



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**Activité antibactérienne des huiles essentielles sur des
souches isolées de produits carnés**

Présenté par : Zineb DIOURI

Encadré par : Dr Sanae BERRADA (ISPITS)

Pr El Houssaine HARKI (FST Fès)

Soutenu le : 09 JUILLET 2021

Devant le jury composé de :

- **Pr El Houssaine HARKI (Président)**
- **Pr Abdelali TAZI (Examinateur)**
- **DR Sanae BERRADA (Encadrante)**

Stage effectué au laboratoire Microbiologie et Biologie Moléculaire
de la Faculté De Médecine Et De Pharmacie De Fès.

Année universitaire 2020-2021



Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	12
Figure 2 : CMI des huiles testées sur les souches <i>d'E.coli</i> et <i>S.aureus</i>	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Mode d'action des Ab selon la famille.....	10
Tableau 2. : Concentrations critiques et charges des disques.....	21
Tableau 3 : Rendement en HE.....	28
Tableau 4 : Résultats de l'antibiogramme.....	28
Tableau 5 : Aspect qualitatif des HE, exprimé en diamètre d'inhibition.....	29
Tableau 6 : CMI et CMB des HE testées.....	30



TABLE DES MATIERES

Remerciements	i
Dédicace	ii
Résumé	iii
Liste des abréviations	iv
Liste des illustrations.....	v
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : Revue bibliographique.....	3
I. Produits carnés	4
1. Généralités	4
2. Qualité hygiénique des produits carnés et indicateurs de la non-conformité microbiologique.....	4
3. Caractères des germes étudiés	6
II. Molécules bioactives	8
A. Antibiotiques	8
1. Généralités.....	8
2. Classification des antibiotiques	8
3. Mode d'action des antibiotiques.....	9
4. Résistance bactérienne aux antibiotiques	11
B. Plantes aromatiques et médicinales (PAM) et huiles essentielles (HE).....	13
1. Définition.....	13
2. PAM au Maroc	13
3. Place des PAM dans le système de santé.....	14
4. Activités biologiques des HE.....	14
5. Procédés d'extraction des HE.....	15
6. Techniques d'études du pouvoir antibactérien des HE.....	15
7. Données botaniques des plantes étudiées	16
Matériels et méthodes.....	19
I. Type, lieu d'étude.....	20
II. Matériels.....	20
1. Matériels biologiques.....	20
2. Matériels du laboratoire.....	20
3. Molécules Bioactives.....	20
4. Méthodes	22



Résultats et discussion.....	27
Résultats	28
1. Rendement.....	28
2. Etude de la résistance des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques.....	28
3. Sensibilité aux HE testées	29
Discussion	31
Conclusion, recommandations et perspectives.....	35
Références	36
Annexes.....	43



INTRODUCTION

La viande rouge occupe une part importante dans l'alimentation humaine. Sa production mondiale a augmenté de 1.0 % pour s'établir à 327 millions de tonnes en 2018 (FAO, 2019). A l'échelle nationale, la production annuelle moyenne est de 152 000 tonnes de viande bovine, 116 000 tonnes de viande ovine, 51 000 tonnes d'abat, et de 47 000 tonnes d'autres types de viandes rouges (Cohen C. *et al*, 2006).

Sur le plan nutritionnel, c'est un aliment complexe, composé de lipides et de protéines, ce qui pourrait la rendre une denrée très périssable et notamment à l'état cru (Arvieux C., 1998). Cette détérioration surtout par les microorganismes pathogènes a été incriminée dans de nombreux cas de foyers de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Ainsi, à titre d'exemple, la contamination à l'échelle nationale des aliments d'origine animale et principalement des viandes et produits carnés était responsable de 28% des cas de TIAC notifiés entre 2000 et 2004 (Cohen N. *et al*, 2006). Devant le risque sanitaire lié à la consommation des denrées alimentaires, la qualité hygiénique de ces produits est devenue une préoccupation prioritaire pour la santé publique (El Marnissi B. *et al*, 2012).

En outre, en raison de plusieurs facteurs tels que le mauvais usage et la surconsommation des antibiotiques aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, on assiste à l'émergence et la dissémination de l'antibio-résistance des bactéries pathogènes. Cette émergence représente en effet un problème de santé publique important, dont la maîtrise constitue un défi pour les cliniciens, les microbiologistes, les hygiénistes et les autorités sanitaires. Ceci souligne l'urgence de la recherche des alternatives efficaces et accessibles. L'exploitation de nouveaux produits d'origine naturelle constitue un axe important de recherche au niveau mondial. Ainsi, les chercheurs scientifiques tentent d'ores et de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels extraits de plantes médicinales et aromatiques qui connaissent de nos jours un regain d'intérêt et jouissent d'une popularité grandissante (Berrada S, 2016a).

Dans ce contexte et dans le cadre de notre projet de fin d'étude, nous avons réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire de la Faculté De Médecine Et De Pharmacie De Fès, une étude intitulée : Activité antibactérienne des huiles essentielles sur des souches isolées de produits carnés.



Les objectifs de l'étude ont consisté à :

- ✓ Maitriser certaines techniques de laboratoire portant notamment sur l'extraction des HE et les méthodes d'évaluation de leur action antibactérienne. Les HE choisies sont l'HE de *Mentha spicata*, l'He de *Eucalyptus camaldulensis* et celle de *Cinnamomum cassia*
- ✓ Evaluer l'action des HE choisies sur des souches bactériennes isolées de produits carnés.

Le premier chapitre de ce mémoire, rapportera une revue bibliographique portant sur les produits carnés, les molécules bioactives ainsi que des données sur les plantes testées. Le second chapitre va concerner le matériel et les méthodes d'étude. Quant au 3^{ème} chapitre, il concerne les résultats et la discussion et enfin une conclusion.



CHAPITRE 1 :

Revue

bibliographique



I. Produits carnés

1. Généralités

Les produits carnés sont des produits composés principalement de viandes et sont obtenus suite à la transformation de celles-ci. Ils sont consommés en l'état, éventuellement après cuisson ou réchauffage ou entrent dans la garniture de plats cuisinés. La viande est en effet considérée comme un aliment de choix en raison de sa valeur nutritive. Sa richesse en protéines et la nature de celles-ci en font un aliment indispensable pour une ration alimentaire équilibrée. Il existe plusieurs catégories de viande dont principalement la viande de bœuf et de veau, la viande de mouton et de chèvre, la viande de mulet, la viande lapin et de volailles (Ballin 2010).

2. Qualité hygiénique des produits carnés et indicateurs de la non-conformité microbiologique

La qualité se définit à partir de systèmes de références tels que les normes et s'obtient par l'application de procédures bien définies et maîtrisées. La qualité des produits carnés, enjeu majeur pour l'ensemble des filières, est considérée comme un passage obligé pour les industriels et les distributeurs et aussi pour les consommateurs (Gouin S., 2014). La chair d'un animal sain vivant est pratiquement stérile. Cependant, en raison de plusieurs facteurs tels que la présence d'éléments nutritifs, l'état de santé de l'animal et les diverses sources de contamination, les produits carnés peuvent être le siège d'une prolifération microbienne et des transformations qu'elle entraîne. La viande constitue un terrain très favorable à la multiplication microbienne, essentiellement celle de bactéries protéolytiques qui entraînent des modifications néfastes sur l'odeur, la couleur, la texture et produisent des substances toxiques. C'est donc une matière première fragile qui doit être strictement surveillée en raison du danger dû à ces altérations et à la présence éventuelle de germes pathogènes (Oumokhtar *et al*, 1998).

Les principaux contaminants de surface de la viande proviennent des conditions d'abattage (environnement de l'abattoir, opérations de découpe et d'éviscération...). La non-maîtrise de ces étapes est une cause fréquente de toxi-infections alimentaires et doit faire l'objet de pratiques très strictes. Les conditions d'entreposage (temps et température) influent aussi sur la pénétration des microorganismes dans les tissus. L'état de santé de l'animal avant l'abattage (y compris les stress lors du transport, de la stabulation...) peut aussi avoir une influence sur la qualité microbiologique de la viande (Thu H, 2008).



3. Caractères des germes étudiés

Les souches bactériennes que nous allons décrire sont les staphylocoques et notamment *S. aureus* et *E.coli*.

3-1- Staphylocoques

a- Généralités

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires à Gram positif, non sporulée, présentes dans la flore résidente de la peau de l'Homme et des animaux de façon transitoire dans les autres flores. Morphologiquement, ce sont des cocci à Gram positif, groupés en amas ou en grappe de raisin ce. Ils mesurent de 0,5 à 1 μm de diamètre, immobiles, aéro-anaérobie facultatif. Certaines espèces sont rencontrées chez l'Homme et l'animal (*S. aureus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*). D'autres espèces sont rencontrées plus particulièrement chez l'Homme (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*) (Roger et al. 1997).

Le *S. aureus* ou staphylocoque doré, appartient à la famille des *Micrococcaceae* et au genre *Staphylococcus*. Il possède une catalase et une coagulase. Certaines souches de *S. aureus* produisent de nombreuses toxines dont les SE, et qui sont responsables d'épidémies liées à cette bactérie (ANSES 2011).

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'Homme et les animaux à sang chaud. Éliminées dans la nature, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. Le site de colonisation préférentielle de *S. aureus* chez l'Homme est la muqueuse nasale. En effet, 30% des adultes hébergent *S. aureus* de façon permanente, 50% de façon intermittente et 20% ne sont jamais porteurs. À partir des sites de portage, *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains. Quant aux staphylocoques coagulase négative (SCN), ils représentent les principaux germes commensaux de la peau. La densité de colonisation est plus importante au niveau des zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux. Ils peuvent aussi être isolés des muqueuses. La transmission intra ou interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Plus rarement, elle peut être indirecte à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériels médicaux) (Benouda and Elhamzoui, n.d.).

b- Caractères biochimiques et facteurs de virulence des staphylocoques

Les staphylocoques possèdent les caractéristiques du genre *Staphylococcus* soit:

- ✚ La présence de catalase à la différence des streptocoques qui n'en possèdent pas,
- ✚ L'absence d'une oxydase,
- ✚ La fermentation du glucose sans gaz.

En outre, *S.aureus* possède bien d'autres caractéristiques biochimiques propres à l'espèce, notamment :

- ✚ La présence d'une coagulase libre ou staphylocoagulase (enzyme extracellulaires),
- ✚ Le récepteur au fibrinogène (RF),
- ✚ La protéine de paroi chez près de 90% de souches,
- ✚ La phosphatase,
- ✚ La thermonucléase ou DNase thermostable,
- ✚ La fermentation du mannitol sur la gélose de Chapman (Zdzalik et al. 2013).

Quant aux facteurs de virulence des *S. aureus*, on trouve:

✚ **Les Toxines (Hémolysines, Leucocidine, Exfoliatine, Entérotoxines):** Il y a sept sérotypes différents (A, B, C1, C2, C3, D, E)

✚ **Les Antigènes :** La paroi des staphylocoques contient 2 antigènes principaux: une protéine A vis-à-vis de laquelle tout le monde a des Anticorps, et l'acide teichoïque.

✚ **Les Enzymes** telles que la coagulase, la lipase, l'hyaluronidase, la staphylokinase, et la désox- rinoNucléase (Tattevin 2011).

3-2- *Escherichia coli*

a- Généralités

Escherichia coli (*E.coli*) est une bactérie, en forme de bacille à Gram négatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Escherichia*. Elle possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. Elle se réplique très rapidement à 37°C, toutes les 20 minutes, ce qui permet de multiplier facilement de l'ADN ou des protéines d'intérêt.

Elle fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. C'est l'espèce prédominante de la flore fécale humaine aéro-anaérobie, se trouve naturellement au sein de la flore intestinale, elle en constitue même 80 %. Toutefois, il existe plusieurs souches différentes d'*E.coli* et, si certaines sont sans danger et nécessaires au bon fonctionnement du microbiote intestinal, en empêchant le développement d'autres bactéries et en intervenant dans la production de la vitamine K, d'autres, quoique moins nombreuses, sont plus nocives.

Ainsi, plusieurs types d'*E.coli* sont susceptibles de provoquer des infections, notamment intestinales de gravité variable, les infections urinaires et les infections génitales (Jang et al. 2017).

La présence d'*E.coli* dans l'eau et les aliments est un indice de contamination fécale.



La classification selon la nature permet de classer les Ab en plusieurs familles : les β -lactamines, les aminosides, les phénicoles, les tétracyclines, les macrolides, les polymyxines, les quinolones, les lincosamides, les sulfamides, l'association Sulfamide/Triméthoprim, les nitrofuranes, les nitofuranes, les glycopeptides, les rifamicines et les Nitroimidazoles (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2012).

3. Mode d'action des antibiotiques

Le mécanisme d'action des Ab n'est pas toujours parfaitement élucidé. Cependant, on distingue cinq grands modes d'action : l'action sur la synthèse du peptidoglycane, l'action sur la membrane cytoplasmique, l'action sur l'ADN, l'action sur la synthèse des protéines et l'action par inhibition compétitive. Le tableau 1 résume le mode et le niveau d'action des familles d'Ab (Yala *et al.*, 2001 ; Mohammedi, 2012). Le tableau ci-dessous présente les différents modes d'action des Ab selon leur famille.



Tableau1 : Mode d'action des Ab selon la famille (Yala et al., 2001 ; Mohammedi, 2012).

Famille d'Ab	Exemple de sous-groupes et de composés	Mode d'action
β-lactamines,	Pénicilline G : Benzyl Pénicilline (péniG), Clométocilline... Pénicilline M : Méthicilline, Oxacilline, Flucloxacilline..... Aminopénicillines : Amoxicilline, Ampicilline... Carboxypénicillines : Ticarcilline... Urédopénicilline Sulfoxypénicillines. Céphalosporines 1ère génération: Céphalexine... Céphalosporines 2ème génération : Céfoxitine... Céphalosporines 3ème génération :Céftriaxone, ... Autres céphalosporines : Céfépime, céftobiprole... Carbapénème: Imipénème... Monobactame: aztréonam...	Au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne.
Aminosides	Streptomycine, Néomycine, Gentamicine, kanamycine, Tobramycine ...	Perturbation de la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne.
Phénicoles	Chloramphénicol, Thiamphénicol	Au niveau de la sous unité 50 S du ribosome. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines.
Tétracyclines	Oxytétracycline, Chlortétracycline, Doxycycline, Minocycline, Glycylcyclines	Inhibition de la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome
Polymixines	Polymixine B, Polymixine E ou colistine	Au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.
Macrolides	14atomes: Erythromycine, Oléandomycine,... 15atomes: Azithromycine 16atomes: Josamycine, Spiramycine ...	Inhibition de la synthèse protéique bactérienne, en se fixant sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse.
Lincosamides	Lincomycine, clindamycine	Sur la fraction 50 S du ribosome en inhibant la phase initiale de la synthèse protéique.
Quinolones (dont les fluoroquinolones)	1ère génération : Acide nalidixique, Acide pipémidique, Acide oxolinique, Fluméquine 2ème génération : Péfloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacine 3ème génération : Lévofloxacine, Moxifloxacine, Sparfloxacine, gatifloxacine	Inhibition de la synthèse de l'ADN de la bactérie, en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien.
Sulfamides	Sulfapyridine, Sulfafurazole Sulfaméthoxydiazine Sulfaméthoxypyridazine Sulfaméthoxazole Sulfaméthizole	Activité bactériostatique, en entrant en compétition avec le para-amino benzoïque (PAB) et en bloquant ainsi l'action de la dihydroptéroate synthétase (DHPS).
Sulfamides+ Triméthoprime	Sulfaméthoxazole+Triméthoprime (Cotrimoxazole)	Le Triméthoprime agit dans le blocage enzymatique de la synthèse des folates, juste après les sulfamides. Les deux molécules bloquent la synthèse des folates à deux stades différents, ce qui renforce leur activité antibactérienne. L'intérêt de cette association est que les mutants résistants aux deux composants apparaissent moins rapidement
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne, Hydroxyméthyl-nitrofurantoïne, Furazolidone, Nifuroxazide	Perturbation de la réplication de l'ADN.
Glycopeptides (antibiopeptidiques)	Vancomycine, Gramicidine, Tétracycline	Action sur la paroi bactérienne en bloquant la polymérisation du peptidoglycane par un mécanisme complexe.
Rifamycines	Rifampicine, Rifamycine SV	Blocage de la transcription par inhibition de l'ARN polymérase.
Nitroimidazoles	Métronidazole	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques en entraînant la mort rapide de la bactérie.



4. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en Ab comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre cultivées dans les mêmes conditions.

Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie Ab mise en place (Moreillon 1995).

4-1- Types de résistance

Les bactéries sont résistantes aux Ab, soit naturellement soit par un mécanisme acquis.

a- Résistance naturelle

Pour chaque classe d'Ab, il existe des espèces bactériennes sur lesquelles l'Ab est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. On parle d'espèces bactériennes naturellement résistantes et de mécanismes de résistance intrinsèques. Ce type de résistance est programmé sur le génome bactérien, donc fixe et constant à l'intérieur du taxon. A ce titre, elle constitue un critère d'identification (Guinoiseau *et al*, 2010).

b- Résistance acquise

Les bactéries peuvent également acquérir la résistance à un Ab. Cette acquisition peut être la conséquence d'un transfert horizontal, y compris entre espèces éloignées phylogéniquement. La résistance acquise est due à une modification génétique qui peut être de 2 types :

- Chromosomique et ceci par mutation génétique affectant un gène de structure ou de régulation. Ce phénomène est rare (10 à 20%), il se fait de manière spontanée et reste stable dans le temps, sa transmission se fait de manière verticale expliquant qu'il soit spécifique d'un Ab ou d'une famille.

- Extra-chromosomique et ceci par acquisition de gènes de résistance. Ce phénomène est plus fréquent (80 à 90%). Les éléments génétiques sont mobiles et portés par des plasmides, des intégrons ou des transposons pouvant se transmettre de manière horizontale aux autres bactéries par simple contact ou bactériophagie, expliquant qu'il puisse toucher plusieurs familles d'Ab et entraîner une multi-résistance (Courvalin 1997).

c- Résistance mutationnelle

C'est un phénomène rare, stable, dû au hasard, transmissible uniquement de façon verticale de bactérie mère à des bactéries filles.



B- Plantes aromatiques et médicinales (PAM) et huiles essentielles (HE)

1. Définition

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2002), les plantes aromatiques médicinales (PAMs) sont des végétaux qui contiennent suffisamment de molécules aromatiques dans un ou plusieurs organes producteurs (feuilles, fleurs, tiges, fruits, écorces, racines, *etc*), et qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques, ou qui sont des précurseurs de la chimio-pharmaceutique. En plus de leurs propriétés médicamenteuses, Elles peuvent avoir également des usages alimentaires, condimentaires ou servir à la préparation de boissons hygiéniques. Quant aux HE, ce sont des mélanges liquides très complexes, généralement odorants, obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau, de végétaux ou de parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certains citrus. Cette définition excluant les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction. Les HE sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) et présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité, soit au réfrigérateur dans des flacons en verre opaque (AFSSAPS 2008).

2. PAM au Maroc

Le Maroc, de par sa situation géographique, bénéficie d'un climat et un cadre favorable à la culture d'une flore riche et variée. En effet, il occupe ainsi la première place parmi les pays du Sud de la méditerranée et la deuxième à l'échelle mondiale après la Turquie pour sa richesse en plantes endémiques. Sur les 4200 espèces, on trouve environ 800 endémiques parmi lesquelles près de 400 espèces sont reconnues pour leur usage médicinal et aromatique, ainsi que pour leur potentiel de développement (Projet PAM, 2015). A côté de son contexte naturel, le Maroc dispose d'un savoir-faire ancestral qui date depuis les temps les plus anciens permettant l'utilisation des PAMs en médication, aromatisation, conservation des aliments ainsi que pour l'extraction des principes aromatiques destinés à la parfumerie familiale ou au marché.

Cette pratique de la médecine traditionnelle est liée à plusieurs paramètres : âge, sexe, niveau d'étude, situation familiale, type de maladie, famille des plantes utilisées, connaissances sur la



toxicité des plantes, etc. En outre, plusieurs enquêtes ont été menées au Maroc dans l'optique de recenser et répertorier les PAMs les plus fréquemment utilisées et collecter les informations sur les usages thérapeutiques pratiqués par la population locale en fonction des différentes régions du pays et des pathologies à traiter. Plus d'une vingtaine d'espèces sont utilisées pour la production d'HE ou d'autres extraits aromatiques destinés essentiellement à l'industrie de parfumerie et cosmétique ainsi que pour la préparation des produits d'hygiène et la formulation des arômes (Chadouli, 2012).

3. Place des PAM dans le système de santé

A cause de leurs vertus médicinales, l'organisation mondiale de la santé estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaires de 80% de la population mondiale. Ce phénomène n'est pas limité aux pays en développement. Le marché global des PAMs a été estimé en l'an 2000, à 30 Milliards de dollars. Au sein de la communauté européenne, elles représentent une part importante du marché des produits pharmaceutiques, avec des ventes annuelles de l'ordre de 7 milliards de dollars. Aux États-Unis, la vente de produits à base de PAMs a grimpé de 200 millions de dollars en 1988 à plus de 3,3 milliards de dollars en 1997 (Gail, 2011). L'industrie médicale mondiale utilisant les PAMs a connu en effet une augmentation exponentielle au cours de ces dernières décades suite à la révolution « bio », « environnement sain » et « développement durable » (EL Karbass *et al*, 2014).

Les produits de la médecine traditionnelle comprennent les plantes, les matières à base de plantes, les préparations les produits finis à base de plantes, qui contiennent comme ingrédients actifs des parties de plantes ou autres matières végétales ou une combinaison des deux. Dans certains pays, les médicaments à base de plantes peuvent traditionnellement contenir des ingrédients actifs naturels, organiques ou inorganiques, qui ne sont pas d'origine végétale (matières animales et minérales). Le médicament végétal serait, en général, mieux toléré par l'organisme, permettant ainsi des traitements prolongés. Les effets secondaires sont dans l'ensemble peu marqués, étant donné l'ancienneté de la médication, et beaucoup mieux connus que dans le cas des substances de synthèse, ayant des effets toxiques inattendus (AFSSAPS 2008).

4. Activités biologiques des HE

Les propriétés médicinales des PAMs sont nombreuses : antispasmodique, expectorant, rafraîchissant, diurétique, etc. Elles sont également utilisées pour leur propriété antimicrobienne. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale.



7. Données botaniques des plantes étudiées

Vu l'importance et l'étendu du champ de la recherche en ce qui concerne les PAMs et alimentaires, condimentaires et toxiques, nous avons choisi quelques plantes aromatiques et évalué l'activité antibactérienne de leurs HE. Les plantes choisies sont la menthe verte, l'eucalyptus et la cannelle. Dans cette partie, nous allons présenter les caractéristiques générales et les données botaniques des plates choisies.

7-1-Menthe verte

La menthe verte ou menthe crépue, est une plante appartenant au règne des *Plantae*, à la classe des *Magnoliopsida*, à l'ordre des *Lamiales*, à la famille des *Lamiaceae* et au genre *Mentha* et à l'espèce *spicata*. Son nom scientifique est *Mentha spicata*.

C'est une plante vivace cultivée comme plante aromatique, largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques attribuées essentiellement aux polyphénols, dont l'origine est incertaine, mais il s'agit probablement d'un hybride issu de *M. Longifolia* L et de *M. Suaveolens* (EL-Haoud et al., 2018).

Les effets thérapeutiques et les activités biologiques sont divers. La menthe verte est utilisée en effet depuis fort longtemps comme plante médicinale. On lui attribue presque de nombreux les vertus thérapeutiques. Elle est anesthésique, analgésique et tonique générale et elle été rapportée aussi comme remède pour l'inflammation, les fièvres et les hémorragies. Elle est également traditionnellement utilisée contre les affections hépatiques, cardiaques et respiratoires.(Makhloufi, Makhlouf, and Mira 2018).

7-2- Eucalyptus

Eucalyptus camaldulensis, appelé eucalyptus, est originaire d'Australie. Cette plante appartient au règne des *Plantae*, à la classe des *Magnoliopsida*, à l'ordre des *Myrtales*, à la famille des *Myrtaceae* et au genre *Eucalyptus* et à l'espèce *camaldulensis*.

Les noms communs incluent la gomme rouge, la gomme à mâcher rouge, la gomme à mâcher de rivière, la gomme à mâcher rouge. Ses synonymes incluent *Eucalyptus camaldulensis* et *E. rostrata*. Son nom scientifique est *Eucalyptus camaldulensis* et dérive de deux mots grecs eu, appelés bon et Kalypto, qui signifie caché. L'eucalyptus est un arbre à croissance rapide, résistant à la salinité, à la pénurie d'eau, à la sécheresse, à une gamme d'adaptations et d'applications. Il a une large distribution naturelle et possède une variété d'espèces.

L'eucalyptus est une famille sombre (Myrthas). Sa classe est l'Eucalyptus, qui compte 800 espèces dans le monde, mais trois ou quatre espèces se trouvent en Australie. *E.camaldulensis* est un arbre vivace, à tige unique, à gros tronc, de taille moyenne à longue jusqu'à 30 m, bien que signalé dans les rapports de hauteur jusqu'à 45 m. Cet arbre peut durer jusqu'à 1000 ans.(EL-Haoud et al. 2018).



Quant à ses propriétés thérapeutiques, c'est un antiseptique des voies respiratoires, expectorant, analgésique en usage interne et externe, décongestionnant, hypoglycémiant, une action détoxifiante des toxines diphtérique et tétanique, antimicrobien sur les bactéries Gram +, antifongique, anti-inflammatoire, améliore les épreuves fonctionnelles respiratoires, mucolytique, antispasmodique bronchique, fébrifuge, tropisme broncho-pulmonaire très marqué, asséchante en forte proportion. Ses propriétés médicinales sont surtout attribuables à l'eucalyptol (aussi appelé 1,8-cinéole) que renferment ses feuilles. Le 1,8-cinéole que contient l'Eucalyptus s'est révélé être efficace pour réduire la dose de corticostéroïdes utilisée par des sujets souffrant d'asthme et pour combattre le rhume.(Jury et al. 2012)

7-3- Cannelle de chine

Le cannellier est un arbre de la famille des *Lauraceae*, qui pousse dans des régions tropicales. La casse ou cannelle de Chine, *Cinnamomum cassia* Nees ou *C. aromaticum* Nees, originaire de Chine et du Japon, est une espèce voisine qui possède pratiquement les mêmes propriétés thérapeutiques et qui fournit une cannelle de qualité inférieure.(KENZA 2016)

La cannelle de Chine appartient au règne des Plantae, à la classe des *Magnoliophyta*, à l'ordre des *Magnoliopsida*, à la famille des *Laurales* et au genre *Lauraceae* et à l'espèce *Cinnamomum*. Il existe de nombreuses espèces en fonction de leur provenance : cependant la véritable cannelle est la cannelle de Ceylan ou *Cinnamomum zeylanicum* Blume ou *C. verum* Nees produite au Sri Lanka. Ses désignations vernaculaires sont Cannelier (Cannelle) de Ceylan, Cannelier du Sri Lanka (MYRTÉA 2021).

La cannelle de Chine est une des plantes majeures de la médecine traditionnelle chinoise. Ses utilisations ont donné aux chercheurs, l'envie de mettre en évidence Ses propriétés biologiques (Priyanga et al. 2013). Des études in vitro et in vivo chez les animaux et les humains ont démontré de nombreux effets thérapeutiques dont l'effet anti-inflammatoire, antimicrobien, antifongique. Antioxydant, antidiabétique, anticancéreux et anticoagulant. On a également signalé que la cannelle avait des activités contre les troubles neurologiques, comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer(KENZA 2016).



Matériels et méthodes



I. Type, lieu d'étude

Il s'agit d'une étude prospective analytique réalisée au sein du laboratoire de microbiologie et biologie moléculaire de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, sur deux mois, allant de 26 Avril au 30 Juin.

II. Matériels

1. Matériels biologiques

Les tests antibactériens ont été effectués sur deux souches bactériennes isolées de produits carnés, soit *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Ces souches ont été conservées à la température (-80 °C) dans des eppendorfs contenant 1_{ml} du milieu LB + Glycérol.

2. Matériels du laboratoire

Le matériel et le consommable utilisé aussi bien pour l'évaluation de l'activité antibactérienne que pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice, comprend le matériel de stérilisation (autoclave et four pasteur), les étuves, les milieux de culture, la balance, le bain-marie, le réfrigérateur, les boîtes de pétri en verre stériles, le bec benzen, la pince, les micropipettes réglables, les cônes stériles, les pipettes jetables, les microplaques en U, les disques commercialisés de diamètre 6 mm, les tubes eppendorfs et les tubes à hémolyse stériles, les milieux de cultures (PCA, BHI et muller Hinton) ainsi que les solvants (Diméthyle sulfoxyde (DMSO), Ethanol, Agar 0,2%.) (L'annexe1 présente la composition des milieux de culture utilisés).

3. Molécules Bioactives

3.1. Antibiotiques

Les disques d'antibiotiques, utilisés pour les essais de diffusion sont présentés sur le tableau suivant



Tableau 2. : Concentrations critiques et charges des disques (Dubreuil et al. 2020)

Familles	Noms d'antibiotiques	Concentration critiques (mg/L)		Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
		S	R		S	R
Pénicillines	Amoxicilline	8	8	20	19	19
	Amoxicilline-acide clavulaniques	8	8	20-10	19	19
	Ampicilline	Note	Note	2	18	18
Céphalosporines	Cefixime	1	1	5	17	17
	Cefoxitine	Note	Note	30	22	22
Carbapenemes	Imipenème	2	4	10	22	19
Fluoroquinolones	Norfloxacin(<i>E.coli</i>)	0,5	0,5	10	22	22
	Norfloxacin(<i>S.aureus</i>)	NA	NA	10	17	17
Aminosides	Amikacine	8	8	30	18	18
	Gentamicine	1	1	10	18	18
Cephalosporines	Cifoxitine	Note	Note	30	22	22
Macrolides	Erythromocine	1	2	15	21	18

3.2.Plantes étudiées.

Trois HE ont été testées durant notre étude, sont issues de plantes médicinales aromatiques. Il s'agit de *M.spicata*, *C.de chine* et *E.calmodulanesis*.(voir annexe 2)

Ainsi, nous avons collecté les plantes *M.spicata* et *E.calmodulansis*, à l'état frais, nous les avons séchées à l'abri de la lumière, dans un endroit sec et aéré à température ambiante. Ensuite, nous avons procédé à leur extraction. Quant à la plante *Cinnamomum cassia*, on l'a achetée chez l'herboriste sous forme de bâtonnets d'écorce sèche et identifiée comme étant originaire de Chine. Lors de l'extraction des HE, la partie aérienne de la plante est celle utilisée.



4. Méthodes

Quoique les souches aient été identifiées préalablement, nous avons procédé à refaire les tests d'identification microbiologique afin de les maîtriser. Ainsi, après ensemencement sur milieu PCA, et incubation à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24H à, nous avons procédé à la coloration de Gram et à la galerie biochimique classique.

4.1. Tests d'identification

a- Identification par coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle dans laquelle plusieurs colorants sont employés. C'est la coloration de base en bactériologie, elle permet une classification des bactéries selon leur structure, leur forme et leur Gram. Son déroulement technique est présenté en annexe 3.

b- Identification biochimique

Le schéma général suivi pour l'identification biochimique des bactéries est montré en annexe 4.

Ainsi, pour les souches dont le Gram est positif et se présentant en amas, nous avons procédé au test oxydase, catalase, DNase et coagulase. Quant au test ayant un Gram négatif, nous nous sommes basés sur le test oxydase, le test *Orthonitrophényl -D-Galactopyranoside (ONPG)* et le test urée-indole.

➤ Recherche du cytochrome oxydase

Les cytochromes oxydases sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes c. La recherche du cytochrome oxydase est l'un des critères le plus discriminatif et le plus employé pour l'identification des bactéries, surtout celles à Gram négatif. Elle consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée, à oxyder la forme réduite incolore de dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques. Le mode opératoire de la recherche de l'oxydase est présenté en annexe 5. Ainsi, si une bactérie possède l'enzyme respiratoire, appelée cytochrome oxydase, elle peut réaliser la réaction suivante :

Cytochrome oxydase

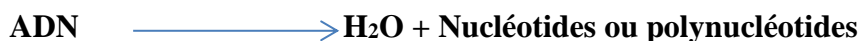


➤ Test de la catalase

Certaines réactions métaboliques aboutissent, dans les conditions de l'aérobiose, à la production du peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée (H_2O_2). Cependant, ce composé produit lors de la chaîne respiratoire, est un poison cellulaire qui doit être éliminé. Sa décomposition dans l'organisme microbien peut être réalisée soit par des peroxydases, soit par la catalase. En l'absence de système enzymatique destructeur, la vie en aérobie devient généralement impossible, les micro-organismes sont alors anaérobies strictes (annexe 6).



DNase



✓ Test coagulase

Le plasma de lapin est un milieu idéal pour la recherche de la coagulase libre de *Staphylococcus aureus*. La production de la coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* des autres souches (*epidermis*, *saprophyticus*, etc.). Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma le plus souvent au cours des 3 premières heures. Dans certains cas, la coagulation est plus légère et plus tardive, mais la réaction ne doit être considérée comme négative que si le phénomène n'intervient pas après la 24^{ème} h (Annexe 11).

4.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction a été réalisée par hydro-distillation (Voir photo en annexe 12). Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes et afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction. La méthode utilisée comprend les étapes ci-dessous.

- 1ère étape : **Préparation du matériel et nettoyage du système.** Pour cela, on pèse 150g du matériel végétal dans un ballon et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à l'immersion de la plante.
- 2ème étape : **Hydro-distillation :** Lors de cette étape, on procède comme suit : On met le ballon sur un bain de sable. Le système refroidissant sera fixé à un support à l'aide d'une pince. L'eau circule dans le réfrigérant et on chauffe jusqu'au l'ébullition pendant 3h. Les vapeurs chargées d'HE et l'eau passent le serpentin de refroidissement où il y aura lieu la condensation, puis la séparation de ce qui résulte l'apparition de deux phases : la phase organique et la phase aqueuse.
- 3ème étape : **Conservation de l'HE.** Celle-ci se fait à l'abri de lumière enveloppé de papier d'aluminium et à une T° entre 2 et 8°C.
- 4ème étape : **Détermination de rendement.** Le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (MHE) et masse de la matière végétale utilisé (Ms). Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt HE} = \frac{\text{VHE}}{\text{MVF}} \times 100$$

Avec : Rdt HE: Rendement en huile essentielle (%)
 VHE : Volume d'huile essentielle (ml)
 MVF: Masse de matériel végétal frais (g)



4.3. Activité antibactérienne vis-à-vis des antibiotiques et des huiles essentielles

Les souches bactériennes choisies et identifiées préalablement ont été revivifiées et repiquées dans la gélose nutritive, puis incubées à la température de développements (37°C) pendant 24 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Ces souches ont été ensuite utilisées pour la préparation de l'inoculum bactérien qui a servi à l'antibiogramme et à l'aromatogramme.

Ainsi, sur gélose nutritive, des colonies identiques des souches bactériennes sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, scellée pendant 24 h. Un volume de 10 ml est déchargé dans une solution saline stérile, la suspension bactérienne est homogénéisée, puis son opacité est réduite à 0,5 McFarland correspondant à 10^8 CFU mL^{-1} . Après cela, la suspension est diluée pour obtenir un inoculum de 10^6 CFU m^{-1} , ces résultats sert pour l'antibiogramme ainsi que pour l'aromatogramme.

a. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité des souches bactériennes a été réalisée par la méthode de disque ou antibiogramme standard. Des disques de papiers buvard imprégnés d'Abs à tester sont déposés à la surface du milieu préalablement préparé. Pour chaque famille bactérienne, un ensemble d'Abs spécifiques a été utilisé.

Ainsi, dans des écouvillons, quelques ml de la suspension bactérienne sont versés et agités, la tige de l'écouvillon est bien essorée contre les bords du tube, la bactérie estensemencée sur le milieu MH par des stries très serrées en 2 passages, en faisant pivoter les boîtes de Pétri de 90° . Les disques d'Abs sont déposés sur la gélose, manuellement, avec une pince métallique stérile. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C .

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition obtenue autour des disques d'antibiotiques à l'aide d'un pied à coulisse, l'absence d'une zone d'inhibition correspond à une résistance bactérienne (Annexe 13).

b. Aromatogramme

La suspension bactérienne, préalablement préparée, est coulée sur chaque boîte. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent de l'inoculum est éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte, les disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (bioMérieux) sont déposés aseptiquement, à raison de 3 disques par boîte. à l'aide d'une pince stérile. Chaque disque est ensuite imprégné d'une quantité de 10 μl des huiles essentielles de différentes concentrations. Ces disques sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Toutes les boîtes de Pétri sont scellées avec du parafilm stérile afin d'éviter l'évaporation éventuelle des HES. Elles sont maintenues à 4°C pendant 1 heure, puis incubées à 37°C pendant 24 heures.



Les résultats des aromatoigrammes sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions, en millimètre et enregistrée en tant que moyenne \pm Erreur standard.

c. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à ensemencer des souches bactériennes en présence d'une gamme de concentration décroissante en HE. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en produit capable d'inhiber la croissance de 90% de la population microbienne.

La méthode de microdilution en bouillon est utilisée pour évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) avec l'utilisation de diméthylsulfoxyde (DMSO) comme émulsifiant, et le chlorure de triphényltétrazolium (TTC) comme indicateur de croissance bactérienne. Du deuxième au douzième puits de la microplaque de 96 puits (Greiner, VWR) 20 μ l de DMSO sont distribués. Plus tard, 40 μ l de l'huile essentielle est ajouté au premier puits de test de chaque ligne de la microplaque, à partir duquel 20 μ l dilution géométrique de base 2 est effectuée à partir du second au 11ème puits. Le 12ème puits était considéré comme un contrôle de la croissance. Puis, 160 μ l de bouillon Mueller Hinton (BMH) est ajouté dans tous les puits. Par la suite, 20 μ l d'une suspension bactérienne à 10⁶ UFC.ml⁻¹ sont ajoutés à chaque puits. Après 18 heures d'incubation à 37°C, la lecture est effectuée par l'ajout de 10 μ L indicateur coloré le TTC dilué dans de l'eau distillée stérile à l'ordre de 0,2 g.ml⁻¹, suivit d'une incubation pendant 10 min à 37°C. Le TTC révèle la présence de bactéries vivantes par l'apparition d'une coloration rouge (Sadiki et al. 2014 ; Fadil et al, 2018).

d. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide(CMB)

La CMB ou Concentration Minimale Bactéricide est la concentration de l'antibiotique la plus faible permettant de détruire 99.99% des bactéries présentes au départ, soit une bactérie survivante sur 10000. Ainsi, si la CMB < 5 CMI, l'antibiotique est très efficace. Au contraire si la CMB > 10 CMI, on le considère peu efficace("Antibiogramme (CMB)," n.d.).

La technique utilisée pour déterminer la CMB consiste à ensemencer une gélose nutritive à partir des puits de la gamme qui ne présentant pas une croissance visible. Pour chaque puits négatif, on dépose 10 μ L à la surface d'une gélose nutritive que l'on étale sous forme d'une strie unique et on l'incube à 37°C pendant 24h.

e. Analyse des résultats

Grâce au logiciel Excel version (2016), nous avons déterminé les pourcentages des données étudiées.

Résultats

Notre étude réalisée dans le cadre de l'évaluation de l'activité antibactérienne des Ab et des HE sur des souches isolées de produits carnés. Dans un premier temps, nous allons étaler les résultats relatifs au rendement des HE. Ensuite, nous allons présenter les résultats relatifs à l'antibiogramme et à l'aromatogramme.

1. Rendement

L'opération d'extraction des HE des trois plantes a permis d'avoir des rendements allant de 0,292 % à 1%. Comme le montre le tableau suivant, *Eucalyptus camaldulensis* a montré un rendement de 1%.

Tableau 3 : Rendement en huile essentielle

HE	Rendement
<i>Mentha Spicata</i>	0,354%
<i>Cinnamomum cassia</i>	0,292%
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	1%

2. Etude de la résistance des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques

Un total de neuf Abs appartenant à différentes familles a été utilisé pour tester la sensibilité des deux souches. En se rapportant aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM 2021), nous avons classé les souches en résistante (R) et sensibles (S). Le tableau suivant présente les résultats trouvés ((Voir photos en annexe 14).

Tableau 4: Résultats de l'antibiogramme

Familles	Antibiotiques	Souches	
		<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
Carbapeneme	Etrapeneme	S (31mm)	ND
Fluoroquinolonne	Norfloxacin	R	S (32mm)
Péniciline	Ampicilline	ND	R
	Amoxiciline	R	ND
	Amoxiciline / acide clavulanique	R	ND
Aminoside	Amikacine	R	ND
Macrolide	Erythromycine	ND	R
Cephalosporine	Cefexime	R	R
	Cephoxitine	ND	S (23mm)

ND : non déterminé



Ainsi, *E.coli* a montré une résistance vis-à-vis de cinq antibiotiques, soit la Norfloxacin, l'Amoxicilline, l'Amoxicilline/acide clavulanique, l'Amikacine et la Cefexime. Cependant, elle a montré une susceptibilité à l'Etrapepne.

Pour *S.aureus*, nous avons noté qu'il présente une sensibilité vis-à-vis de la Norfloxacin et de la Cefoxitine, et une résistance à l'Ampicilline, à l'Erythromycine et à la Cefexime.

3. Sensibilité aux HE testées

3.1.Aspect qualitatif

Comme présenté dans le tableau suivant, les résultats relatifs à l'aspect qualitatif des HE testées ont montré une sensibilité des souches testées vis-à-vis des 3 HE. Par ailleurs, l'HE de cannelle a montré une bonne efficacité sur les deux souches testées, le diamètre d'inhibition (D) exprimé en mm était de 23 pour *E.coli* et de 35 pour *S.aureus*. L'huile de la menthe a inhibé la croissance d'*E.coli* avec un diamètre d'inhibition de 16 mm et celle de *S.aureus* de 22mm, alors que l'huile d'eucalyptus a montré une efficacité moindre que les deux autres huiles. Le diamètre d'inhibition est de 11 mm pour *E.coli* et de 19 mm pour *S.aureus*. (Voir photos en annexe 15).

Tableau 5 : Aspect qualitatif des HE, exprimé en diamètre d'inhibition

Diamètres Souches	D(mm) <i>Mentha Spicata</i>	D(mm) <i>Cinnamomum Cassia</i>	D(mm) <i>Eucalyptus camaldulensis</i>
<i>E.coli</i>	16	23	11
<i>S.aureus</i>	22	35	19

3.2.Aspect quantitatif

Pour l'aspect quantitatif, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles testées. Les résultats trouvés sont présentés dans le tableau suivant.



Discussion

Les viandes et les produits carnés sont des aliments très périssables, fréquemment associés aux toxi-infections alimentaires collectives. Au Maroc, 1533 cas de toxiinfection alimentaire ont été déclarés en 2006 et l'origine carnée a été souvent incriminée. Des études antérieures ont rapporté des épidémies d'infections à *E.coli* liées à des contacts avec des bovins et des ovins ou à la consommation de viande bovine ou ovine insuffisamment cuites. La contamination de la viande débute à l'abattoir, et se poursuit pendant les opérations de désossage et de la préparation de la viande au niveau des boucheries. En effet, l'opération de hachage favorise la distribution des bactéries de la surface des viandes dans le produit et la libération du suc musculaire très riche en substances nutritives. La conséquence de ces contaminations serait évidemment des produits de mauvaise qualité hygiénique, des toxi-infections alimentaires graves et des pertes économiques sérieuses.(chapman , Cornell 2000).

Par ailleurs, en raison de plusieurs facteurs tels que le mauvais usage et la surconsommation des antibiotiques aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, le défaut d'hygiène, le non-respect des bonnes pratiques et la pollution de l'environnement, on assiste à un développement de la résistance des bactéries pathogènes (Berrada S., 2016b).

Notre étude réalisée dans le cadre de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels extraits de plantes médicinales, a consisté à évaluer la sensibilité de souches bactériennes isolées de produits carnés vis-à-vis des AB et de certaines HE. Les huiles testées étant l'huile de la menthe, de cannelle et celle d'eucalyptus. Ainsi, nous avons procédé à l'extraction d'HE à partir des plantes choisies ensuite nous avons évalué leur aspect qualitatif et quantitatif.

Ainsi, après extraction par hydro-distillation, nous avons déterminé le rendement des 3 huiles. Nous avons noté que le rendement de l'HE de *mentha spicata* est de (0,54%). Ce rendement est supérieur à celui obtenu par d'autres auteurs, soit 0,09% (Selles et al. 2018). Pour l'HE de *Cinnamomum cassia*, nous avons noté un rendement de 0,292%. Ce rendement est relativement plus faible que celui trouvé par BOUNGAB Karima, TADJEDDINE Aicha et al (2014). et qui est de 1,5%. Concernant le rendement de l'HE de l'*Eucalyptus camaldulensis*, il est de 1%. Il est plus faible à celui trouvé par Jean-Maurille Ouamba et al qui était de l'ordre de 3,59% (Belline et al. 2019). La variation des résultats relatifs au rendement, pourrait être attribuée non seulement à l'origine de la plante, mais aussi aux origines génétiques ayant évolué en raison des différences géographiques, environnementales et également à la période de la cueillette de la matière végétale (Selles et al., 2018).



En ce qui concerne l'activité antibactérienne des HE et des antibiotiques, elle a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'huile ou l'Ab à tester vis-à-vis de deux souches bactériennes ayant des caractéristiques morphologiques et biochimiques différentes, soit une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche *Escherichia coli*.

Les souches testées ont montré une résistance importante à la quasi-totalité des Abs testés. La souche d'*E.coli* a montré une forte résistance à l'Amoxicilline, l'association Amoxicilline acide clavulanique, à l'Amikacine et à la Cefexime. Ces résultats sont proches à ceux de H. Gonsu Kamga, S. Koulla Shiro, Z. Sando et al (Kamga et al. 2014) qui avaient noté une résistance élevée vis-à-vis Amoxicilline Acide clavulanique. De sa part, Mersier et al, a constaté une résistance de l'*E.coli* à l'Amoxicilline acide clavulanique (64%)(Merisier 2018). Cette résistance d'*E. coli* à l'Amoxicilline pourrait être expliquée par l'utilisation abusive et incontrôlé de ce type d'antibiotique (Amatiste et al. 2014)

La résistance d'*E.coli* à l'Acide clavulanique pourrait s'expliquer par une baisse de l'activité de l'inhibiteur des bêta-lactamases, résultante d'une hyperproduction de pénicillinases, ou de l'inactivation de l'inhibiteur lui-même. En revanche, nos résultats se rapportant aux céphalosporines (Cefexime) ne concordent pas avec ceux de Karma et al , (Kamga et al. 2014).

En ce qui concerne les *S.aureus*, ils ont montré une résistance assez importante à l'Ampicilline, à la Cefexime, à l'Erythromycine. Par ailleurs, ils restent sensibles au Norfloxacine et à la Cefoxitine. Ces résultats sont en concordance avec ceux de retrouvés par Boisset et al (Boisset 2020).

Pour l'évaluation du potentiel antibactérien qualitatif de nos huiles, les résultats obtenus à partir de l'aromatogramme ont montré que les HE pures possèdent une activité antibactérienne très importante sur les deux bactéries étudiées. Il s'est avéré que les bactéries testées ont été sensibles vis-à-vis de l'huile de cannelle de chine. Les diamètres d'inhibition sont de l'ordre de 23mm pour *E.coli* et 35mm pour *S.aureus*. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui ont démontré que l'huile de cannelle a un pouvoir antibactérien important (Picardie et al. 2014). Cette activité pourrait être due au constituants majoritaires de l'HE de *C.cassia* , soit Cinamaldéhyde, qui semble inhiber la production d'enzymes par les bactéries et / ou causer des dommages à la paroi des bactéries. Le cinémaldéhyde fait partie des aldéhydes les plus actifs contre les bactéries Gram positif et Gram négatif , y compris les levures et les champignons (Picardie et al. 2014).

L'huile essentielle de *M. spicata* a présenté une activité inhibitrice moyenne vis-à-vis de toutes les souches testées. Le diamètre des zones d'inhibition oscille entre 16mm et 22mm. Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu avec *S. aureus* (22mm). Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Zidi et al, (2015). Par comparaison entre les résultats, il en ressort que les bactéries Gram positifs sont plus sensibles à l'action de l'huile essentielle de la menthe verte que les bactéries Gram



négatif, même si la sensibilité de ces dernières n'est pas négligeable. Ceci pourrait être lié à la structure de la paroi cellulaire (Chebaibi et al. 2016). En effet, les souches Gram négatif possèdent une paroi constituée d'une membrane externe hydrophile qui empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes composant la majorité des huiles essentielles (Amatiste et al. 2014). Cette caractéristique confère aux bactéries Gram négatives une résistance ou bien une sensibilité moins importante à la majorité des HE par rapport aux bactéries Gram positif

Ce pouvoir antibactérien pourrait être attribué à la présence des monoterpènes oxygénés et des hydrocarbures monoterpéniques dont la carvone, le cis-dihydrocarvéol, le limonène et le 1,8- cinéole qui représentent généralement les composés principaux de l'HE de *Mentha spicata* (Boukhebt et al. 2011). Pour l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*, elle a montré qu'elle possède une activité inhibitrice contre nos souches, avec des diamètres de 11mm pour *E.coli* et de 19mm pour *S.aureus*. Ce résultat est similaire à celui de Bachir Raho Ghalem et Benali Mohamed (Raho, Mohamed, and Pharmacol 2008). Cependant, il ne concorde pas avec celui de Badr Satrani et al (Farah et al. 2001).

Pour l'huile essentielle de *Eucalyptus camaldulensis*, cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'activité ne croit pas toujours avec l'élévation de la quantité de l'HE déposée. L'activité semble ne pas être dose dépendante. Ceci pourrait s'expliquer d'une part par la dissolution plus ou moins bonne, d'autre part par la diffusion ou la charge des boîtes de pétri (condition d'absorption des germes par la gélose), ou encore la composition de l'HE (Traore et al. 2013).

En plus de l'activité anti bactérienne qualitative, une étude quantitative de ces huiles a été réalisée. Les HE présentent un profil de sensibilité important, vis-à-vis des agents oxydants.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les trois HEs inhibent la croissance des souches avec des degrés de sensibilité différents. En fonction des souches, on constate, d'un côté une très grande sensibilité pour *S.aureus* avec des CMI égales à 100% pour la menthe, 12,5 % pour Eucalyptus et 6, 25% pour cannelle. Et de l'autre côté une sensibilité inférieure de la part de *E.coli* avec des CMI de 25% pour la *M .spicata*, 12,5 % pour *E. camaldulensis* et 3,125% pour la Cannelle de chine, mais les trois HE exercent toujours une inhibition notable.

En ce qui concerne les résultats de *M.Spicata*, ils concordent avec ceux de Yasser Shahbazi, soit 5µL /ml (Shahbazi et al. 2015).

Les résultats de notre étude ont révélé que l'huile essentielle de *M. Spicata* présentait un effet antibactérien modéré contre les souches testées. Les bactéries Gram positif étaient plus sensibles aux trois HE que les bactéries Gram-négatif. La faible sensibilité des bactéries à Gram négatif pourraient être attribuées à la présence de lipopolysaccharide, agent hydrophobe dans leur membrane externe, ce qui offre une protection contre différents agents (Shahbazi et al. 2015).



Les concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles testées, ont montré que les valeurs étaient égales ou proches de celles de la CMI, indiquant une bonne activité bactéricide des huiles essentielles testées.



Conclusion, recommandations et perspectives

En guise de notre recherche, nous pouvons conclure que :

- Le rendement des HE après extraction, est de 0,292% pour *C.Cassia*, de 0,354 pour *M.Spicata* et de 1% pour l'*E.Calmodulensis*.
- En ce qui concerne l'aspect qualitatif de ses HE étudiées, on a noté une efficacité de *C.cassia* et un pouvoir bactéricide sur *E.coli* avec une CMI de 3.125%.
- L'HE de la menthe, a montré un effet bactéricide vis à vis de *E.coli* et bactériostatique pour *S.aureus*
- L'HE d'eucalyptus a permis de noter une CMI de 12,5% et une action bactériostatique pour les 2 souches étudiées.

Suite à notre étude, il serait intéressant de :

- Sensibiliser la société sur l'arrêt de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques et de ne les utiliser qu'après prescription médicale.
- Rechercher de nouveaux agents d'origine naturelle tels que les HE.

En perspective, il serait utile de :

- Mener une étude sur la composition chimique des HE testées ;
- Étudier la toxicité des HE ayant prouvé leur efficacité ;.
- Étudier l'effet synergique HE-AB.

- AFSSAPS. 2008. "Recommandations Relatives Aux Critères de Qualité Des Huiles Essentielles," 18.
www.afssaps.sante.fr.
- Aguilera-Carbo, Antonio, Christopher Augur, Lilia A. Prado-Barragan, Ernesto Favela-Torres, and Cristóbal N. Aguilar. 2008. "Microbial Production of Ellagic Acid and Biodegradation of Ellagitannins." *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>.
- Amatiste, Simonetta, Daniele Sagrafoli, Giuseppina Giacinti, Giulia Rosa, Virginia Carfora, Nicla Marri, Andreana Tammaro, Emanuela Bovi, and Remo Rosati. 2014. "Antimicrobial Activity of Essential Oils against Staphylococcus Aureus in Fresh Sheep Cheese." *Italian Journal of Food Safety* 3 (3): 148–50.
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1696>.
- ANSES. 2011. "Fiche de Description de Danger Biologique Transmissible Par Les Aliments: Staphylococcus Aureus." *ANSES Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail*, no. 1: 1–4. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0117Fi.pdf>.
- "Antibiogramme (CMB)." n.d.
- Arvieux C., (1998). Les toxi-infections alimentaires. *Digest*, 14 (6), 4-16.
- Ballin, Nicolai. 2010. "Authentication of Meat and Meat Products." *Meat Science*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>.
- Belline, Ndzeli Likibi, Tsiba Gouollaly, Mabika Aimé Bertrand Madiélé, Nsikabaka Arnaud Wilfrid Etou , Ossibi Samuel, and Ouamba Jean-Maurille. 2019. "Profils Chimiques Communs Des Huiles Essentielles D' Eucalyptus Citriodora Hook . (Myrtaceae) Et De Cymbopogon Common Chemical Profiles of Essential Oils From Eucalyptus Citriodora Hook . (Myrtaceae) and Cymbopogon Nardus (L .)." *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences.*, 363–73.
- Benouda, A, and S Elhamzaui. n.d. "Staphylococcus Aureus : Epidemiologie Et Prevalence Des Souches Resistantes a La Methicilline (Sarm) Au Maroc. Staphylococcus Aureus : Epidemiology and Prevalence of Methicillin Resistant Strains in Morocco." *Rev Tun Infectiol, Janvier 09*: 15–20.
- Berrada S, Bennani L, Chahbi A, Sqalli HT, EL Ouali Lalami A, Benjelloun T G, Squali H FZ., (2016a). Effet antibactérien de deux huiles essentielles (*Thymus capitatus* et *Lavandula officinalis*) du centre nord du Maroc sur des souches isolées d'un centre d'hémodialyse de la ville de Fès. *International Journal of Innovation and Applied Studies.*, 17(2): 639-645.
- Berrada Sanae. 2016b. Gestion du risque infectieux en hémodialyse par la mise en place d'une démarche qualité : Cas du centre d'hémodialyse de l'hôpital Al Ghassani. THESE de DOCTORAT. Formation Doctorale : MOLECULES BIOACTIVES SANTE BIOTECHNOLOGIE (MBSB). Spécialité : Microbiologie-Biologie moléculaire. Faculté des Sciences Dhar El Mahraz. Fès, 14 Mai 2016.



Annexe

Annexe 2 : Photos des plantes étudiées.



*Eucalyptus
Camaldulensis*



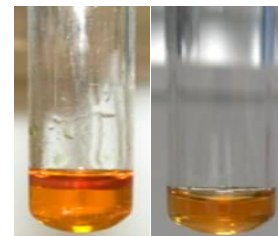
Mentha Spicata



Cinnammum Cassia

Annexe 9: Test indole

On ajoute une goutte de Kovacs au milieu urée-indole, préalablement ensemencé par l'isolat purifié. Si formation d'un anneau rouge, le test indole est positif ; Si absence d'un anneau rouge, le test indole est négatif.



Indole +

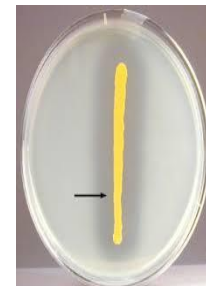
Indole -

Annexe 10: Test DNase

A partir d'une culture purifiée identifiée *Staphylococcus*, on ensemence par épuisement le milieu Gélosé à l'acide désoxyribonucléique à l'aide d'une anse à fil droit, on incube à 37°C pendant 24 h. Si après addition de l'acide chlorhydrique, la zone autour de la strie est claire, la souche est DNase (+).



DNase -



DNase +

Annexe 11: Test coagulase

Après une étape d'enrichissement sur milieu BHI de l'inoculum de *Staphylococcus* préalablement identifié et confirmé DNase+, on prélève 0,5 ml de ce dernier, et on l'ajoute à 0,5 ml du plasma de lapin et on incube à 37±1°C pendant 24 H. Si la coagulation se produit dans les 24 H, la souche de *Staphylococcus* est coagulase positive.



Coagulase +



Coagulase -



Annexe 12: Montage d'une hydro-distillation.



Annexe 13 : Lecture de l'antibiogramme

