République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Sciences Alimentaires
Option : Industrie laitière

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Protection des fromages contre la souche de *Pseudomonas par des extraits végétaux*

Présenté par :
Ouandjeli Djohra

Soutenu le : **13 Juin 2016**
Devant le jury composé de :

Mr. Moussi k.	MAA	Président
Mr. Madani K.	Professeur	Encadreur
Mme Adrar S.	MAA	Examinatrice
Melle Oussaid S.	MAA	Co-Encadreur

Année universitaire : 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Pr Madani Khodir et mon co-encadreur Mlle Oussaid Saliha qui ,en acceptant de diriger ce travail, m' ont permis de profiter de leurs conseils, leur aide et encouragements, qu'ils trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m' avoir accordé leur confiance que pour m' avoir guidée dans mon travail.

Mes sincères remerciements s'adressent également au président, Mr Moussi Kamel ainsi qu'à Mme Adrar de m'avoir fait le grand honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.

Je ne saurais remercier mes parents pour leurs appuis et leur confiance en moi, ce qui m'encourage à aller toujours plus loin.

Je remercie les membres du laboratoire L3BS. Merci à tout un chacun de leur aide précieuse et inoubliable.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail à:

Mes parents que je ne remercierai jamais assez pour leur amour et leur appui inconditionnel durant toutes ces années;

L'âme de mes grand- pères;

Mes frères Yacine et Lyes, un grand merci pour votre soutien moral;

Tous (tes) mes amis (es), notamment Dyhia pour son intarissable soutien et aide, en souvenir de toutes ces années passées ensemble; ainsi que mes amis de Bejaia et particulièrement mon amie ouazna.

Ma grande famille;

D. Ouandjeli

LISTE D’ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AOC : appellation d'origine contrôlée.

AOP : appellation d'origine protégée.

BHIB : brain heart infusion bouillon.

CMB : concentration minimal bactericide.

CMI : concentration minimal d'inhibition.

CSP : cold shock protein.

CSR : cold shock respense.

EA : fraction d'éthyle acétate

EAM : Microwave assisted extraction.

EB : Extrait brut.

EP : Ether de pétrole.

FA : phase aqueuse**.**

HE : huile essentielle.

K_{30} : Kanamycin (30µg/mL).

I_{10} : Imipineme (10µg/mL).

INAO : institut national de l'origine et de la qualité.

MSR : méthodes des surfaces des repenses.

O_{30} : Oxytetracucline (30µg/mL).

TPC : composés polyphénoliques totaux

USDA : United States Department of Agriculture

v/m: volume-masse.

v/v : volume/ volume.

LISTE DE FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La diversité des fabrications fromagères 3

Figure 2 : le dispositif de l'extractionpar MAE (photo u laboratoire BBBS). 15

Figure 3 : Surfaces de réponse des rendements en CPT (mg EAG/g) obtenus par EAM de combinaison de deux facteurs (X2X3, X3X1 et X2X1). 23

Figure 4: Intervalle de confiance observé par rapport aux valeurs prédites du BBD. 25

Figure 5: profile de prédiction des rendements en CPT de l'extrait des racines de *S, holoschoenus.* 26

Figure 6 : Photographie des zones d'inhibition obtenue sur P. areruginosa 28

Figure 7: Contour de surface pour les combinaisons des extraits, (a) : à 6 °C; b : à 37°C. 30

Figure 8: Photographie des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec les diffrents mélanges à 37°C (a) et à 6°C (b). 31

Figure 9 : Cinétique de croissance de *P.aeruginosa* inoculé dans le fromage avec ou sans traitement par le mélange optimisé. C1 : Concentration du mélange à 0,2% (v/m) ; C2 : Concentration du mélange à 0,4% (v/m). 32

LISTE DE TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Les différentes classes des polyphénols 10

Tableau II : : classification de Scirpus holoschoenus et de Thymus fontanesii selon l'USDA. 13

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques du rhizome de *S. holoschoenus*. 16

Tableau IV : Les limites des variables indépendantes utilisées pour la construction d'un model

Tableau V : Les résultats en CTP des expériences à un seul facteur pour EAM, solvant, acétone (%), temps et l'intensité d'irradiation. 24

Tableau VI : Conditions optimales et résultats des dosages colorimétrique de l'EMA par RSM. 24

TableauVII : Estimation des paramètres 26

Tableau VIII: : Taux d'extraction, dosage photochimique et activité antioxydante des extraits 27

Tableau IX : Effet antibactérien de la fraction EA, l'H.E de *T. fontanesii* et de l'acide lactique à différentes concentrations sur *P.aeruginosa*..... 28

Tableau X : Valeurs des CMIs et CMBs..... 28

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction 1
I. **Synthèse bibliographique** 2
I. 1. Le fromage 2
I.1.1. Fabrication et classification des fromages 2
I.1.1.1. Les principes généraux de technologie fromagère 2
I.1.1.2. Classification des fromages 2
I.1.2. La flore fromagère 4
I.1.3. Conservation du fromage 4
I.1.3.1. Les limites de la conservation 5
I.2. La place des psychrophiles dans le monde du vivant 6
I.2.1. Classification des microorganismes psychrotrophiles 6
I.2.1.1. Les psychrophiles obligatoires 6
I.2.1.1. Les psychrotrophes 6
I.2.2. Stratégie d'adaptation au froid 7
I.2.2.1. Les difficultés de croissance à basses températures 7
I.2.2.2. Réponse au stress froid 7
I.2.2.2.1.Adaptation des membranes cellulaires 7
I.2.2.2.2. Adaptation des enzymes 8
I.2.2.2.3.Synthèse protéique 8
I.3. Le stress oxydatif et les antioxydants 8
I.3.1. Les antioxydants 8
I.3.2. Les plantes et leurs métabolites secondaires 9
I.3.2.1. Les polyphénols 9
I.3.2.2. Les huiles essentielles 11
I.3.2.3. Les propriétés biologiques des polyphénols et des huiles essentielles 11
I.3.2.3.1. Activité antioxydante 11
I.3.2.3.2. Activité antibactérienne 11
I.3.3. Notions sur les plantes étudiées 12
I.3.3.1. *Sirpus holoschoenus* 12
I.3.3.2. *Thymus fontaneseii* 13

PARTIE EXPERIMENTALE

II. **Matériel et méthodes** 14
II.1. Matériel biologique 14
II.2. Matrice d'application (fromage frais) 14

II.3. Méthodes d'analyses 14
II.3.1. Extraction des composés phénoliques 14
II.3.1.1. Procédure d'extraction 15
II.3.1.2. Etude préliminaire 16
II.3.1.3. Application de Box-Boenken Disiner 16
II.3.1.4. Fractionnement de l'extrait brut 17
II.3.2. Extraction des huiles essentielles de *T. fontaneseii* 17
II.3.2.1.Procédure d'extraction 18
II.3.3. Dosage phytochimique de l'extrait brut et ses différentes fractions 18
II.3.3.1. Dosage des polyphénols totaux 18
II.3.3.2. Dosage des flavonoïdes 18
II.3.3.3. Dosage des tannins 18
II.3.4. Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait brut et ses différentes fractions 19
II.3. 5.Evaluation de l'activité antibactérienne 19
II.3.5.1. Méthode de diffusion 19
II.3.5.2. Effet des combinaisons d'EA, l'H.E et l'acide lactique 20
II.3.5.3. Détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB). 20
II.3.6. Effet inhibiteur du mélange H.E et fraction EA sur *P.aeruginosa* inoculé dans le fromage frais. 20
II. 3. 7. Analyse statistique 20

III. **Résultat et discussion**……. 21
III.1. Extraction des composés phénoliques à partir du rhizome de *S. holoschoenus* 21
III.1.1. Etude préliminaire de sélection des conditions d'extraction appropriée 21
III.1.2. Optimisation de l'EAM dans le BBD 22
III.1.3. Rendement d'extraction des H.Es, taux d'extraction, dosage photochimique et activité antioxydante des différentes fractions 27
III.2. Activité antibactérienne 27
III.2.1. Activité individuelle sur gélose 27
III. 2. 2. Effet combiné des différents agents antibactérien 30
III. 2.3. Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB) 31
III.3. Effet inhibiteur du mélange sur *P. aeruginosa* inoculée dans le fromage frais 32
Conclusion 33
Références bibliographiques
Annexes

INTRODUCTION

Introduction

L'amélioration constante des performances techniques des moyens frigorifiques de transport et d'entreposage ont favorisé la commercialisation de produits réfrigérés dont la durée de conservation peut atteindre plusieurs semaines voire plusieurs mois. Toutefois, cette évolution technologique valorise l'émergence de la flore microbienne psychrotrophe, faisant sa remise en cause (Cavicchioli *et* Ricardo, 2016).

Les bactéries psychrotrophes sont définies par leur aptitude à se développer à basses et moyennes températures. Ce sont des agents de toxi-infections alimentaires ou d'altération de la qualité des denrées alimentaires (Bornert, 2000). De plus, L'usage extensif d'agents antimicrobiens dans les produits alimentaires et dans la médication humaine et animale conduit à la sélection de souches bactériennes multi résistantes. De même, l'utilisation de conservateurs synthétiques tels que : BHA (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), BHT (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluéne), TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) et le PG (gallate de propyle) s'avère toxique (kahl *et* Kappus,1993).

L'augmentation de la demande du consommateur pour des produits sains sans conservateurs encourage l'industrie alimentaire à valoriser les substances bioactives d'origine végétale (Grigoraş, 2012). En effet, les composés phénoliques issus des végétaux et les huiles essentielles connaissent de nos jours un gain d'intérêt pour leur éventuelle utilisation comme alternatives aux substances synthétiques (Tamgno *et* Ngamo, 2014).

La présente étude rentre dans le cadre de la valorisation du patrimoine floristique et la recherche de nouvelles substances bioactives. En effet, le travail est subdivisé en deux :

Partie théorique qui rassemble des données théoriques sur les microorganismes psychrotrophes, les fromages et leur conservation, les plantes médicinales, leurs principes actifs et leurs propriétés biologiques.

Partie expérimentale qui consiste en l'exploitation des profils antibactériens et antioxydants de l'extrait phénolique de *Sirpus holoschoenus*, de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et de l'acide lactique. En plus des tests *in vitro*, l'effet de ces agents individuels ou combinés comme conservateur du fromage frais contre la contamination par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a été évalué à 6 et 37°C.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Synthèse bibliographique

I. 1. Le fromage

Le fromage est l'un des plus anciens aliments manufacturés. C'est un produit obtenu par coagulation partielle ou totale sous l'effet d'une acidification à caractère lactique et/ou par l'apport d'enzymes coagulantes donnant lieu à un gel. Ce dernier est égoutté puis affiné ou non.

Aujourd'hui, plus de l00 sortes sont dénombrées dont 46 bénéficiant d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP) ou d'une Appellation d'Origine Contrôlée (AOC) (Guerrini, 2003).

I.1.1. Fabrication et classification des fromages

I.1.1.1. Les principes généraux de technologie fromagère

Selon Mietton and Humbert (1994), la technologie fromagère compte trois principales étapes:

- **La coagulation du lait** : Elle correspond à des modifications physicochimiques des micelles de caséines, sous l'action d'enzymes protéolytiques et/ou de l'acide lactique, entrainant la formation d'un réseau protéique tridimensionnel du gel,
- **L'égouttage du caillé** : Il assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum,
- **L'affinage :** Il se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes.

I.1.1.2. Classification des fromages

Selon les paramètres mis en œuvre au niveau des différentes étapes de transformation du lait en fromage et là la flore microbienne originelle du lait ou inoculée, une grande variété de produits peut être obtenue tel qu'il est traduit par (Cuvillier, 2007).

Parmi ces variétés obtenues à partir de lait de vache, de chèvre, de brebis et de bufflonne, dix grandes familles de fromages peuvent être distinguées : les pâtes molles à croute fleurie, les pâtes molles à croute lavées, les persillées, les pressées non cuites, les pâtes pressées cuites, les fromages fondus, les pâtes persillées et les pâtes fraiches. Ces trois dernières familles représentent 30% de la production totale du fromage.

Selon l'Institut National de l'Origine et de la Qualité (I.N.AO), cette grande diversité est due à la variation des paramètres de fabrication (I.N.A.O, 2011).

La figure 1 reprend les étapes de fabrication de différents types de fromages qui correspondraient à des facteurs de classification. Ces différences technologiques portent

principalement sur le mode de coagulation qui peut être mixte, par des bactéries lactiques, qui donne un gel lisse et homogène du fait de l'abaissement du pH et de l'augmentation de la solubilité du phosphate micellaire (Le Graet *et* Brulé, 1993), ou une coagulation enzymatique (chymosine et trypsine) qui hydrolyse les caséines kappa formant un gel par floculation et agrégation (Amiot *et al.* 2002; Gagnon 2011) . Ce sont les conditions d'affinage (température, humidité de la salle d'affinage, soins des fromages) qui sont en partie à l'origine d'un croutage différent des fromages. De plus, la vitesse de l'égouttage et le type de croûte souhaitée (avec ou sans levures et moisissures en surface) sont aussi des facteurs déterminant le type de fromage (Amiot *et al.*, 2002).

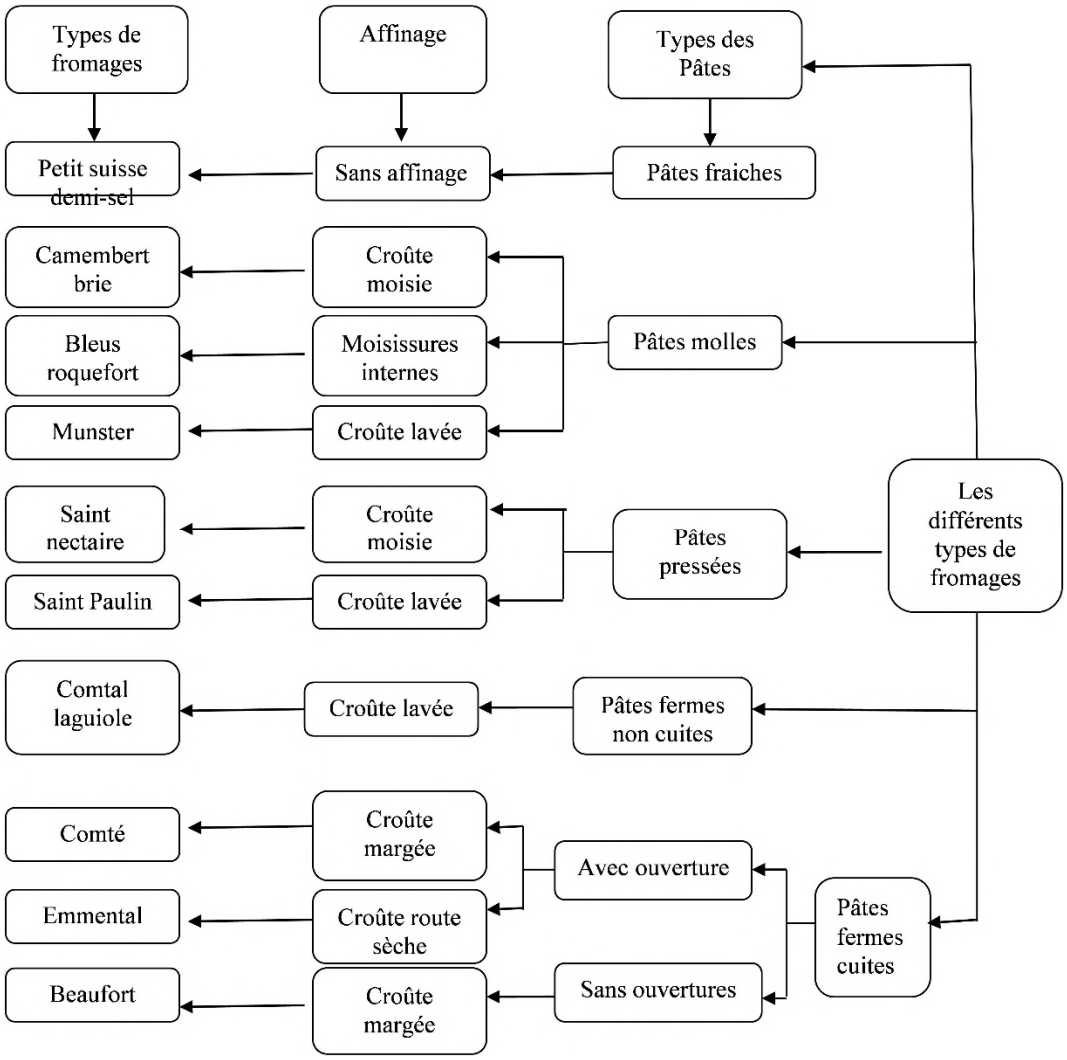


Figure 1**:** La diversité des fabrications fromagères (Cuvillier, 2007)

I.1.2. La flore fromagère

Le fromage sous microscope représente tout un micro-écosystème qui joue un rôle important sur le résultat final, souhaité ou non de ce produit. L'origine de ces flores est principalement due à la flore initiale du lait (dans le cas des fromages au lait cru), à la flore de contamination post-traitement thermique ou à la flore d'affinage (McSweeney, 2007). La préservation *in situ* de la diversité microbienne tout au long de la chaîne de production permet de maintenir une biodiversité microbienne qui garantit la richesse et la diversité sensorielles des fromages (Montel et al., 2005).

Parmi les microorganismes existants, il y'a :

− Les bactéries lactiques : Ce sont des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples. Elles sont appelées bactéries opportunistes vu leur rôle dans la formation du goût (protéolyse), de la texture et des ouvertures (McSweeney, 2004).

− Les bactéries propioniques : Ce sont des bactéries fermentant les lactates pour donner de l'acide acétique et propionique, ainsi que du CO_2. Elles participent à la formation du goût et de l'ouverture des fromages (Montel *et al*., 2014).

− Les microcoques, les staphylocoques non pathogènes : Ils sont responsables de la formation du goût des fromages et constituent la flore de surface (Fort Irlinger, 2000).

- Les levures sont abondantes (en moyenne 100 fois plus à la surface des fromages qu'à l'intérieur. Elles interviennent dans la désacidification de la pâte au début d'affinage, permettant l'implantation ultérieure d'une flore acide responsable du goût (Beuvier *et* Feutry, 2005).

- *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti* sont des moisissures présentes respectivement à la surface des fromages à pâte molle à croûte fleurie (Camembert) et à l'intérieur des bleus (McSweeney, 2004).

Il est à noter que le regroupement des microorganismes en flore utile ou flore d'altération est à nuancer en fonction des technologies considérées, ainsi la concurrence de la flore totale dans le fromage est régénérée par les conditions internes ou externes offertes au fromage ; par exemple, le Mucor est utile en Tomme de Savoie, mais nuisible en Camembert (accident du « poil de chat ») (Beuvier *et* Feutry, 2005) ou encore, les flores à l'origine des protéolyses et/ou lipolyses tels que les *Pseudomonas* (Cantoni *et al*., 2001).

I.1.3. Conservation du fromage

La transformation du lait en fromage est un mode de conservation du lait entreposé au frais (4-6°C), empêchant ainsi le développement de la flore psychrophile, particulièrement les Gram négatif tel que les *Pseudomonas* qui s'y développent au bout de 120h (Yabrir, 2014).

Parmi les différentes méthodes de conservation il y'a :

- la plus connue est l'affinage où les constituants du caillé sont soumis à une digestion enzymatique des microorganismes, principalement des protéases et/ou de la présure, rendant le fromage souple et donnant lieu à des flaveurs (Beresford *et al*., 2001) ;
- L'addition de bactéries lactiques, en produisant de l'acide lactique, jouent un rôle dans l'acidification du caillé ou d'autres souches inhibitrices des entérobactéries telles que les flores de surfaces désirées ou les moisissures (*P. camenberti* ou *P. requeforti*) (Turcot *et al.*, 2002) ;
- Les conditions d'anaérobiose obtenues avec des emballages adéquats leur permet une conservation prolongée, cet emballage offre aussi un moyen de préservation contre les contaminations ultérieures possibles (Sabry *et* Guerrant, 1958) ;
- La saumure et le sel piègent l'eau présente dans le fromage, ce qui empêche le développement des micro-organismes (Mansour *et* Alais, 1973) ;
- L'ajout d'additifs alimentaires synthétiques est généralement préconisé (propionate de sodium E281, nisine…etc.) ;
- L'entreposage en atmosphère contrôlée avec des teneurs variées d'oxygène et d'azote …etc. (Champagne *et al*., 2003) ;
- La réfrigération seule ou en association avec l'une des méthodes sus-citées est considérée comme le complément indispensable pour une bonne conservation (Moulin, 1939). Une autre méthode qui fait appel au froid est la congélation avant commercialisation (Accolas *et* Auclair, 1967).

I.1.3.1. Les limites de la conservation

- **L'oxydation** : L'oxydation lors de l'entreposage ou le contact avec les facteurs physiques extérieurs est un problème très rencontré lors du stockage. Par ailleurs, l'usage des antioxydants synthétiques : Butyl hydroxy anisol (BHA), Butyl hydroxy Toluéne (BHT)…etc est rapporté comme étant cancérigène, s'opposent aux nouvelles tendances de consommation (Jamshidian, 2011).
- **Les microorganismes du froid :** La réfrigération est le moyen de conservation des fromages le plus utilisé en industrie, particulièrement pour le fromage frais, par conséquent le risque étant pour le développement de la flore psychrophile dans les conditions d'aérobioses (McSweeney, 2007).

Le risque réside dans leur synthèse enzymatique protéolytique et lipolytiques thermolabiles, toujours présent même après une pasteurisation, sans oublier le risque d'une

contamination post-pasteurisation comme lors du lavage à l'eau glacée pour le drainage du lactosérum et le durcissement de la pâte, causant ainsi des lipolyse excessive incontrôlée et un développement de rance et d'arôme indésirable , ainsi qu'une putrification …etc., très rencontré dans le cottage cheese (McSweeney, 2007).

I.2. La place des psychrophiles dans le monde du vivant

La température est l'un des paramètres environnementaux les plus impliqués dans la régulation de la diversité et la répartition des espèces. Cette diversité est maximale aux températures, modérées comprises entre 20 et 40°C (mésophiles), et diminue progressivement de part et d'autre de cet intervalle pour constituer le groupe des psychrophiles aux températures allant de 5 à 20 °C ou des thermophiles (40-55C°) (Bornert, 2000).

Les bactéries se développant dans les milieux froids, supposés être inadéquats (avant ces dernières années), posent problème dans le domaine de l'alimentation et de la conservation (Bornert, 2000).

I.2.1. Classification des microorganismes psychrophiles

La croissance et la survie d'un micro-organisme sont caractérisées par plusieurs facteurs physico-chimiques, biotiques et abiotiques. Cela signifie qu'un biotope, pour un microorganisme, est déterminé par une gamme pour chaque facteur permettant sa croissance (Kristjansson *et* Hreggvidsson, 1995)**.**

Un psychrophile se dit d'un micro-organisme qui a la capacité de se développer à basses températures (Morita, 1975). Les psychrophiles sont classés en:

I.2.1.1. Les psychrophiles obligatoires (préférant le froid) : Ils sont capables de se développer à des températures inférieures ou égale à 0°C, leurs températures optimales sont de 15°C et leurs maximales n'excédant pas 20°C (Rossi *et al*., 2009).

I.2.1.1. Les psychrotrophes (tolérant le froid) : ces microorganismes sont capables de croitre à la fois à des moyennes et basses températures (Junge *et al*., 2011)**.** Ils se développent à des températures avoisinantes de zéro, et leurs optimum peut atteindre des valeurs supérieures à 20°C, d'où leur appellation les psychrophiles facultatifs (Turchetti *et al*., 2008; Rossi *et al*., 2009).

A eux deux, ils présentent une très grande diversité microbienne et dans tous les biotopes froid. On y trouve les bactéries Gram négatif ; exemple :*Alteromonas, Pseudomonas*

(Cayol et al., 2011) et Gram positif ainsi que des levures, des cyanobactéries et des algues. Ils joueraient un rôle important tels que certains processus industriels auxquels des enzymes actives au froid pouvant être impliquées (Oikawa *et al*., 2001), et cela dans différents domaines allant du textile au médical en passant par l'agroalimentaire (Burhan *et al*., 2014).

I.2.2. Stratégie d'adaptation au froid

I.2.2.1. Les difficultés de croissance à basses températures

Le froid affecte la qualité des échanges (transport des nutriments et déchets) avec le milieu ambiant. En effet, la congélation de l'eau et la rigidité des membranes biologiques (givrage cellulaire) induisent une diminution de leur fluidité, ainsi que le clivage et la dénaturation des protéines. Ces conditions s'opposent à la croissance et l'ampleur de cette dépendance à la température apparaît clairement (D'Amico *et al*., 2006).

I.2.2.2. Réponse au stress froid

Pour surmonter les effets négatifs des basses températures telles que le ralentissement ou l'arrêt de la croissance**.** En effet, tous les composants de la cellule, des membranes et des systèmes de transport des corps dissouts intracellulaires doivent être adaptés. De même, des processus cellulaires fondamentaux du métabolisme, la réplication, la transcription et la traduction doivent également être accommodés pour résister au froid (Cavicchioli, 2002; D'Amico et al., 2006).

Ceci dit, tout porte à croire que ces organismes ont développé de remarquables stratégies d'adaptation avec des réactions leur permettant de compenser le déficit énergétique ainsi survivre dans des conditions thermodynamiquement favorables (Georlette *et al*., 2004) .

I.2.2.2.1.Adaptation des membranes cellulaires

Ces mécanismes d'adaptation demeurent mal définis, mais une conclusion générale fut tirée : face aux basses températures et au « stress froid », qui dépend de la température de l'environnement, toutes les structures membranaires doivent avoir une flexibilité et fluidité suffisante pour assurer des fonctions multiples (Scherer *et* Neuhaus, 2006). Ce maintien d'activité est acquit par différentes stratégies: augmenter la proportion d'acides gras insaturés (AGI) dans la membrane, changer la conformation de trans à cis, favoriser les doubles liaisons en position cis ainsi que la ramification des chaines (methyl-branching) ou raccourcir la longueur des chaines lipidiques (Phadtare, 2004). Ces changements aboutissent à un compromis moléculaire entre la flexibilité indispensable à son activité et la nécessité de son

architecture par un réseau d'interactions assez ferme (Phadtare, 2004). La quantité et la composition lipidique membranaire étant modifiée, la fluidité membranaire optimale et l'état physique idéal des lipides membranaires sont assurés (Bayles *et* Wilkinson, 2000). A cet effet, Kiran *et al.* (2004) et Kiran *et al*. (2005), ont mis en évidence une augmentation du nombre d'AG trans chez psychrotrophe *P. syringae* quand la température passe de 5°C à 28°C.

I.2.2.2.2. Adaptation des enzymes

Les enzymes psychrophiles sont caractérisées par une forte flexibilité, permettant un meilleur accès au site actif (D'Amico *et al.*, 2006). La souplesse structurelle qui caractérise les bactéries psychrophiles leur permet de réaliser les changements de conformation à la catalyse avec des quantités d'enzymes moins importantes, et il existerait des enzymes totalement indépendantes de leur vitesse de réaction par rapport à la température, appelées « enzymes parfaitement évoluées » (Feller *et* Gerday, 2003). La diminution de la rigidité enzymatique entraine une thermolabilité plus prononcée (10 fois plus) que chez leurs homologues mésophiles (Georlette et al., 2004).

I.2.2.2.3.Synthèse protéique

Lors du passage des températures modérées au froid, il y'a arrêt total ou partiel de la synthèse des protéines de ménage au profit de la synthèse des protéines impliquées dans l'adaptation par deux types de protéines à savoir les cold protéin sock (CPS) ou qui agissent en réponse rapide après la chute de la température et les cold acclimations proteins (CAP) synthétisées progressivement (Phadtare, 2004).

I.3. Le stress oxydatif et les antioxydants

Les réactions d'oxydation interviennent aussi bien dans l'organisme ainsi que dans les nutriments. Elles ont pour origine, des molécules à nombre impair d'électrons sur la couche orbitale externe (Vernay *et al*., 2007). La réaction en chaine d'oxydation se déroule par l'arrachement d'un atome d'hydrogène pour leur stabilité, et cela en dépend de l'énergie, favorisée par le chauffage (Lapointe-Vignola, 2002), la lumière, les radiations ionisantes, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Croguennec et al., 2008). Dans un système naturel, il existe un équilibre entre les oxydants et les antioxydants, qui peut être rompu par la présence des ROS, mais peut être rétablit par un apport externe (Seifried *et al*., 2007).

I.3.1. Les antioxydants

Des études récentes ont révélé que l'alimentation à base de produits élaborés à partir d'ingrédients naturels, riches en antioxydants est plus sûrs et saine (Pincemail et al., 2007). Cela justifie l'intérêt pour l'identification de nouvelles substances naturelles d'origine végétale utilisables comme ingrédients alimentaires. L'activité inhibitrice des extraits d'herbes est

attribuée fondamentalement à leur richesse en flavonoïdes et autres polyphénols (Shahidi *et al*., 1992; Djenane *et al*., 2006).

I.3.2. Les plantes et leurs métabolites secondaires

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Sofowora, 2010). Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Mamhloufi, 2013). Ayant comme effet nombreuses perspectives, les plantes aromatiques et médicinales suggèrent la présence des consistants ; antioxydantes et antimicrobiennes dans toute partie de la plante (Pan *et al*., 2008).

Par conséquent, le développement et l'isolement des antioxydants et antimicrobiens naturels depuis les plantes sont devenues le centre de la recherche des nutritionnistes.

Une des originalités majeures des végétaux réside dans la capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites secondaires dont les importantes fonctions physiologiques font d'eux des molécules utilisables par l'Homme dans de domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix *et al.,* 2005). Les principaux métabolites secondaires sont les polyphénols, les huiles essentielles (HEs) et les alcaloïdes.

I.3.2.1. Les polyphénols

- **Structure et classification**

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, constituent un groupe d'une extrême diversité. Ils peuvent être regroupés en nombreuses classes (Tableau I) ayant comme point de différence la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation) et les différentes liaisons possibles de ces molécules avec les métabolites primaires à savoir les glucides, lipides, protéines et autres métabolites secondaires phénoliques ou non phénoliques (Naczk *et al*., 2006).

Ils se retrouvent au niveau des différents tissus superficiels des végétaux et se subdivisent en plusieurs sous-classes. Le tableau I regroupe les différentes classes de polyphénols (Harborne,2013).

Tableau I: Les différentes classes des polyphénols (Mbaiogaou *et al*., 2013).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C_6	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques	*p*-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques,	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Phenylpropenes	Myristicin, eugénol	
	Coumarines	Scopolétine	
	Isocoumarines	Myristicine, eugénol	
	Chromones	Eugenine	
C_6-C_4	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C_6-C_1-C_6	Xanthones	Mangiferine	
C_6-C_2-C_6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones	Anthraquinones	
C_6-C_3-C_6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Neolignanes	Eusiderine	
$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoides	Amentoflavone	
$(C_6$-$C_3)_n$	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
$(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Tanins condensés		

- **La variabilité de la teneur en polyphénols des plantes**

Bien que plusieurs classes de molécules phénoliques, comme la quercétine (flavonol), soient présentes dans la plupart des aliments végétaux (thé, vin, céréales, légumineuses, fruits, jus de fruits, etc.), d'autres classes ne se trouvent que dans un type particulier de nourriture (Mbaiogaou *et al*., 2013).

La composition en polyphénols peut également être influencée par d'autres paramètres tels que les facteurs environnementaux, le degré de maturité au moment de la récolte, du ménage ou la transformation industrielle, le stockage, et la variété de la plante (Cadot *et al*., 2008; Rossi *et al*., 2009).

I.3.2.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes sécrétées par les plantes aromatiques et extraites par divers procédés dont l'hydrodistillation (Ayadi *et al.,* 2011). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme un sous-produit du métabolisme secondaire (Benayad, 2008), on les retrouvant dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante: les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines (Baser *et* Buchbauer, 2015).

Les HEs ont été utilisées autrefois autant que composé d'aromatisation, de formulation de produits de soins personnels et la conservation alimentaire (Amarti *et al*., 2008). De plus, des études ont montré que les constituants des HEs présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et dans les domaines industriel et médical (Amarti *et al*., 2008).

I.3.2.3. Les propriétés biologiques des polyphénols et des huiles essentielles

I.3.2.3.1. Activité antioxydante

L'activité des composés phytochimiques attire l' attention du fait de leur rôle potentiel dans la prévention des maladies humaines (Pan *et al*., 2008).

I.3.2.3.2. Activité antibactérienne

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers l'exploitation de nouvelles voies ayant pour objectif la synthèse de nouveaux médicaments à base des plantes (Djenane *et al*., 2006).

- **Mécanisme d'action sur les bactéries**

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) par les composés oxydés, probablement par les interactions non spécifiques avec les protéines (Mason, 1987), ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

L'hydrophobicité des polyphénols tel que les flavonols est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'intercaler dans les phospholipides membranaires et exercer leur effet antibactérien à l'intérieur de la cellule (Jamshidian, 2011).

- **Facteurs influençant l'activité antibactérienne :**

  - **Facteurs liés aux polyphénols**

L'activité antibactérienne des polyphénols semble être directement liée à leur structure chimique (son hétérogénéité) et leur poids moléculaire (Athamena et al., 2010; Field and Lettinga, 1992)**.** La toxicité microbienne des composés phénoliques est relative à la position et proportionnelle au nombre de groupements hydroxyles du cycle phénolique (Cowan, 1999). La solubilité des polyphénols influence l'efficacité de l'activité antimicrobienne. A ce sujet, il a été rapporté que la lipophilie jouerait un rôle très important ainsi, les molécules hydrophobes interagissent avec les lipopolysaccharides et les lipides, tandis que les composés hydrophiles dépendent des porines qui leur sont indépendantes pour traverser la membrane (Bolou *et al.*, 2011).

  - **Facteurs liés aux bactéries**

La structure de la paroi des micro-organismes intervient dans la résistance naturelle, ainsi, l'activité antibactérienne varie selon le genre bactérien en question. En principe, les polyphénols sont plus actifs sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram- . Ces dernières limitent la diffusion des composés hydrophobes par la membrane externe riche en polysaccharides (Ayadi *et al.*, 2011).

I.3.3. Notions sur les plantes étudiées

I.3.3.1. *Sirpus holoschoenus*

Sirpus holoschoenus (S.holoschoenus) est une plante de la famille des Cyperaceae (tableau II) et abondamment retrouvée au nord-africain (Schuster *et* Tutulescu, 2011). Cette plante pousse spontanément sur des sols sableux, humides ; on la retrouve sur des rivages, des dunes maritime et le littoral (Antoanela Popescua *et al*., 2011).

C'est une plante vivace avec des feuilles persistantes et un solide rhizome disposé sous forme de rai, ayant des tiges fasciculées dont la longueur varie de 50 cm à 1 m, arrondies.

- **Les vertus médicinales**

En médecine traditionnelle, les russes utilisaient les décoctions et le thé du rhizome de *S. holoschoenus.* Il a été démontré que les extraits phénoliques ont une activité importante sur la leucémie lymphoïde (Abdel-Mogib *et al*., 2001).

I.3.3.2. *Thymus fontaneseii*

Thymus fontanesii (*T.fontanesii*) est une plante aromatique, répandue en Algérie et très utilisée par les populations locales pour ses vertus médicinale. le thym est l'un des plus importants genres en ce qui concerne le nombre d'espèces au sein de la famille des Lamiacées (Alireza Ghannadia *et al*., 2004). Le thymol représente le composant majoritaire de *T. fontanesii*, suiviede terpinene,de *p*-cymène et de carvacrol (Alireza Ghannadia *et al*., 2004)

- **Les vertus médicinales**

Dans la médecine traditionnelle et populaire algérienne, T. *fontanesii* est utilisé comme antispasmodique, carminative, stomachique, expectorant, antitussif, antiseptique et remède, anthelminthique dans certains gastro-intestinal (Alireza Ghannadia *et al*., 2004).

Tableau II : classification de *Scirpus holoschoenus* et de *Thymus fontanesii* (USDA).

	Scirpus holoschoenus	*Thymus fontanesii*	Photographie
Régne	Végétal.	Végétal.	*S. holoschoenus*
Embrachement	Spermaphytes.	Spermaphytes	
Sous-embranchement	Angiospermes.	Maliophytes	
Classe	Monocotylédones.	Magnoliopsida	
Sous-classe	Commelinidae**.**	Asterdae	
Ordre	Cyperal.	Lamiales	
Famille	Cyperaceae**.**	Lamiales/labiatae	
Genre	*Sirpus*	*Tymus*	
Espèce	*holoschoenus L.*	*Tymus fontanesii*	*T. fontanesii*

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia.

II.1. Matériel biologique

- **Matériel végétal**:

- Rhizome de *S. holoschoenus* a été récolté en mars, 2016 dans la région d'Igueradloune (Ouacifs) à Tizi Ouzou. Après nettoyage à l'eau distillée, les racines de *S.holoschoenus* sont séchées à l'étuve 40°C jusqu'à stabilité du poids puis broyée et tamisée. La poudre ayant un diamètre inférieur à 125µm, est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité.

- Feuilles de *T. fontanesii* ont été récoltées en mois de mai 2015 à Tiaret, et ont subi un séchage à l'ombre pour faciliter leur stockage.

- **La souche bactérienne**

La souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est sélectionnée pour son caractère psychrotrophe. Elle est entretenue par repiquages successifs sur gélose nutritive à 37 °C.

II.2. Matrice d'application (fromage frais)

Afin de valider l'effet antimicrobien de nos extraits, nous avons utilisé, comme matrice alimentaire, le fromage frais local de marque Safilait, en pot de 140g, acheté dans une supérette du centre-ville de Bejaia.

Le choix du produit comme model alimentaire se justifie par le fait qu'il ne soit pas affiné, ce qui implique une courte durée de conservation.

II.3. Méthodes d'analyses

II.3.1. Extraction des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont extraits en utilisant la technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes «MEA », à l'aide d'un four micro-ondes (ME8123ST, Samsung, Malaysia, UPC) modifié niveau du laboratoire L3BS (figure 2).

Les micro-ondes sont un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde allant de 0,001 à 1 m, ce qui peut être transmis en tant que vague générée par un magnéton de très

haute fréquence. Lors du passage des micro-ondes à travers le milieu, l'énergie peut être absorbée et convertie en énergie thermique (Spigno, 2009).

En général, le chauffage par énergie micro-ondes est basée sur deux principes, la conduction ionique et la rotation dipolaire (Sinquin *et al*., 1993). La première se réfère à la migration électrophorétique des porteurs de charge (par exemple, ions et électrons) sous l'influence du champ électrique produit par micro-ondes. La "friction" qui en résulte entre les ions est capable de provoquer un chauffage. La deuxième se produit lorsque les molécules dipolaires tentent de suivre le champ électrique dans le même alignement. L'oscillation induite conduit à des collisions entre dipôles et molécules environnantes, et crée ainsi de la chaleur (Mallakpour *et* Rafiee, 2009).

Figure 2 : Le dispositif de l'extraction par MAE (photo du labpratoire BBBS).

II.3.1.1. Procédure d'extraction

La nature du solvant, le ratio poudre/solvant, le temps d'extraction, la puissance de micro-ondes, la température, le prétraitement, le nombre de cycle d'extraction (Chan *et al*., 2011; Mandal *et* Mandal, 2010; Zhang *et al.*, 2011) et la dimension des particules (Spigno and De Faveri, 2009) sont des paramètres influençant le rendement et la qualité des substances extraites par EAM, d'où l'intérêt de l'étude préliminaire ci-dessous :

1g de la poudre est dissout dans 20 mL de solvant (variation du type et de la concentration) et soumis aux irradiations micro-ondes pendant un temps déterminé. L'extrait brut est filtré à l'aide de papier filtre (0.45µm), puis ajusté au volume initial et conservé à 4°C (Mandal *et* Mandal, 2010;Chan *et al.*, 2011) .

II.3.1.2. Etude préliminaire

Une étude préliminaire a été effectuée dans le but de sélectionner les conditions optimales d'extraction des composées phénoliques. La méthodologie consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un. L'effet de chaque paramètre est évalué en déterminant la teneur en polyphénols totaux (tableau III). 1 g de la poudre est préparer dans 20 mL de solvant, le mélange à été soumis à l'extraction sous micro-ondes selon les conditions représentées dans le tableau III. Les résultats obtenus sont utilisés dans le but d'optimiser les conditions d'extraction.

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques du rhizome de *S. holoschoenus*.

Type de solvant	Concentration du solvant % (v/v)	Temps d'irradiation (s)	Puissance d'irradiation (w)
Acétone	*0*	30	300
Méthanol	*30*	60	400
Ethanol	*50*	90	500
	70	120	600
	90	150	700
		180	800
			900

II.3.1.3. Application de Box-Bohenken Disiner

Pour l'optimisation de la procédure de EAM, la démarche expérimentale s'est faite deux partie : tout d'abord, les facteurs d'expériences individuels ont été déterminés c'est-à-dire la gamme des conditions d'extraction (au moment où les variables ne sont pas fixées, sont

devenues constantes). Ensuite, l'enquête de la performance du EAM a été obtenue par la méthodologie de surface de réponse (MSR), en utilisant le logiciel JMP pour l'analyse des données et la construction du model, qui est un ensemble spécifique d'expériences définies par une matrice composée des différents niveaux de combinaisons des variables étudiées (Bezerra et al., 2008) selon les limites représentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Les limites des variables indépendantes utilisées pour la construction d'un model

Variables indépendantes	Code		
X1 : acétone (%)	-1 (0)	0 (45)	+1 (90)
X2 : temps d'irradiation (s)	-1 (30)	0 (90)	+1 (150)
X3 : intensité d'irradiation (w)	-1 (300)	0 (600)	+1 (900)

II.3.1.4. Fractionnement de l'extrait brut

L'acétone de l'extrait optimisé est évaporé et l'extrait aqueux a subi un fractionnement d'abord par l'éther de pétrole (1:3, v/v) et une extraction à l'acétate d'éthyle (1:3, v/v) est ensuite réalisée sur le résidu. L'opération est répétée jusqu'à épuisement pour les deux lavages. Un deuxième extrait brut (EB) sans fraction a été aussi préparé.

L'EB, les fractions éthyle acétate (EA), éther de pétrole (EP) et aqueuse (FA) sont soumises à l'évaporation à l'étuve ventilée (45°C). Les résidus secs des différentes phases récupérées sont reconstituées dans du DMSO ou dans de l'eau distillée à raison de 100 mg/ml et conservée à 4 °C pour des utilisations ultérieures.

II.3.2. Extraction des huiles essentielles de *T. fontaneseii*

Le chauffage permet, dans une première étape, de former de la vapeur d'eau qui détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique (Mohammadhosseini *et al*., 2013). L'hydrodistillat obtenu est décanté et l'huile est conservé 4 ˚C.

II.3.2.1.Procédure d'extraction

L'extraction des H.Es a été effectuée sur les échantillons par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Les distillations ont été réalisées par ébullition pendant 3h à partir de 100 g de matériel végétal séché avec 600 mL d'eau distillée (Akrout *et al*.2011).

Le taux d'extraction est calculé selon la formule : $R\% = (M-M_0/M_T)*100$

Avec :

R% : taux de la matrice ; M_T : masse végétale totale utilisée dans l'extraction ;

M : masse du bicher avec l'extrait ; M_0 : masse du bicher vide.

II.3.3. Dosages phytochimiques de l'extrait brut et de ses différentes fractions

II.3.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu des composés polyphénoliques totaux (CPT) a été déterminé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Georgé *et al*., 2005). Un volume de 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois par l'eau) est mélangé avec 100 µl de l'extrait. Après 5 mn, 1 mL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (7,5%) est ajoutée. Le mélange a été maintenu pendant 15 min au bain-marie à 50°C puis l'absorbance est mesurée à 760 nm. L'acide gallique est utilisé comme étalon et les concentrations en CTP sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique/g de la poudre (mg GAE g^{-1}).

II.3.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés comme suit : 1,5 mL de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (2%) ont été ajoutés à 1,5 mL d'extrait. Après 15 mn d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du mélange a été mesurée à 430 nm (Quettier-Deleu *et al.*, 2000). La quercétine est utilisée comme étalon et les concentrations en flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent quercétine/g de la pourdre (mg EQ/g).

II.3.3.3. Dosage des tanins

Les extraits ont été dilués de manière appropriée et mélangés avec 3 mL de solution de vanilline (4%) et 1,5 mL d'H_2SO_4. Après 15 mn, l'absorbance a été mesurée à 500 nm (Hagerman *et* Hagerman, 2002). Le contenu en tanins est exprimé en mg équivalent catéchine/g de la poudre.

II.3.4. Activité antioxydante (DPPH) de l'extrait brut et de ses différentes fractions

Le radical DPPH avec un électron impair donne un maximum d'absorption à 517 nm. Lorsque les antioxydants réagissent avec le DPPH$^{\bullet}$, qui est un radical stable, il devient apparié en présence d'un donneur d'hydrogène. Le radical en forme DPPH-H entraîne une décoloration (couleur jaune) (Inglett *et al*., 2011). Plus il y'a une décoloration, plus la capacité de réduction est importante (Prior *et al.*, 2005).

Le même volume de DPPH$^{\bullet}$ d'une concentration de 0,2 mmol/L de la solution DPPH méthanolique est mis en contact l'extrait brut ou l'une de ses différentes fractions (Prior *et al.*, 2005).

La capacité antioxydante a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (% l'inhibition du radical DPPH), calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = (Ac - Ae / Ac) \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

Ae : Absorbance de l'échantillon

II.3. 5.Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'HE *T. fontaneseii*, de la fraction AE de l'extrait brute de *S. holoscoenus*, l'acide lactique et de leurs combinaisons a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose et la méthode de dilution en série.

II.3.5.1. Méthode de diffusion

L'ensemencement de la gélose Muller Hinton a été fait par écouvillonnage à partir de la suspension 10^7 UFC/mL. Des disques stériles de 6 mm sont imprégnés de 20 µl d'extrait (Gülçin, 2004). L'extrait peut être de l'HE supplémentée de 10% de DMSO, de l'acide lactique dans le DMSO (1:8, v/v), de l'extrait brut de *S. holoschoenus* et de ses trois fractions (100 mg/mL). L'effet antimicrobien sur *P.areruginosa* ATCC 27853 est évalué par la mesure de la zone d'inhibition autour du disque (mm). Des antibiotiques sont utilisés comme témoins positifs, alors que le témoin négatif consiste en un disque imprégné de 20 µl de DMSO. Après 2 h d'incubation à 4 °C, les boites sont incubées à 37 °C pendant 18h. L'effet de différentes concentrations de l'H.E, de l'acide lactique et d'EA a été aussi évalué.

II.3.5.2. Effet des combinaisons d'AE, l'H.E et l'acide lactique

Dans le but d'avoir un meilleur effet, les trois échantillons testés individuellement ont été mélangés et les différentes combinaisons (incubées a 37°C/18h et 6°C/7jours) ont été testées selon le protocole préétabli.

II.3.5.3. Détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).

Une série de dilutions de moitié a été préparée pour la fraction EA (70mg/mL), l'H.E (12,5 %) et l'acide lactique (1:8v/v). Dans les puits d'une microplaque contenant chacun 100 µl de chaque dilution de l'échantillon sont ajoutés aux 95 µl de BHIB (Brain Heart Infusion Broth), 5 µl d'une jeune suspension bactérienne de 10^3 UFC/ml. Un témoin positif est réalisé en remplaçant l'échantillon (Bakayoko, 2008) par le milieu de culture Djenane *et al.,* (2010). Après incubation pendant 24 h à 37 °C, la CMI est correspond au premier ne présentant pas de croissance bactérienne

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration capable de détruire 99,99% de l'inoculum. Un ensemencement en strie par écouvillonnage de chaque concentration supérieure à la CMI est réalisé sur gélose nutritive. L'absence de développement (une diminution de 99% de la croissance par rapport au témoin) après 24 h indique l'effet bactéricide.

II.3.6. Effet inhibiteur du mélange H.E et fraction EA sur *P.aeruginosa* inoculé dans le fromage frais.

09 échantillons de fromage fraichement achetés sont préparés dans des bocaux stériles en verre, puis ont été inoculés avec une charge de 10^4 UFC/g de fromage.

Les différents échantillons sont répartis comme suit :

- 75g de fromage + 0,2% (v/m) du mélange HE /AE (1:3, v/v),
- 75 de fromage + 0,4% (v/m) du mélange HE /AE (1:3, v/v),
- Les échantillons témoins ont été traités avec de l'eau distillée stérile.

L'opération est répétée trois fois et les échantillons sont conservés à une température de réfrigération de 6 ±1°C, pendant 6 jours.

II. 3. 7. Analyse statistique

Tous les tests ont été réalisés en triple exemplaire, et les données signalées comme moyenne ± ecatype. Les différences étaient statistiquement évaluées par le test de Tukey avec un niveau de confiance de 95% avec le logiciel JMP.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultat et discussion

III.1. Extraction des composés phénoliques à partir du rhizome de *S. holoschoenus*

III.1.1. Etude préliminaire de sélection des conditions d'extraction appropriée

Dans cette étude, l'influence de l'intensité et le temps d'irradiation, le type du solvant extracteur ainsi que sa concentration a été étudiée, séparément, pour réunir les conditions optimales d'extraction l'obtention d'un meilleur rendement en CPT à partir du rhizome de *S. holoschoenus*. Les résultats de l'étude préliminaire sont présentés dans le tableau IV.

- **Paramètres influençant le taux d'extraction en CPT**

  - **Type de solvant**

L'acétone, le méthanol et l'éthanol sont les solvants les plus couramment utilisés dans l'extraction des composés phénoliques à partir de matrices végétales (Chung-Hung Chana, 2011; Inglett *et al.*, 2011; Spigno *et al.*, 2007). Les mélanges solvant/eau (50/50 v/v) sont testés individuellement sur notre matrice végétale.

Les résultats obtenus indiquent que l'hydroacétone permet d'extraire le rendement le plus élevé en CPT avec une valeur de 6,53±0,007 mg EAG/g de la poudre, en présentant une différence significative avec l'hydrométhanol (4,09±0.06 mg EAG/g) et l'hydroéthanol (3.63±0.09 mg EAG/g). La sélection de l'acétone comme meilleur solvant d'extraction par la méthode EAM a été confirmé dans d'autres études sur *Mentha spicata L*. (Chibane, 2012) et *Myrtus communis* (Carbonneau *et al*., 2014).

  - **Concentration du solvant**

L'eau est un solvant polaire qui absorbe l'énergie des micro-ondes avec une vitesse supérieure à laquelle le système peut dissiper la chaleur, c'est le phénomène de sur-chauffage où la dissipation de la chaleur en présence de molécules d'eau (Proestos and Komaitis, 2008), ainsi une dégradation des CPT peut être induite (Liazid *et al.*, 2007). En effet, les mélanges eau/acétone (50%, 70% et 90%) ont donné les meilleurs rendements sans différences significative. Une différence très significative est enregistrée entre ces trois solvants et l'acétone 98 % et 30%. Il a été rapporté que le rendement élevé en CPT est lié à la présence de l'eau qui présente un haut facteur de dissipation et une constante diélectrique élevée facilitant la distribution de la chaleur dans la matrice (Dairi *et al.*, 2015).

- **L'intensité d'irradiation**

L'effet des puissances 300,400, 500, 600, 700, 800 et 900 W sur le rendement en CPT est l'un des paramètres étudié. Le meilleur rendement a été obtenu pour la puissance 300 W, mais sans différence significative avec les puissances 400, 500, 600 et 700 W. En outre, une diminution significative de la teneur en CPT a été observée, en augmentant la puissance à 900 W allants de 10,19±0,05 mg EAG/g pour 300 W à 7,74±0,33 mg EAG/g pour 900 W. Ces résultats sont opposés aux données rapportées précédemment sur *Citrus* (Dahmoune *et al*., 2013) et *Myrtus* (Dairi *et al.*, 2015), montrant une augmentation proportionnelle du rendement à l'augmentation des puissances.

- **Temps d'irradiation**

Le temps d'irradiation est un autre principal paramètre dans la procédure d'extraction. Après fixation de la concentration du solvant (acétone 70%) et de la puissance à 600 w, la variation du temps de 30 à 90 s a montré une variation en CPT de 3,58±0,78 à 4,17±0,69 EAG/g, soit une augmentation de plus de 14%, et à une diminution de 44,12% 120 s par rapport à 90 s (3,12±0,36 mg EAG), puis ça réaugmente de 25,32 % à 150 s. L'allure des résultats obtenus est assez similaire avec celle des résultats de Dahmoune et al. (2013).

III.1.2. Optimisation de l'EAM dans le BBD

Les rendements en CPT obtenus dans les essais de BBD sont rapportés dans les surfaces de réponse (figure 3 et Tableau V). Les réponses mesurées ont été comparées à celles prédites pour l'estimation de la différence et de l'erreur expérimentale, afin de vérifier la validité du modèle. Négligeant les termes non significatifs (P> 0,05), en gardant seulement les facteurs et leurs interactions influentes dans le rendement en CPT, l'équation polynomiale suivante a été obtenue:

$$Y_{CPT} = 30,05 + 2,87\ X_2 - 5,62\ X_1^2 - 7,68\ X_2^2 + 2,92 X_2 X_3 - 7,72\ X_3^2$$

La valeur optimale en CPT est obtenue pour les conditions optimales de temps d'irradiation de 69 secondes, d'une concentration acétone/eau de 53% et d'une puissance d'irradiation de 600 W. Ces conditions sont assez similaires aux conditions optimales déduites ultérieurement (Dahmoune et al., 2013; Juntachote et al., 2006; Liyana-Pathirana and Shahidi, 2006). En effet, Il n'y a pas de différence significative entre la teneur en composés phénoliques prédite (30,42 ± 3,56 mg EAG/g de poudre), et celle obtenue par l'expérimentation (30,70 ± 1,22 mg EAG/g de poudre), ce qui confirme la validité du plan d'expérience utilisé.

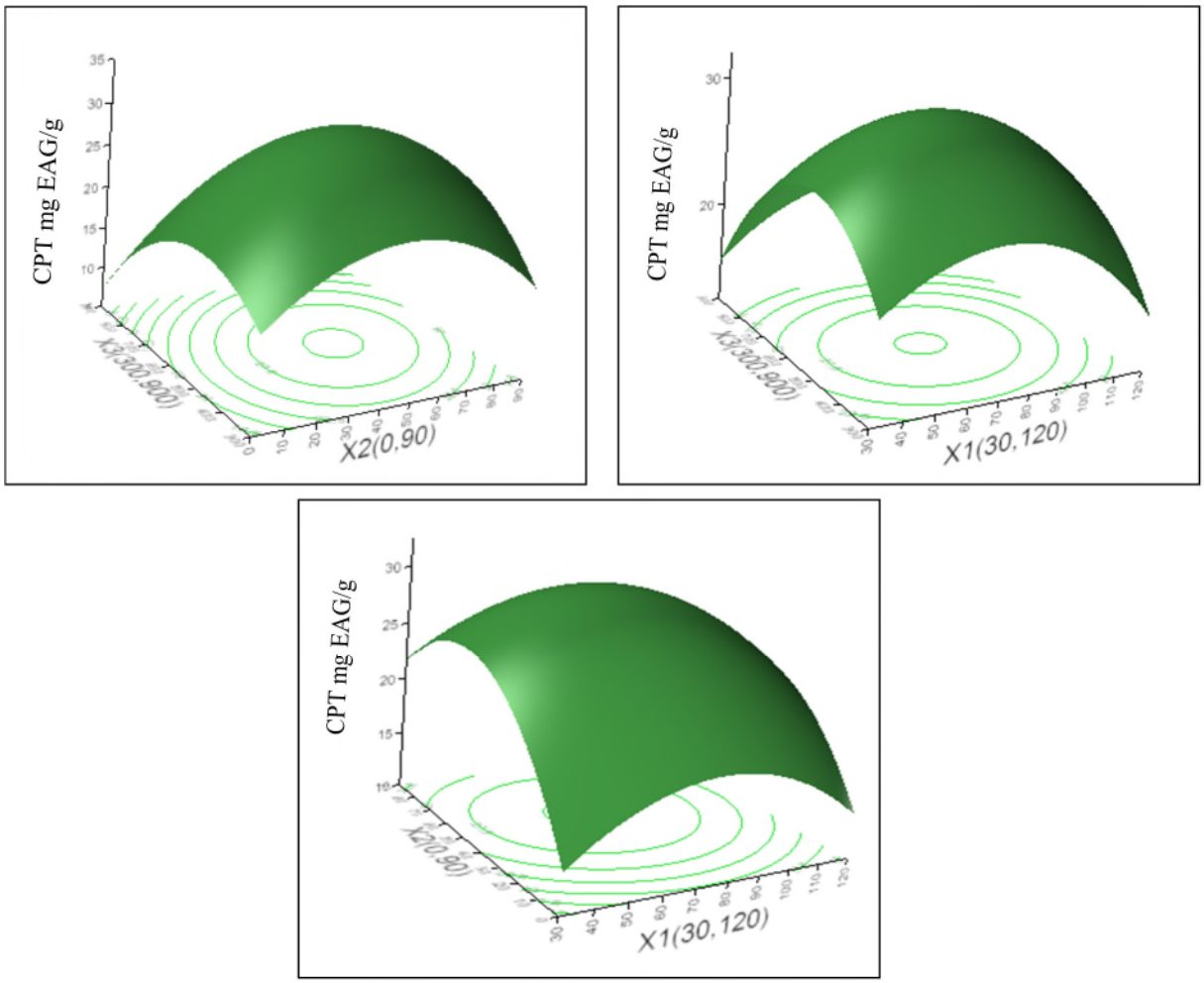


Figure 3: Surfaces de réponse des rendements en CPT (mg EAG/g) obtenus par EAM de combinaison de deux facteurs (X2X3, X3X1 et X2X1).

Le dosage des tannins, des flavonoïdes et l'activité antioxydante (DPPH) de l'extrait brut optimisé sont représentés dans le tableau V.

Tableau V: Les résultats en CTP des expériences à un seul facteur pour EAM, solvant, acétone (%), temps et l'intensité d'irradiation.

Solvant	**CTP (mg EAG/g)**	**Acétone (%)**	**CTP (mg EAG/g)**	**Temps d'irradiation (s)**	**CTP (mg EAG/g)**	**Intensité d'irradiation (W)**	**CTP (mg EAG/g)**
Ethanol	4,09±0,006[a]	0	4,77±0,001[c]	30	3,58±0,078	300	10,19±0,005[a]
Méthanol	3,63±0,009[b]	30	8,7±0,002[b]	60	4,09±0,067	400	10,1±0,027[a]
Acétone	6,53±0,007[c]	50	10,08±0,003[a]	90	4,17±0,069	500	9,68±0,061[ab]
		70	10,31±0[a]	120	2,33±0,068	600	9,82±0,072[a]
		90	10,19±0,005[a]	150	3,12±0,036	700	8,72±0,057[abc]
						800	7,35±0,061[c]
						900	7,74±0,033[bc]

CTP : composés phénoliques totaux *;* EAG : équivalent acide gallique ; a, b et c : des niveaux de différences significatives

Tableau VI : Conditions optimales et résultats des dosages colorimétrique de l'EMA par RSM.

Conditions optimale de MAE			Dosage colorimétrique				
Solvant (%)	Intensité (W)	Temps (s)	TPC mg EAG/G		Tannins	Flavonoïdes	DPPH (%)
			Expérimentale	Prédite			
53	600	69	30,70±1,22	30,42±3,56	0,17±0,01	0,29±0,01	18,05±1,74

Le Coefficient de détermination (R^2) d'après Goupy *et* Creighton,(2006) est un indicateur déterminant la qualité du model, il démontre si la valeur prédite et la valeur expérimentale sont proches. Dans ce cadre, le R^2 obtenu pour la comparaison des valeurs expérimentales et prédites est de 0,95, en appuyant la validité du modèle (figure 4).

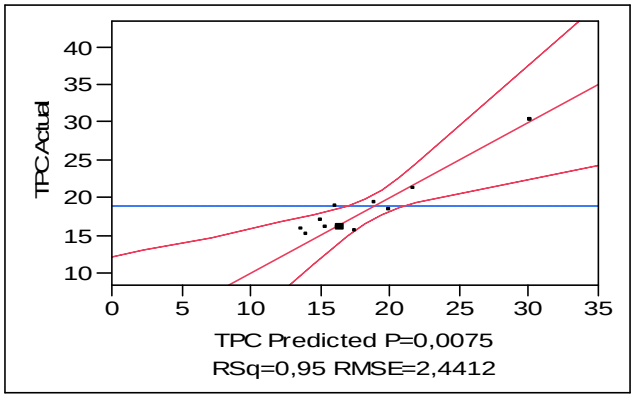


Figure 4 : Intervalle de confiance observé par rapport aux valeurs prédites du BBD.

Les résultats suggèrent que le modèle pourrait bien fonctionner pour la prévision d'extraction des CPT par micro-ondes à partir de la partie souterraine de *S. holoschoenus*.

D'après les résultats du tableau V, le p-value du facteur X_2 est le plus faible (0,02), ce qui signifie que le facteur qui possède le grand impact sur l'extraction des CPT est la concentration du solvant, ce résultat est obtenu par d'autres études (Dahmoune *et al*., 2013; Dairi *et al.*, 2015). En outre, On peut constater que le temps d'irradiation (X_1) n'a pas d'influence sur le rendement d'extraction, mais possède une interaction significative avec de le solvant (X_2), la puissance d'interaction et le rapport solvant-eau, tout comme les termes quadratiques pour le solvant, le temps et l'intensité d'irradiation,

Des surfaces de réponse pour toutes les interactions possibles (Figure 3), où un maximum de rendement en CPT peut être obtenu à des valeurs optimales comme la combinaison de deux variables, avec la troisième maintenue constantes à zéro, par conséquent, le modèle expérimental quadratique possède un rendement de CPT prédit étant la valeur maximale en un points stationnaire (Pan *et al,*, 2012), Confirmant les résultats des essais préliminaires, le rendement en CPT a atteint un niveau maximal quand le temps d'irradiation, la concentration d'acétone et de la puissance d'extraction ont été mis au niveau moyen (0 valeurs codées), on constate que la récupération du contenu phénolique des racines de *S.holoschoenus* connait un déclin au-delà des conditions optimales d'extractions, soit un rendement de 25 mg EAG/g de la poudre en passant de 600 à 700 W, cet effet est observé avec les

autres paramètres. Ces résultats sont comparables à ceux de Song *et al.*, (2011); Sutivisedsak *et al.*, 2010). Les effets de MAE sont représentés dans le diagramme de Pareto représenté dans la figure 6.

Tableau VII : Estimation des paramètres

Terme	Estimation	STD Erreur	T Ratio	Prob > ItI
Intersept	*30,05*	1,4	21,32	< 0,001
X_1(30 ,120)	-0,98	0,86	-1,14	0,3
X_2(0,90)	2,87	0,86	3,33	0,02
X_3(300,900)	-1,52	0,86	-1,77	0,13
X_1*X_1	-5,62	1,27	-4,43	0,006
X_1*X_2	-1,15	1,22	-0,94	0,38
X_2X_2	-7,68	1,27	-6,05	0,001
X_1*X_3	0,77	1,22	0,63	0,55
X_2*X_3	2,92	1,22	2,4	0,06
X_3*X_3	-7,72	1,27	-6,08	0,001

La figure 5 montre le profil de prédiction des rendements en CPT de l'extrait des racines de *S, holoschoenus,* en montrant les conditions optimales pour l'obtention du rendement optimale.

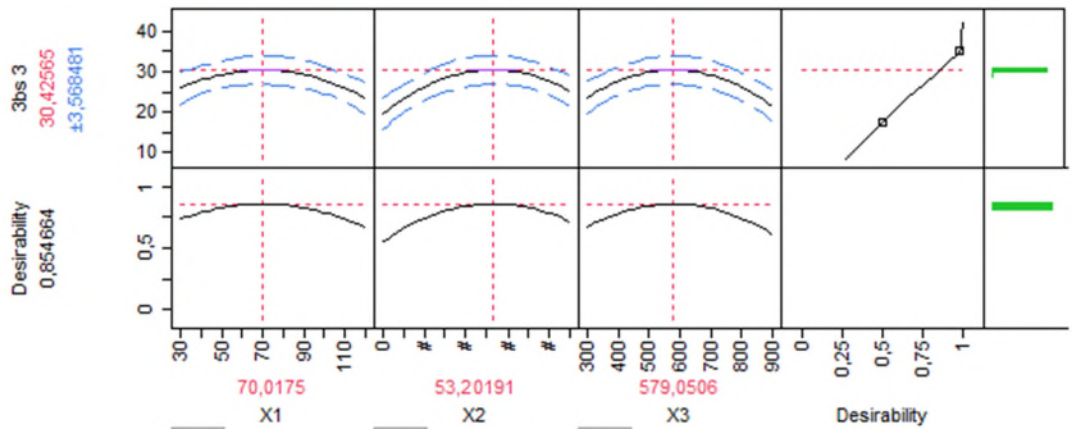


Figure 5 : profile de prédiction des rendements en CPT de l'extrait des racines de *S, holoschoenus.*

III.1.3. Rendement d'extraction des H.Es, taux d'extraction, dosage phytochimique et activité antioxydante des différentes fractions

Le taux d'extraction des H.Es de *T. fontaneseii* est de 4,9 ± 0,13% et nettement supérieur à celui (1,9%) obtenu par Alireza Ghannadia *et al.* (2004).

Les fractions EA, FA et EP de *S. holoschoenus* présentent des taux d'extraction de 7,59±0,26, 3,59 ± 0,38 et 1,47± 0,46 %, respectivement. (Oussaid ., 2011) a obtenu des taux d'extraction de 4,8 et 0,8 % respectivement pour les fractions EA et PE, avec la méthode conventionnelle. Les valeurs des CPT, des flavonoïdes et les pourcentages d'inhibition du radical DPPH des fractions de *S. holoschoenus* sont regroupés dans le tableau VII.

Tableau VIII : Taux d'extraction, dosage photochimique et activité antioxydante des extraits

	Taux d'extraction (%)	CPT (mg EAG/g)	Flavanoides (mg EQ/g)	DPPH (%)
H.S de *T. fontaneseii*	4,9±0,13	/	/	/
S. holoschoenus				
fraction aqueuse (FA)	3,59 ± 0,38[a]	150,03±0,23[a]	0,860 ±0,01[a]	85,7±1,09[a]
fraction d'éthyle acétate (AE)	7,59±0,26[b]	90,09 ±1,19[b]	0,230±0,003[b]	77,42±1,89[b]
fraction d'éther de pétrole (EP)	1,47± 0,46[c]	9,58 ±1,41[c]	0,189±0,007[c]	4,56±0,68[c]

III.2. Activité antibactérienne

III.2.1. Activité individuelle sur gélose

L'effet des extraits végétaux comme agents antimicrobiens est largement documenté. Il a été démontré que la production des acides phénoliques augmente lors du stress ou d'infection des végétaux (Petti *et* Scully, 2009). En outre, de nombreuses études ont montré que les H.Es, possédant la plus grande activité antibactérienne contre les agents pathogènes d'origine alimentaire, contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques tels que le carvanol, eugénol et thymol (Burt *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2008).

Le DMSO ne montre aucune zone d'inhibition, ainsi, l'effet antibactérien additionnel éventuel du DMSO se trouvant dans les échantillons n'est pas considéré. Des zones de diamètre de 24 ± 0,55, 30 ± 1 et 42 ± 1,88 mm ont été obtenues avec les disques de K_{30}, O_{30} et I_{10}, respectivement, confirmant la sensibilité de *P. aeruginosa* ATCC 27853 à ces

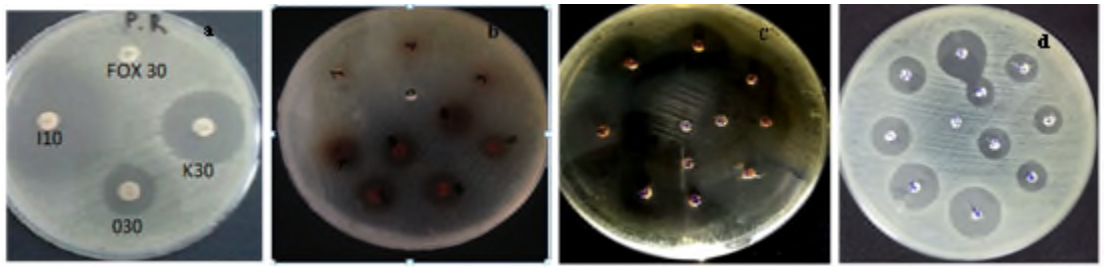


Figure 06 : Photographie des zones d'inhibition obtenue sur *P. areruginosa*
a : ATB ; b : fraction acétate d'éthyle ; c : H.E de *T. fontanesii* ; d : acide lactique

Tableau IX : Effet antibactérien de la fraction EA, l'H.E de *T. fontanesii* et de l'acide lactique à différentes concentrations sur *P.aeruginosa*

d'inhibition (mm)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)									
Concentration	**100**	**90**	**80**	**70**	**60**	**50**	**40**	**30**	**20**	**10**
fraction EA	**15,66±0,5**	**15,5±0,5**	**15±00**	**15,5±1**	**10,66±0,57**	**10,16±0,28**	**7±1**	**6±0**	**6±0**	**6±0**
Concentration	**100**	**50**	**25**	**12,5**	**10**	**8,33**	**7,14**	**6,25**	**5,55**	**5**
H.E *T.fontaneseii*	**40±1**	**38,5±2 ,59**	**29,66±0,57**	**26,33±0,5**	**24,33±0,5**	**21,66±0,5**	**18,66±1**	**21,33±2**	**16,33±1,6**	**17±1**
Concentration	**50**	**45**	**40**	**35**	**30**	**25**	**20**	**15**	**10**	**5**
Acide lactique	**29,5±0,7**	**25,5± 1,5**	**21,5±2,12**	**21±00**	**21±1,73**	**16±2**	**16± 1,73**	**16 ±2,64**	**15,17±1,75**	**13,33±1,52**

Diamètre des disques (6mm) est inclus

Tableau X : Resultats des CMIs et CMBs

Microorganism	H.E	EA	Acide lactique	H.E/EA	H.E	EA	Acide lactique	H.E/EA
	MIC (%)				MBC (mg/ml)			
P.aeruginosa	0.86	4,37	6,25	0,048	1,718	25	50	0,39

antibiotiques utilisés comme contrôle positif (figure 06). A savoir que les tests ont été effectués dans des boites de Pétri de 14 cm de diamètre.

Les résultats d'activité antibactérienne de l'EB et ses fractions, l'E.H, et l'acide lactique à différentes concentrations sont illustrés dans le tableau VIII et la figure 05.

L'EB, fractions EP et FA à des concentrations de 100 mg/mL ne manifestent aucune activité inhibitrice, alors que la fraction EA, pour la même concentration, montre une activité relativement importante (15,66±0,5mm). Plusieurs concentrations de la fraction EA, allant de 100 à 10 mg/ml ont été testées. Les zones ont tendance à se restreindre à fur et à mesure que la concentration de l'extrait diminue. Toutefois, aucune différence significative n'a été enregistrée entre une concentration de 70 et 100 mg/mL.

Très peu de travaux ont été publiés sur le pouvoir antibactérien de plantes appartenant au genre *Scirpus*, aucun n'a visé *S. holoschoenus*. Toutefois, il a été rapporté que le resvératrol, les stilbénes et (Locatelli1 *et al*, 2000; Maddox *et al*., 2010), présents en quantité abondante chez *S. holoschoenus* sont dotés d'une considérable activité antibactérienne.

Comme cela a été rapporté dans la littérature, la tolérance des bactéries aux polyphénols dépend essentiellement de l'espèce bactérienne et de la structure des polyphénols (Almajano *et al*., 2008). Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens. La réduction de la perméabilité de la membrane externe, entourant la paroi cellulaire, aux agents antibactériens hydrophobes par la structure lipopolysaccharidique peut favoriser la résistance à ces agents). L'activité antibactérienne est associée, aussi, au site et au nombre des groupements hydroxyles sur le cycle phénol (Kuete *et al*., 2007).

L'H.E exerce une forte activité sur *P. aeruginosa* (40±1 mm). Le diamètre de la zone d'inhibition varie proportionnellement avec la concentration des H.Es, des zones moyennes ont été obtenues avec la concentration de 12,5% (26,33±0,5 mm).

Les travaux de Noudjoub (2010) sur la même plante et souche ont donné des valeurs des zones d'inhibition de Ruberto *et al*. (2000) ont mis en évidence l'efficacité antibactérienne du carvacrol et thymol qui sont des constituants majoritaires des plantes de *T. fontaneseii*.

Les acides organiques tels que l'acide lactique possèdent de forte activité antibactérienne (Dimitrijević *et al*., 2007). Nos tests ont révélé des zones d'inhibition de diamètre allant de 13,33±1,52 à 29,5±0,7 mm ont été enregistrée pour les concentrant allant de 5 à 50% de l'acide lactique.

III. 2. 2. Effet combiné des différents agents antibactérien

Afin de déterminer une éventuelle interaction entre les échantillons étudiés précédemment, nous avions effectué des tests d'activité antibactérienne différentes combinaisons en utilisant le plan d'expérience, à 6°C et 37 °C. Les résultats sont représentés dans les contours de réponse (figure 07).

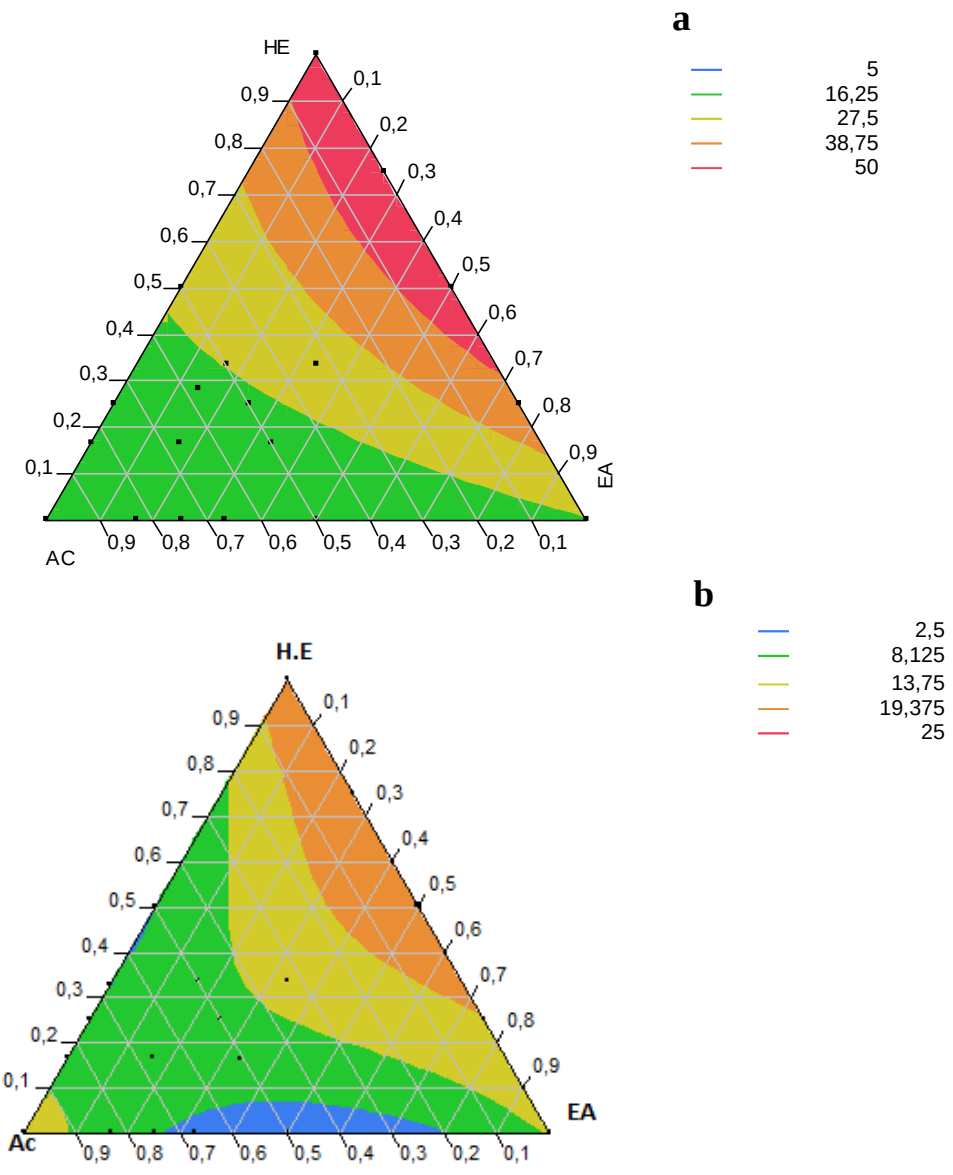


Figure 07 : Contour de surface pour les combinaisons des extraits, (a) : à 6 °C; b : à 37°C.

Le contour de la surface de réponse obtenu avec le JMP V7 indique que les zones d'inhibition vis-à-vis de *P. aeruginosa* ont tendance à s'élargir à fur et à mesure que la quantité

l'HE augmente. La meilleure réponse est obtenue avec le mélange de 75,79 % d'HE et 24,21 (51,11 ± 9,7mm) à 6°C, et de 82,33 % d'HE et 17,66 % EA (23,6 ± 5,4mm) à 37°C.

La meilleure réponse obtenue expérimentalement est de 27 ± 4,62mm à 37°C et de à 65 ± 5 mm à 6°C (figure 08).

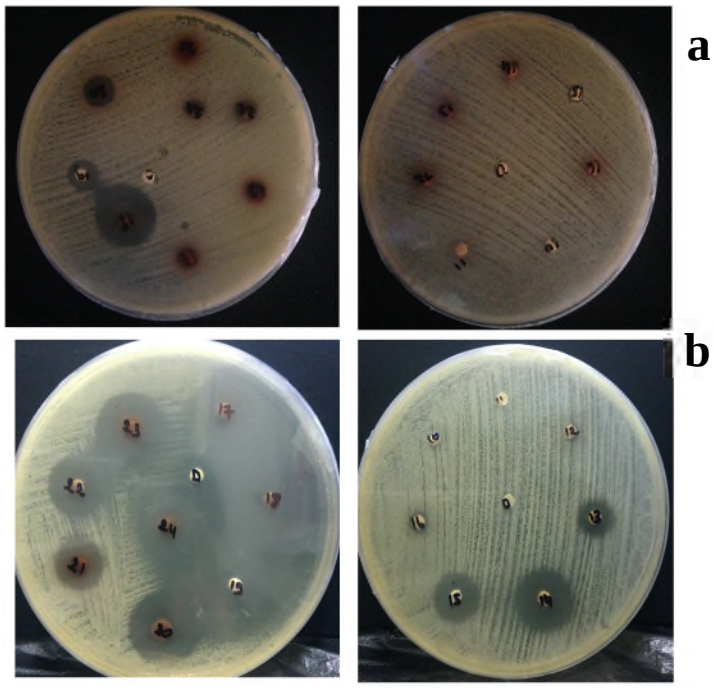


Figure 08 : Photographie des diamètres des zones d'inhibition obtenue avec les différents mélanges à 37°C (a) et à 6°C (b). Le diamètre des boites de Pétri est de 14 cm.

III. 2.3. Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB)

Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité de la souche aux différents extraits testés (tableau IX). La plus faible CMI (0,048%), qui traduit une meilleure activité est enregistrée avec la combinaison HE/EA (3 :1,v/v). Plus les CMI sont faibles plus l'activité antibactérienne des extraits est meilleure. Nos résultats concordent avec ceux de certains autres travaux raportès**.** En effet, (Bekhechi *et al*., 2008) attestent que les valeurs des CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition révélées avec la méthode des disques. De même, le mélange a donné la plus faible CMB (0,39%).

III.3. Effet inhibiteur du mélange sur *P. aeruginosa* inoculée dans le fromage frais

Afin de valider l'effet antimicrobien du mélange optimisé, nous avons utilisé comme matrice alimentaire, le fromage frais local, Safilait.

Un dénombrement sur cétrimide est effectué chaque 24h pendant 6jours de stockage à 6 ° 1 ± °C.

La figure 09 montre que le nombre de *P. aeruginosa* dans l'échantillon témoins a atteint au 6eme jour une charge de 5,95 $\log_{10}$ UFC/g. Une application du mélange à une concentration de l'ordre de 0,2%, a permis une réduction considérable le premier jour (3,63 $\log_{10}$ UFC/g). La croissance reprend légèrement pour atteindre une charge de 4.69 $\log_{10}$ UFC/g 6ème jour.

Toutefois, lorsque le mélange est appliqué sur le produit à une concentration de l'ordre de 0,4%, la charge de *P. aeruginosa* a atteint des valeurs nulles partir du 1er jour de stockage, et des taux de réduction de 100% par rapport au témoin ont été enregistrés le long de la période de stockage.

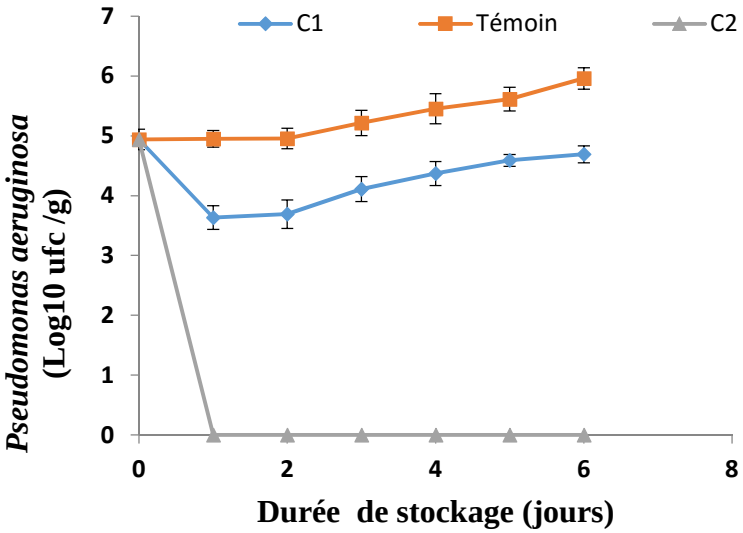


Figure 09 : Cinétique de croissance de *P.aeruginosa* inoculé dans le fromage avec ou sans traitement par le mélange optimisé. C1 : Concentration du mélange à 0,2% (v/m) ; C2 : Concentration du mélange à 0,4% (v/m).

CONCLUSION

Conclusion

La recherche de nouvelles substances naturelles susceptibles d'être utilisées dans l'élaboration de produits naturels bénéfiques pour la santé et plus pratiques révèle actuellement un intérêt sans cesse grandissant. C'est dans cette perspective de recherche que s'inscrit la présente étude mettant en valeur les propriétés antioxydantes et antibactériennes de *S. holoschoenus* et *T. fontaneseii.*

Les résultats de la première étape expérimentale portant sur l'optimisation de l'extraction assistée par microonde montrent que l'optimum en polyphénols totaux est de 30,70 1,22 mg EAG/g de poudre, s'obtient avec la combinaison de d'hydroacétone 53%, 600W et 69s. Cet extrait présente un taux de flavonoïdes de 0,29 0,01mg EQ/g, alors le pourcentage d'inhibition du DPPH˙ est de 18,05 ±1,09%.

Par ailleurs, l'activité antibactérienne de l'extrait brut optimisé contre la souche de *P. aeruginosa* était plus faible par rapport à celle de sa fraction obtenue par l'éthyle acétate (15,5 mm).

Plusieurs combinaisons de la fraction éthyle acétate, l'huile essentielle et l'acide lactique ont été ont été testées dans le but d'avoir une éventuelle synergie. Les résultats sur gélose Muller Hunton ont donné une meilleure zone d'inhibition pour le mélange HE /EA à 37 et 6°C.

De même, la détermination de la concentration minimale inhibitrice montre que *P. aeruginosa* est plus sensible au mélange l'huile essentielle/ fraction éthyle acétate avec une valeur de CMI de 0,048 %.

L'application du mélange dans du fromage frais inoculé par *P. aeruginosa* à des concentrations a mis en évidence l'effet déterminant de la concentration. La concentration de 0,4% a engendré une réduction de 100% par rapport au témoin le long de la période de stockage, alors qu'une réduction considérable a été enregistrée le premier jour puis reprise légère de croissance pour les jours suivants, avec la concentration de 0,2%..

Au vu des résultats obtenus, l'utilisation de la combinaison de la fraction ethyle acétate de *S. holoschoenus* avec l'huile essentielle de *T. fontaneseii* semble etre très efficace contre *P. aeruginosa*, notamment à basse températures. Ainsi, cette étude laisse suggérer la possibilité d'utiliser cette combinaison comme bioconservateur.

Il faut signaler que les extraits étudiés ne sont pas purs et les composés majoritaires ne sont pas les seuls à avoir un rôle dans l'activité d'un extrait, mais l'ensemble des composées de ce dernier est à considérer. De plus, Il faut donc mener une étude détaillée permettant l'identification des principes actifs contenus dans chaque extrait, l'étude de leur activité individuelle, ou de leur interaction afin de comprendre le phénomène responsable de la synergie observée.

Il serait aussi intéressant d'affiner cette étude par des tests *in vivo* afin d'évaluer le degré de leur toxicité

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Abdel-Mogib, M., Basaif, S., Sobahi, T., 2001. Stilbenes and a new acetophenone derivative from *Scirpus holoschoenus*. Molecules 6, 663-667.

Accolas, J.-P., Auclair, J., 1967. Conservation a l'état congelé de suspensions de bactéries lactiques concentrées sous faible. Volume I. Bactéries lactiques mésophiles. Le Lait 47, 253-260.

Ahmed Akrout , Lidia Alarcon Gonzalez , Hajer El Jani , Pablo Campra Madrid . 2011. Antioxidant and antitumor activities of Artemisia campestris and Thymelaea hirsuta from southern Tunisia. Food and Chemical Toxicology 49.

Alireza Ghannadia, Seyed Ebrahim Sajjadia, Kaboucheb, Z., 2004. *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. Ð A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa. Z. Naturforsch. 59c, 187-189.

Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry 108, 55-63.

Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S., Chaouch, A., 2008. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus capitatus et de Thymus bleicherianus du Maroc. Phytothérapie 6, 342-347.

Amiot, J., Fournier, S., Lebeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R., 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. Science et technologie du lait: Transformation du lait. Presses international Polytechnique, Montréal.

Antoanela Popescua, T.N.P., , C.R., , M.A., , BUCUR, L., ISTUDOR, V., 2011. HPLC analysis of polyphenols and antioxidant capacity determination of *Scirpus holoschoenus* L. rhizome. Ovidius University Annals of Chemistry 22, 62-66

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal 11, 69-81.

Ayadi, S., Jerribi, C., Abderrabba, M., 2011. Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie 21, 25-33.

BAKAYOKO, M.A.S., 2008. Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine.

Bayles, D., Wilkinson, B., 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. Letters in applied microbiology 30, 23-27.

Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Abdelouahid, D.E., 2008. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie 6, 153-159.

Benayad, N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Research Project. University of Sciences, Rabat (Maroc).

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal 11, 259-274.

Beuvier, E., Feutry, F., 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Unité de Recherches en Technologie et Analyses laitiéres.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta 76, 965-977.

Bolou, G., Attioua, B., N'guessan, A., Coulibaly, A., N'guessan, J., Djaman, A., 2011. Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.

Bornert, G., 2000. Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. Revue Méd. Vét 151, 1003-1010.

Burhan, H., Ravinder, S.R., Deepak, C., Poonam, S., Fayaz, A.M., Sanjay, S., Ishfaq, A., 2014. Psychrophilic yeasts and their biotechnological applications - A review. African Journal of Biotechnology 13, 2188-2197.

Cavicchioli, R., 2016. On the concept of a psychrophile. ISME J 10, 793-795.

Burt, S.A., Fledderman, M.J., Haagsman, H.P., van Knapen, F., Veldhuizen, E.J., 2007. Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. International journal of food microbiology 119, 346-350.

Cadot, Y., Chevalier, M., Castelló, M.T.M., Moutounet, M., 2008. Le potentiel phénolique du Cabernet franc. Conception couverture: Terre des sciences. INRA Angers, France.

Cantoni, C., Stella, S., Ripamonti, B., Marchese, R., 2001. *Pseudomonas fluorescens* ed alterazioni di colore delle mozzarelle. Industrie alimentari 40, 33-35.

Carbonneau, M.-A., Cisse, M., Mora-Soumille, N., Dairi, S., Rosa, M., Michel, F., Lauret, C., Cristol, J.-P., Dangles, O., 2014. Antioxidant properties of 3-deoxyanthocyanidins and polyphenolic extracts from Côte d'Ivoire's red and white sorghums assessed by ORAC and in vitro LDL oxidisability tests. Food Chemistry 145, 701-709.

Cavicchioli, R., 2002. Extremophiles and the Search for Extraterrestrial Life. Astrobiology Volume 2, 281-288.

Cayol, J.L., Ollivier, B., Alazard, D., Amils, R., Godfroy, A., Marty, D., Piette, F., Prieur, D., 2011. Les conditions de vie extrêmes sur la planète et exobiologie. Ecologie microbienne, 363-371.

Champagne, C.P., Soulignac, L., Marcotte, M., Innocent, J.-P., 2003. Texture et évolution du pH de fromages de type Brie entreposés en atmosphère contrôlée. Le Lait 83, 145-151.

Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F.W.-L., 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. Journal of Chromatography A 1218, 6213-6225.

Chibane, M., 2012. Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.).

Chung-Hung Chana, R.Y., Gek-Cheng Ngoha, Fabian Wai-Lee Kung, 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. Journal of Chromatography A 1218, 6213-6225.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews 12, 564-582.

Croguennec, T., Jeantet, R., Brulé, G., 2008. Fondements physicochimiques de la technologie laitière.

Cuvillier, D., 2007. Les dénominations des fromages. Document cours Centre Fromager de Bourgogne.http://ressources.cfppabourgogne.org/index.php?tg=fileman&idx=get&id=3&gr=Y&path=transformation-alimentaire%2Fcours&file=1-transformation-fromagere-S4A4C.pdf Consulté 03 juin 2016.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G., Gerday, C., 2006. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO reports 7, 385-389.

Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K., 2013. Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. Industrial Crops and Products 50, 77-87.

Dairi, S., Galeano-Díaz, T., Acedo-Valenzuela, M., Godoy-Caballero, M., Dahmoune, F., Remini, H., Madani, K., 2015. Monitoring oxidative stability and phenolic compounds composition of myrtle-enriched extra virgin olive during heating treatment by flame, oven and microwave using reversed phase dispersive liquid–liquid microextraction (RP-DLLME)-HPLC-DAD-FLD method. Industrial Crops and Products 65, 303-314.

Dimitrijević, S.I., Mihajlovski, K.R., Antonović, D.G., Milanović-Stevanović, M.R., Mijin, D.Ž., 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. Food Chemistry 104, 774-782.

Djenane, D., Meddahi, A., Roncalés, P., 2006. Les systèmes antioxydants et antimicrobiens pour la conservation de la viande. Sciences des aliments 26, 37-73.

Feller, G., Gerday, C., 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. Nat Rev Micro 1, 200-208.

Field, J., Lettinga, G., 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms, Plant polyphenols. Springer, pp. 673-692.

Fort Irlinger, F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages.

Gagnon, F., 2011. Le Corrector sive Medicus de Burchard de Worms (1000-1025): présentation, traduction et commentaire ethno-historique.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1370-1373.

Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J.C., Sonan, G., Feller, G., Gerday, C., 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS microbiology reviews 28, 25-42.

Grigoraş, C.-G., 2012. Valorisation of fruits and by-products from fruits industry by bioactive compounds extraction. Université d'Orléans.

Guerrini, P.P., JA, 2003. Conjuguer élaborations techniques et enjeux socio-économiques.

Construction de l'AOC "Brocciu Corse", in: INRA-INAO, S. (Ed.), Systèmes d'élevage et typicité des produits laitiers.

Hagerman, R.J., Hagerman, P.J., 2002. Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment, and research. Taylor & Francis US.

Harborne, J.B., 2013. The flavonoids: advances in research since 1980. Springer.

I.N.A.O, 2011. comite national des indications geographiques protegees, labels rouges et specialites traditionnelles garanties. Comite national des IGP, LR et STG.

Inglett, G.E., Chen, D., Berhow, M., Lee, S., 2011. Antioxidant activity of commercial buckwheat flours and their free and bound phenolic compositions. Food Chemistry 125, 923-929.

Jamshidian, M., 2011. Inclusion et libération de molécules antioxydantes dans un emballage à base d'Acide Poly Lactique en contact alimentaire. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.

Junge, K., Christner, B., Staley, J.T., 2011. Diversity of Psychrophilic Bacteria from Sea Ice - and Glacial Ice Communities, in: Horikoshi, K. (Ed.), Extremophiles Handbook. Springer Japan, Tokyo, pp. 793-815.

Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., Siebenhandl, S., 2006. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. International Journal of Food Science & Technology 41, 121-133.

Kahl, R., Kappus, H., 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung 196, 329-338.

Kiran, M.D., Annapoorni, S., Suzuki, I., Murata, N., Shivaji, S., 2005. Cis-trans isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under conditions of temperature and solvent stress. Extremophiles : life under extreme conditions 9, 117-125.

Kiran, M.D., Prakash, J.S., Annapoorni, S., Dube, S., Kusano, T., Okuyama, H., Murata, N., Shivaji, S., 2004. Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature. Extremophiles : life under extreme conditions 8, 401-410.

Kristjansson, J., Hreggvidsson, G., 1995. Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 17-25.

Kuete, V., Wabo, G.F., Ngameni, B., Mbaveng, A.T., Metuno, R., Etoa, F.X., Ngadjui, B.T., Beng, V.P., Meyer, J.J., Lall, N., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). J Ethnopharmacol 114, 54-60.

Lapointe-Vignola, C., 2002. Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique.

Le Graet, Y., Brulé, G., 1993. Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. Le Lait 73, 51-60.

Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J., 1983. L'elaboration d'un fromage: l'exemple du Camembert [aromes, affinage]. Pour la Science.

Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C.G., 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. Journal of chromatography. A 1140, 29-34.

Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F., 2006. Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. Journal of the Science of Food and Agriculture 86, 477-485.

Locatelli1, G.G.F.N.J., ; Paulo C. Freitas1, G.L.S., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibioticresistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology 31, :247-256.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.

Maddox, C.E., Laur, L.M., Tian, L., 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. Current microbiology 60, 53-58.

Mallakpour, S., Rafiee, Z., 2009. Microwave-induced synthesis of new optically active and soluble polyamides containing pendent 4-(2-phthalimidiylpropanoylamino) benzoylamino-groups. Amino acids 37, 665-672.

Mamhloufi, A., 2013. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru.

Mandal, V., Mandal, S.C., 2010. Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. Biochemical Engineering Journal 50, 63-70.

Mansour, A., Alais, C., 1973. Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. III.- Aspect bacteriologique. Le Lait 53, 137-145.

Mason, T.L., 1987. Inactivation of red beet β-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phytochemistry 26, 2197-2202.

Mbaiogaou, A., Hema, A., Ouedraogo, M., Palé, E., Naitormbaide, M., Mahamout, Y., Nacro, M., 2013. Etude comparative des teneurs en polyphénols et en antioxydants totaux d'extraits de graines de 44 variétés de voandzou (*Vigna subterranea* (L.) Verdcourt). International Journal of Biological and Chemical Sciences 7, 861-871.

McSweeney, P.L., 2004. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology 57, 127-144.

McSweeney, P.L., 2007. Cheese problems solved. Elsevier.

Mietton, M.e., Humbert, J., 1994. Dynamique du milieu naturel et transformations par l'homme dans le delta du Sénégal. La cuvette du N'Diael hier, aujourd'hui et demain. Enregistreurs et indicateurs de l'évolution de l'environnement en zone tropicale (sous la direction de R. Maire, S. Pomel, JN Salomon). Espaces tropicaux n 14, 345-365.

Mohammadhosseini, M., Mahdavi, B., Akhlaghi, H., 2013. Characterization and chemical composition of the volatile oils from aerial parts of *Eryngium bungei* Bioss.(Apiaceae) by using traditional hydrodistillation, microwave assisted hydrodistillation and head space solid phase microextraction methods prior to GC and GC/MS analyses: A comparative approach. Journal of Essential Oil Bearing Plants 16, 613-623.

Montel, M.-C., Béranger, C., Bonnemaire, J., 2005. Les fermentations au service des produits de terroir. Editions Quae.

Montel, M.-C., Buchinb, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., 2014. Fromages traditionnels: Bénéfices associés à la richesse et à la diversité de leur microbiote. benefits 177, 136-154.

Morita, R.Y., 1975. Psychrophilic bacteria. Bacteriological reviews 39, 144.

Moulin, A., 1939. L'utilisation économique du froid artificiel dans la conservation et l'amélioration des fromages à pâte persillée. Le Lait 19, 924-926.

Naczk, M., Grant, S., Zadernowski, R., Barre, E., 2006. Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. Food Chemistry 96, 640-647.

Noudjoub, M., 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne. Université M'hamed Bougara de Boumerdès.

Oikawa, K., Wulff, L., Iijima, T., Gejima, F., Ohmori, T., Fujita, A., Fukamichi, K., Kainuma, R., Ishida, K., 2001. Promising ferromagnetic Ni-Co-Al shape memory alloy system. Applied Physics Letters 79, 3290-3292.

Oliveira, O.R.d., , D.T., , A.C.P.P.d.C., , Innecco, R., , e.C.C.d.A., 2008. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero Lippia sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. Ciên. Agron., Fortalez 39, 94-100.

Oussaid, S., 2011. evaluation des activités bilogiques de l'extrait phénolique de la plante médicinale *S.holoschoenus.* thése de magister Université de M'hamed Bouguera de Boumerdes.

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., 2008. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. Food Chemistry 106, 1264-1270.

Petti, S., Scully, C., 2009. Polyphenols, oral health and disease: A review. Journal of dentistry 37, 413-423.

Phadtare, S., 2004. Recent Developments in Bacterial Cold-Shock Response. Curr. Issues Mol. Biol 6, 125-136.

Pincemail, J., Degrune, F., Voussure, S., Malherbe, C., Paquot, N., Defraigne, J.-O., 2007. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. Nutrition clinique et métabolisme 21, 66-75.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 4290-4302.

Proestos, C., Komaitis, M., 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. LWT-food science and technology 41, 652-659.

Rossi, M., Buzzini, P., Cordisco, L., Amaretti, A., Sala, M., Raimondi, S., Ponzoni, C., Pagnoni, U.M., Matteuzzi, D., 2009. Growth, lipid accumulation, and fatty acid composition in obligate psychrophilic, facultative psychrophilic, and mesophilic yeasts. FEMS microbiology ecology 69, 363-372.

Ruberto, G., Baratta, M.T., Deans, S.G., Dorman, H., 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. Planta medica 66, 687-693.

Sabry, Z., Guerrant, N., 1958. Vitamin content of pickled cheeses as influenced by production and ripening. Journal of Dairy Science 41, 925-930.

Scherer, S., Neuhaus, K., 2006. Life at low temperatures, The prokaryotes. Springer, pp. 210-262.

Schuster, c., tutulescu,ion, Tutulescu, i., 2011. Some Remarks about the Tools used for Obtaining Salt in Prehistory in Northern Oltenia. Orient Și Occident.

Seifried, H.E., Anderson, D.e., Fisher, E.I Milner, J.A., 2007. A review of the interaction among dietary antioxydants and reactive oxygen species. The Journal of nutrition biochemistry 18,567-579.

Shahidi, F., Janitha, P., Wanasundara, P., 1992. Phenolic antioxidants. Critical reviews in food science & nutrition 32, 67-103.

Sinquin, A., Görner, T., Dellacherie, E., 1993. L'utilisation des micro-ondes en chimie analytique. Analusis 21, 1-10.

Sofowora, A., 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala Editions.

Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y., 2011. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. Innovative Food Science & Emerging Technologies 12, 282-287.

Spigno, G., De Faveri, D., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. Journal of Food Engineering 93, 210-217.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering 81, 200-208.

Sutivisedsak, N., Cheng, H.N., Willett, J.L., Lesch, W.C., Tangsrud, R.R., Biswas, A., 2010. Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Research International 43, 516-519.

Tamgno, B.R., Ngamo, L., 2014. Utilisation des produits dérivés du neem Azadirachta indica A. Juss comme alternatifs aux insecticides synthétiques pour la protection des semences de maïs et de sorgho dans la Vallée du Logone. Sciences, Technologies et Développement 15, 1-8.

Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C., Vaughan-Martini, A., 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. FEMS microbiology ecology 63, 73-83.

Turcot, S., St-Gelais, D., Turgeon, S.L., 2002. Affinage de fromages allégés de type Cheddar fabriqués à partir de laits enrichis en phospholipides. Le Lait 82, 209-223.

USDA.United States Department of Agriculture. *Scirpus holoschoenus.*Naturel Ressources Conservation Service. http/www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=SCH06. Consulté le 15 mai 2016.

USDA.United States Department of Agriculture.*Tymus fontanesii.* Naturel Ressources Conservation Service. http/www.plants.usda.gov/core/profile?symbol=SCH06. Consulté le 15 mai 2016.

Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. Chemosphere 68, 1563-1575.

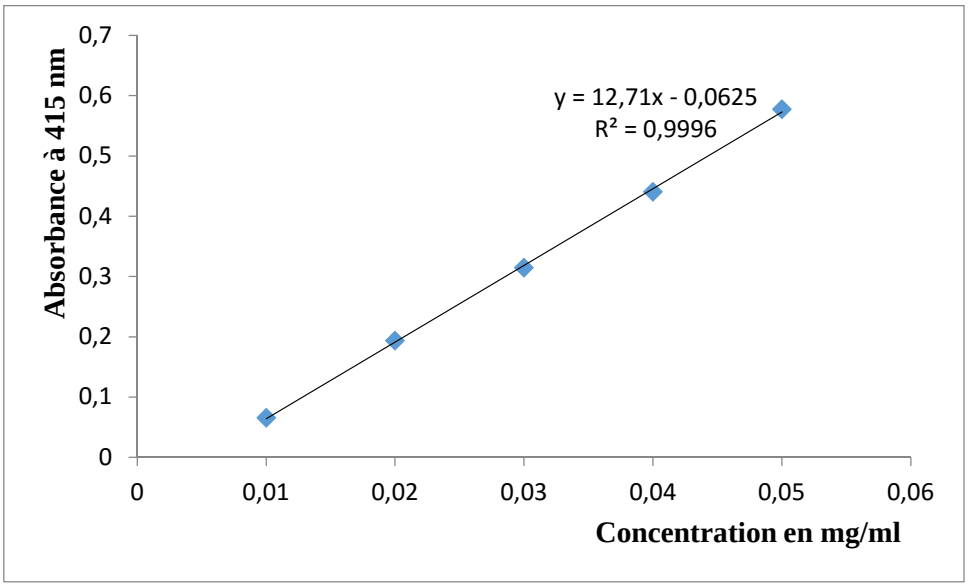
Yabrir, B., 2014. Etude de la qualité du lait de brebis collecté dans la région de Djelfa: effet des facteurs de production sur ses caractéristiques, évolution au cours de l'entreposage réfrigéré, aptitudes technologiques. Université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou.

Zhang, H.-F., Yang, X.-H., Wang, Y., 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions. Trends in Food Science & Technology 22, 672-688.

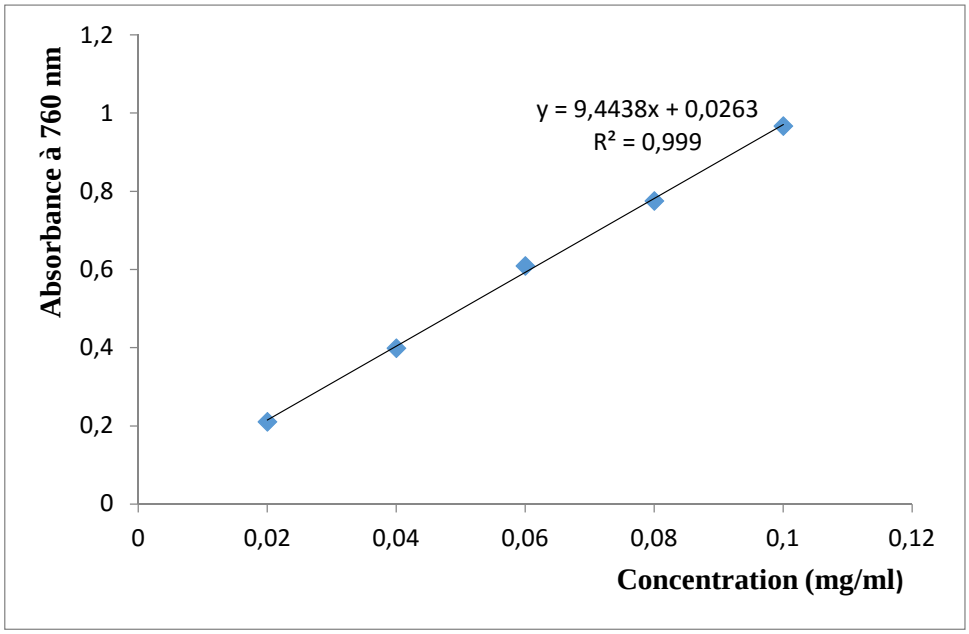
ANNEXES

ANNEXES

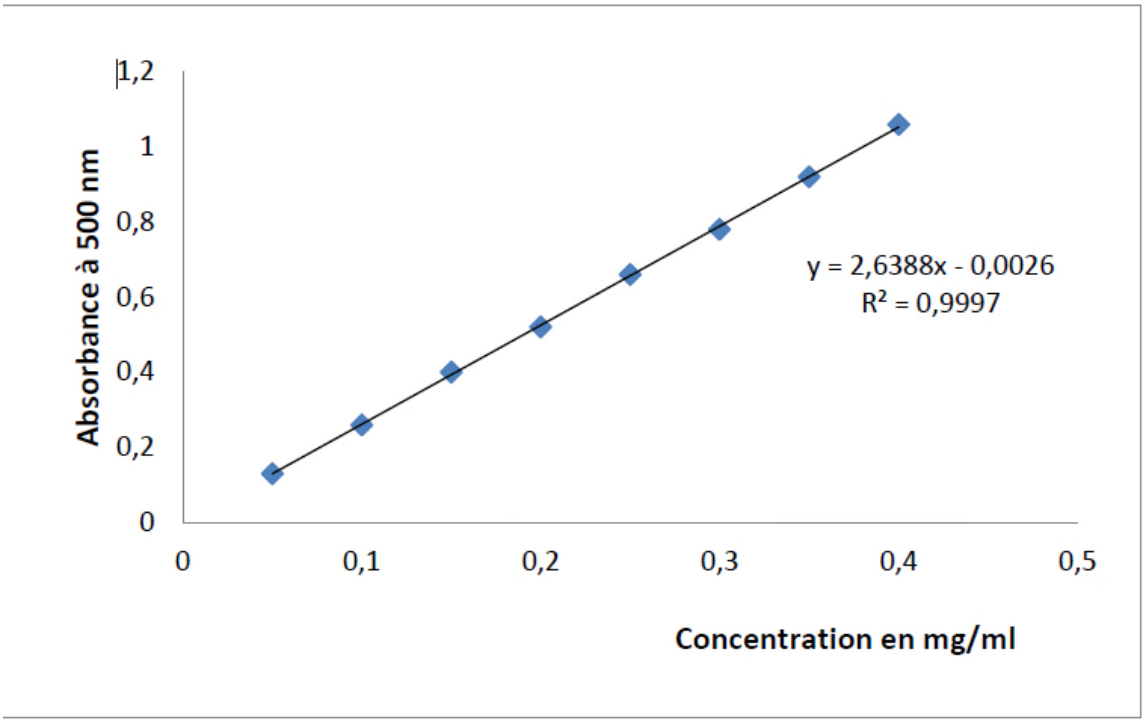
Annexe 1 : Courbe standard des composés phénoliques (Acide gallique)



Annexe 2 : Courbe standard des flavonoïdes (la quercitrine)



Annexe 3 : Courbe standard des tanins (la catéchine)



Annexe II :composition du fromage

Matière grasse

Protéine de lait

Poudre de fromage cheddar

Stabilisant (SIN410, SIN 412 ? SIN471) BPF,

Régulateur d’acidité.

Résumé

La conservation à basses températures est un recours quasi-systématique, cependant elle valorise le développement de microorganismes psychrotrophes, notamment lorsque la chaine du froid est rompue. Afin de remédier à ce problème, l'essai d'incorporation des extraits végétaux de *Scirpus holoschoenus* et de *Thymus fontaneseii* a été élaboré vis-a-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ACCT 27853. Ces agents se sont révélés actifs à de basses et moyennes températures. Différentes combinaisons suivant un plan d'expérience préétabli démontrent l'effet de synergie de l'huile essentielle (H.E) de *T. fontaneseii* et la fraction d'éthyle acétate de *S. holoschoenus* dont les diamètres des zones d'inhibions sont de 65 ± 0.89 et et 23 ± 0,7 à 6 et 37°C, respectivement. De même, la valeur de la CMI la plus faible (0,048%) a été enregistrée avec la combinaison H.E et EA (3 :1, v/v). Le même mélange est additionné à des concentrations de 0,2 et 0,4% (v/m), au fromage frais expérimentalement inoculée avec la souche bactérienne. Après, 6 jours de stockage à 6 ± 1°C, l'accroissement est de l'ordre de 5,95 $\log_{10}$ UFC/g pour le témoin contre 4.69 $\log_{10}$ UFC/g pour l'échantillon traité , alors la concentration de 0,4% a conduit à la mort totale des cellules bactériennes.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa, psychrotrophe*, *Scirpus holoschoenus, Thymus fontaneseii*, fromage frais.

Abstract

Storage at low temperatures is a quasi-systematic use, however it enhances development of psychrotrophic microorganisms, particularly when the cold chain is broken. The objective of this study was to evaluate the individual and combined effect of hydro-acetonic extract from *Scirpus holoschoenus*, essential oil of *Thymus fontaneseii* and lactic acid against *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853. These agents were active at low and mean temperature. Different combinations according to a experimental design demonstrate the synergistic effect between essential oil and the ethyl acetate fraction with Diameter of the inhibition zone of 65 ± 0.89 and 23 ± 0.7 at 4 °C and 37, respectively. Similarly, the lowest value of MIC (0.048%) was obtained with the mixture of essential oil/ethyl acetate fraction (3/1). This mixture was added to the experimentally inoculated cheese with the strain. After 6 days of storage at 6 ± 1 °C, the growth is of the order of 5.95 log10 CFU/ g for control and 4.69 log10 CFU / g for the treated sample. While, the concentration of 0.4% resulted in the complete death of bacterial cells

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, psychrotrophic, *Scirpus holoschoenus, Thymus fontaneseii*, fresh cheese