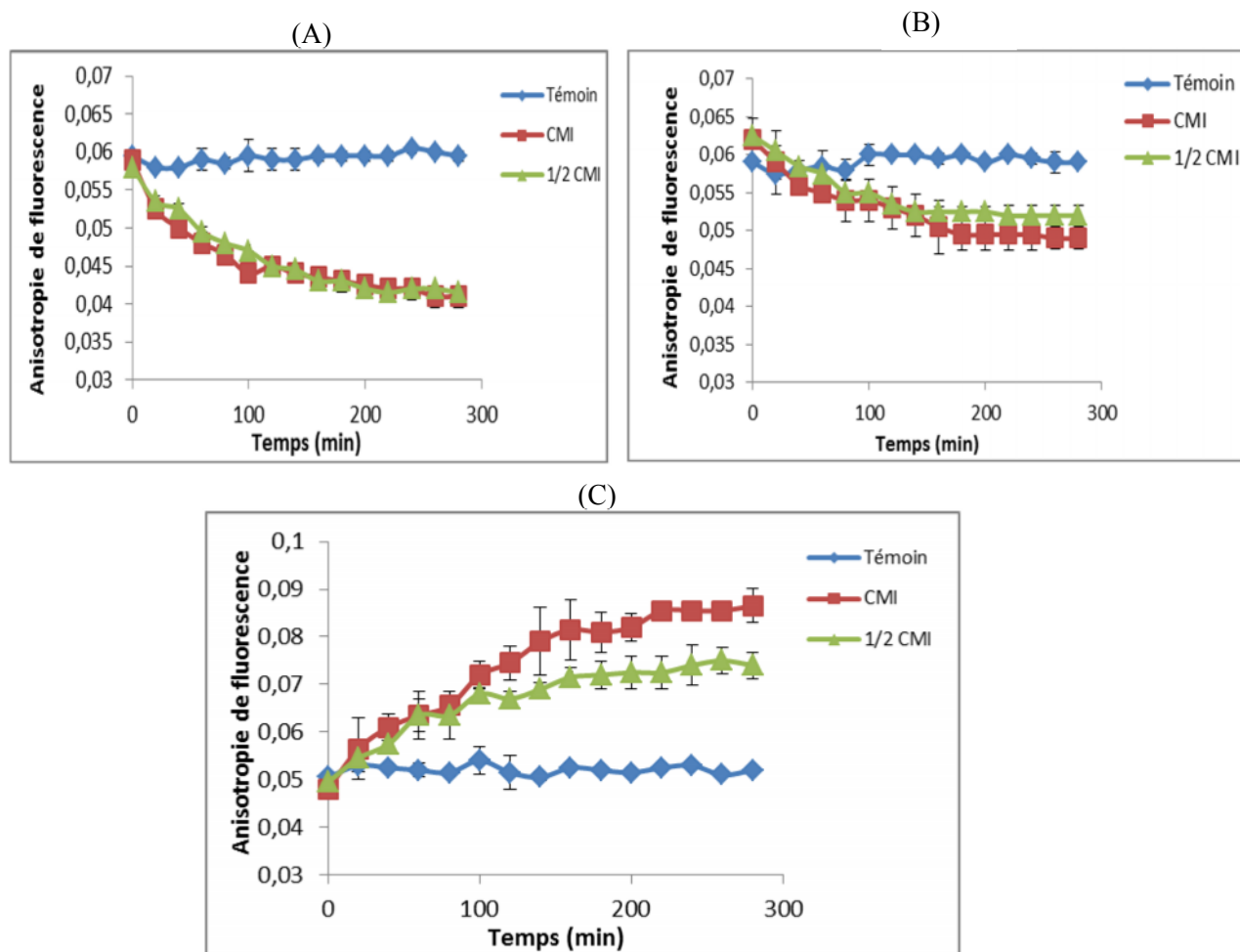


Figure 4. Suivi de l'anisotropie de fluorescence du DPH d'*E. coli* CECT 471 pendant 280 min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis* (A), *S. calamintha* (B) et *M. pulegium* (C).

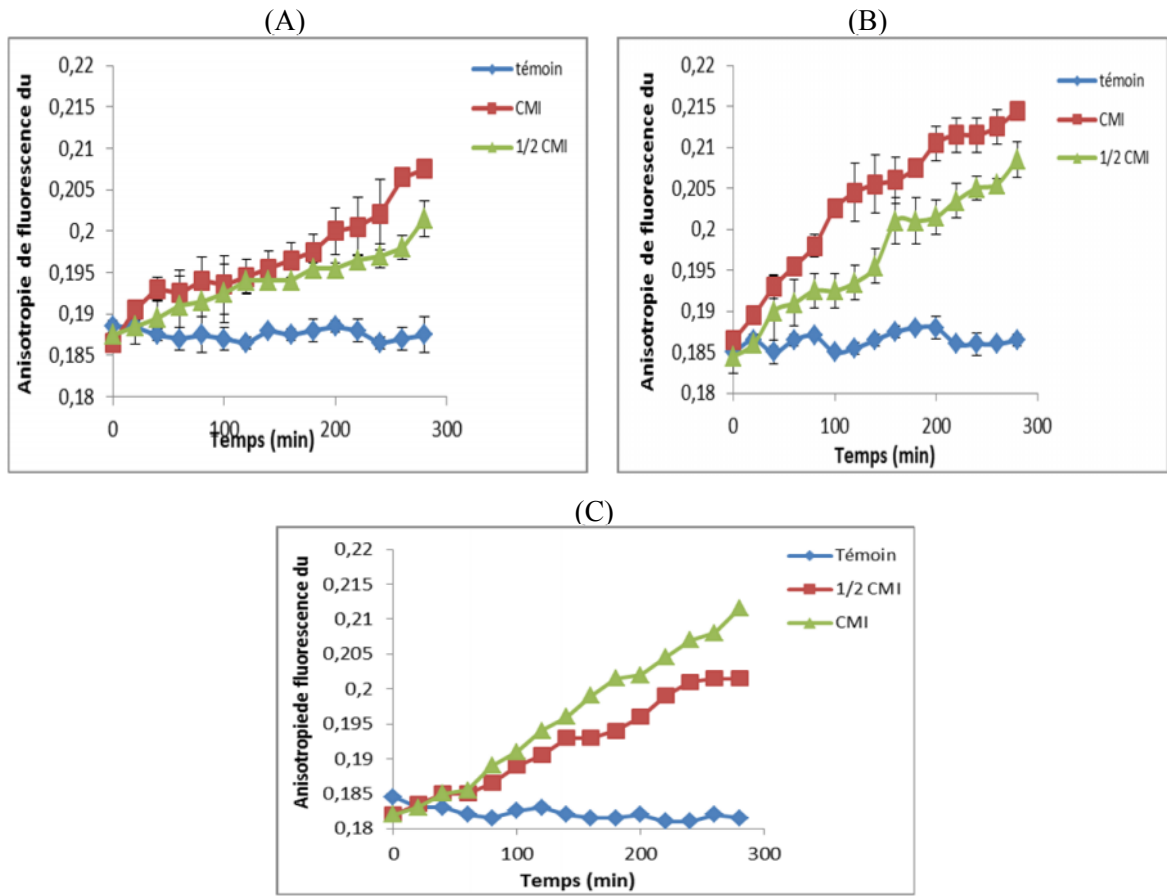


Figure 5. Suivi de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH d'*E. coli* CECT 471 pendant 280 min en présence des huiles essentielles de *L. nobilis* (A), *S. calamintha* (B) et *M. pulegium* (C).