

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

Présenté par :

KHATIR MOHAMED EL AMINE

En vue de l'obtention

Du diplôme de **master en Biologie**

Option : **Microbiologie appliquée**

**Contribution à l'étude de la conservation du lait cru par
l'utilisation d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

soutenu le : 10/07/2021

Devant le jury :

Président:	Pr. TERRAS M.	Universités Dr Moulay Tahar Saida
Encadrant:	Dr. AMMAM A.	Universités Dr Moulay Tahar Saida
Examineur:	Pr. BERROUKECH A.	Universités Dr Moulay Tahar Saida

Année Universitaire 2020-2021

Résumé

Cette étude a été menée dans le but de démontrer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* récoltée dans la région de Saida. Et son utilisation comme agent bioconservateur du lait cru de vache. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation de type Clevenger, le rendement obtenu est équivalent à 1.25%.

la méthode de puits montre une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries testées : *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* avec des zones d'inhibition respectivement de 17mm, 14mm, 12 mm, tandis que *P. aeruginosa* s'est révélée résistante.

Les résultats d'analyses physiques et chimiques sur le lait additionné de l'huile essentielle révèlent que sa présence a permis de ralentir l'altération du lait.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, activité antibactérienne, bioconservateur, hydrodistillation, le lait.

Summary

This study was conducted to demonstrate the antibacterial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* harvested in the region of Saida. And their use as a bioconservative agent of raw cow's milk. The essential oil was extracted by Clevenger type hydro distillation, the yield obtained is equivalent to 1.25%.

The well method shows an antibacterial activity towards the tested bacteria: *B. subtilis* , *S. aureus*, *E. coli* with inhibition zones of 17mm, 14mm, 12mm respectively, while *P. aeruginosa* proved to be resistant.

The results of physical and chemical analysis on the milk added with the essential oil reveal that its presence has slowed down the alteration of milk.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, antibacterial activity, bioconservative, hydrodistillation, milk.

ملخص

أجريت هذه الدراسة بهدف توضيح النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لنبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* الذي تم جمعه في منطقة سعيدة. واستخدامه كحافظ حيوي لحليب البقر الخام. تم استخلاص الزيت الأساسي عن طريق التقطير المائي من نوع Clevenger ، والعائد الذي تم الحصول عليه يعادل 1.25٪ . أظهرت طريقة البئر نشاطاً تجاه البكتيريا المختبرة : *B. subtilis* ، *S. aureus* ، *E. coli* مع مناطق تثبيط على التوالي 17 مم ، 14 مم ، 12 مم ، بينما *P. aeruginosa* كانت مقاومة.

كشفت نتائج التحاليل الفيزيائية والكيميائية على الحليب المضاف له الزيت الاساسي أن وجوده أبطأ من فساد الحليب.

الكلمات المفتاحية : إكليل الجبل ، نشاط مضاد للجراثيم ، محافظ حيوي ، تقطير المائي ، حليب.

Remerciements :

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans l'aide de Dieu qui nous a donné volonté, courage et surtout patience, puis celle de toutes les personnes qui y ont contribuées de près et de loin.

Nos sincères remerciements s'adressent à :

*Notre promoteur Dr **AMMAM Abdelkader**, d'avoir été présent durant toutes les étapes de notre travail. Ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail.*

*C'est avec un grand plaisir que nous adressons nos remerciements aux **jurys Pr TERRAS M et Pr BERROUKECH A.** pour l'honneur qu'ils nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.*

*Un sincère merci pour le personnel du laboratoire **GIPLAIT** ainsi **Mme Asma AMOUR** et tous nos enseignants du département.*

En fin, Nous tenons aussi à remercier chaleureusement nos parents, frères et sœurs ainsi que tout nos proches de nous avoir soutenus lors de nos études.

Dédicaces :

Nous dédions ce modeste travail, comme preuve de respect, de gratitude, et de reconnaissance à :

Nos chers parents :

Qui n'ont jamais cessé de nous encourager et nous conseiller, Ils nous ont beaucoup aidé tout au long de notre chemin, grâce à leur amour, leur compréhension, leurs sacrifices, leur tendresse, leurs prières et leur patience sans jamais nous quitter des yeux ni baisser les bras et leur soutien moral et matériel, on ne saurait jamais traduire ce qu'on ressent vraiment envers eux.

Nos chers frères et sœurs :

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, pour leur indulgence en notre faveur qu'ils touchent ici l'affection la plus intime qu'on ressent à leur égard.

Nos amis et collègues :

Merci pour toutes ces images qui resteront gravées dans nos mémoires

Pour leur compagnie et bons moments passés ensemble

Et tous ceux qui nous sont chers...

Merci d'être toujours là pour nous.

Que Dieu vous garde.

Liste des figures :

Figure 01 :	Monoterpène.	24
Figure 02 :	Sesquiterpène.	24
Figure 03 :	Dispositif d'hydrodistillation en montage Clevenger.	25
Figure 04 :	Montage d'extraction par distillation à vapeur saturée.	26
Figure 05 :	Procédé d'hydrodiffusion.	27
Figure 06 :	Procédé d'extraction par CO2 supercritique.	27
Figure 07 :	Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-onde.	28
Figure 08 :	Procédé d'extraction par solvant.	29
Figure 09 :	Descriptif de la fleur de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	34
Figure 10 :	La cinétique d'extraction d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	47
Figure 11 :	Représentation graphique de sensibilité des souches.	48
Figure 12 :	Variation de l'acidité de Dornic en fonction du temps de stockage à une température de 4°C.	52
Figure 13 :	Variation du pH en fonction du temps de stockage à une température de 4°C.	52

Liste des tableaux :

Tableau 01 :	Composition moyenne du lait entier.	06
Tableau 02 :	Classification des protéines.	08
Tableau 03 :	Classification des protéines du lactosérum.	09
Tableau 04 :	Composition minérale du lait de vache.	09
Tableau 05 :	Composition vitaminique moyenne du lait cru.	10
Tableau 06 :	Caractéristiques des principaux enzymes du lait.	11
Tableau 07 :	Caractéristiques organoleptiques du lait.	11
Tableau 08 :	Flore originelle du lait cru.	14
Tableau 09 :	Germes contaminant le lait cru.	15
Tableau 10 :	Position systématique du romarin.	33
Tableau 11 :	Variation de la composition chimique (%) de l'huile essentielle de romarin en fonction de l'origine géographique de la plante.	35

Liste des photos:

Photo 01:	Dessiccation des parties aériennes dans l'étuvé à 40°C.	39
Photo 02:	Montage d'hydro distillation de type Clevenger.	39
Photo 03:	L'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	39
Photo 04:	Conservation de l'huile essentielle au réfrigérateur à 4°C.	39
Photo 05:	Gélose Muller Hinton dans les boites de pétri à 4mm.	43
Photo 06:	Ensemencement à partir de l'inoculum bactérien en nappe.	43
Photo 07:	Technique de puits dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne.	43
Photo 08:	Prélèvement de lait.	43
Photo 09:	Préparation des flacons de lait pour la bio conservation.	44
Photo 10:	Dépôt de l'huile essentielle dans le les flacons de lait.	44
Photo 11:	PH-mètre.	45
Photo 12:	Mesure de l'acidité de Dornic.	45
Photo 13:	La quantité en huile essentielle extraite par rapport à la quantité de la plante initiale.	46
Photo 14:	Zone d'inhibition chez <i>Escherichia coli</i> (technique de puits).	51
Photo 15:	Zone d'inhibition chez <i>Staphylococcus aureus</i> (technique de puits).	51
Photo 16:	Zone d'inhibition chez <i>Bacillus subtilis</i> (technique de puits).	51
Photo 17:	Zone d'inhibition chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (technique de puits).	51

Sommaire

Introduction.....	01
C .Chapitre 01: Le lait de vache.....	03
I.1.Filière laitière en Algérie.....	03
I.2.Définition de lait.....	03
I.3.Importance et valeur nutritionnelle du lait de vache.....	04
I.4.Composition.....	05
➤ Eau.....	06
➤ Matière grasse.....	06
➤ Les glucides.....	07
➤ Les lipides.....	07
➤ Les protéines.....	07
➤ Les minéraux.....	09
➤ Les vitamines.....	09
➤ Les enzymes.....	10
I.5.Qualité du lait.....	11
I.5.1.Qualité organoleptique du lait cru.....	11
I.5.2.Qualité physique et chimique du lait cru.....	12
➤ La densité.....	12
➤ L'acidité de titrable ou acidité Dornic.....	12
➤ Le pH.....	12
➤ Point de congélation.....	13
➤ Point d'ébullition.....	13
I.5.3.La qualité microbiologique.....	13
➤ Flore original.....	13
• les bactéries lactiques.....	14
➤ Flore de contamination.....	14

➤ Flore d'altération Bactéries de type coliforme.....	15
• Bactéries de type coliforme.....	15
• Levures et moisissures.....	16
➤ Flore pathogène.....	16
• Bactéries infectieuses.....	16
✓ <i>Salmonelles</i>	16
✓ <i>Listeria</i>	17
✓ <i>Campylobacter</i>	17
• Bactéries toxinogènes.....	18
✓ <i>Staphylocoques</i>	18
✓ <i>Escherichia coli</i>	19
✓ Les <i>clostridies</i> sulfito-réducteurs.....	19
I.6.Principales activités des micro-organismes dans le lait.....	19
➤ Acidification.....	19
➤ Protéolyse.....	20
➤ Lipolyse.....	20
I.7.Evolution et altération du lait de vache.....	20
➤ Phase bactériologique ou de latence.....	21
➤ Phase d'acidification.....	21
➤ Phase de neutralisation.....	21
➤ Phase d'alcalinisation.....	21
I.8.Conservation du lait à la ferme.....	21
II .Chapitre 02 : les huiles essentielle et généralités sur le romarin.....	23
II.1.Définition de l'huile essentielle.....	23
II.2.La composition des huiles essentielles.....	23
➤ Composés terpéniques.....	23
• Les monoterpènes.....	23
• Les sesquiterpènes.....	24
➤ Les composés aromatiques.....	24
II.3.Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	24

➤ Hydrodistillation.....	25
➤ Hydro-diffusion.....	26
➤ Extraction au CO ² supercritique.....	27
➤ Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	27
➤ Extraction par solvants volatils	28
II.4.L'huile essentiel dans l'industrie agro-alimentaire.....	29
II.5.L'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	30
II.6.Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	30
II.7.L'effet de la composition chimique des huiles essentielles sur l'activité antimicrobienne.....	31
II.8.Historique du <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
II.9.Origine et aire géographique.....	32
II.10.Etymologie.....	32
II.11.Classification botanique.....	33
II.12.Description botanique.....	34
II.13.Composition chimique de la plante.....	35
II.14.Composition chimique du huile essentielle.....	36
La partie expérimentale	37
I. Lieu et période de travail.....	37
II. Matériel et méthode.....	37
II.1 Matériel végétale.....	37
II.2 Matériel au laboratoire.....	37
II.3 Méthode d'extraction d'huile essentielle.....	38
➤ Le protocole d'extraction de l'huile essentielle.....	38
➤ Le rendement de l'huile essentielle.....	40
➤ Suivi de la cinétique d'extraction.....	40
II.4 Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	40
➤ Le protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	41
➤ Lecteur des résultats.....	42

II.5 Les huiles dans le processus de la bioconservation.....	42
➤ Échantillonnage du lait.....	42
➤ Préparation de l'huile essentielle pour la bioconservation.....	42
➤ Analyses du lait cru pendant la conservation.....	44
➤ Analyses physico-chimiques.....	44
➤ pH.....	44
➤ Acidité de Dornic.....	44
III.1 Résultats et discussion.....	46
➤ Rendement.....	46
➤ La cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....	47
➤ L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du	48
<i>Rosmarinus officinalis</i>	
➤ Les analyses du lait cru pendant la conservation.....	52
Conclusion.....	54
Liste des références.....	55
Annexes.....	63

Introduction :

En Algérie le lait revêt un caractère hautement stratégique. En effet, il occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens.

Le lait est un aliment très périssable. En effet, son pH, voisin de la neutralité, le rend très facilement altérable par les micro-organismes et les enzymes. Sa richesse et sa fragilité en font un milieu idéal où de nombreux microorganismes comme les moisissures, les levures et les bactéries se reproduisent très vite. Ses vitamines et ses matières grasses peuvent s'altérer sous l'influence de la lumière, de l'oxygène, du cuivre ou de l'échauffement (**Dossou et al., 2006**).

Les industries alimentaires utilisent des substances de type additif alimentaire pour assurer la conservation de leur produits, ces substances peuvent être synthétique (nature chimique), qui provoque avec le caractère d'accumulation et par le temps des dégâts sur la santé des consommateurs. La tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances (**Essawi et Srour, 2000**).

Des études ont été menées sur le développement des nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire. Les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires, ils sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires (**Mouna, 2015**).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail qui a pour objectif la recherche de nouvelles substances naturelles d'origine végétale à activité antibactérienne notamment contre les bactéries d'altération pour but d'augmenter la durée de conservation du lait.

Le présent travail comporte deux parties :

➤ L'une bibliographique, qui aborde des généralités sur le lait , la filière de lait en Algérie, la microbiologie du lait , les principales informations sur l'espèce étudiée, notions générales sur les huiles essentielles.

➤ L'autre pratique, ou seront développés successivement les objectifs de cette étude, la méthodologie adoptée et matériel, l'analyse des résultats obtenus et leur discussion. Enfin le manuscrit se terminera par une conclusion générale.

I. Chapitre 1 :Le lait de vache

I.1.Filière laitière en Algérie:

Les algériens consomment plus que la moyenne mondiale en matière de lait. En effet, le Directeur général de l'Office national interprofessionnel du lait (ONIL) Mourad Alim, a fait savoir, que, la consommation annuelle des algériens de ce produit est estimée à 145 litres par an, alors que, la moyenne mondiale fixée par la FAO est de 90 litres/an par citoyen **(Arezki B.,2018)**.

Ainsi, les algériens consomment quelques 55 litres/an de plus que les autres pays du monde. Par ailleurs, le Directeur général de l'ONIL a indiqué que, la consommation annuelle de lait en Algérie est de 5 milliards de litres, dont 3.5 milliards de litres produites localement, tandis que, le gap de 1.5 milliards de litres, est importé sous forme de poudre de lait subventionnée transformée en par les laiteries en lait de sachet **(Arezki B.,2018)**.

Selon M. Alim, la facture de l'importation par l'ONIL des 200 000 tonnes de poudre de lait, est estimée à 400 millions de Dollars. l'Algérie est considérée comme le deuxième plus gros importateur de poudre de lait dans le monde après la Chine **(Arezki B.,2018)**.

I.2.Définition du lait :

Le lait est un produit élaboré par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. Il s'agit d'un liquide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, d'une saveur douceâtre et d'un PH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité **(Larousse agricole, 2002)**.

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes **(Aboutayeb, 2009)**.

Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache **(Larpent, 1997)**.

I.3.Importance et valeur nutritionnelle du lait de vache :

Le lait est le seul aliment du jeune mammifère pendant la première période de sa vie. Les substances qu'ils contiennent lui fournissent l'énergie et les matériaux de construction nécessaires à sa croissance (**Anonyme, 2000**).

La haute qualité nutritionnelle des protéines du lait repose sur leur forte digestibilité et leurs compositions particulièrement bien équilibrée en acides aminés indispensables(**Debry, 2001**).

Le lait contient également les anticorps qui protègent le jeune mammifère contre l'infection. Un veau a besoin de 1 000 litres de lait pour sa croissance ; c'est la quantité que la vache primitive produit pour chaque veau (**Anonyme, 2000**).

Le lait joue aussi un rôle très important dans l'alimentation humaine, à la fois sur un niveau calorique ou nutritionnel. Un litre de lait correspond à une valeur d'environ 750 Kcal facilement utilisable, ce qui fait de lui un élément de haute valeur nutritionnelle(**Leroy, 1965**).

En effet, le lait est :

- Une source de protides d'excellentes valeurs biologiques.
- La principale source de calcium.
- Une source de matière grasse.
- Une bonne source de vitamines (**Leroy, 1965**).

Le lait est également une excellente source de minéraux intervenant dans divers métabolismes humains à la fois comme cofacteurs et régulateurs d'enzymes. Il assure aussi un apport non négligeable en vitamines connues comme les vitamines A, D, E (liposolubles) et les vitamines B1, B2, B3 (hydrosolubles). Néanmoins, le lait est pauvre en fer, en cuivre et il est dépourvu de fibres (**Cheftel et Cheftel, 1996**).

I.4.COMPOSITION :

Les principaux constituants du lait par ordre croissant sont :

- + L'eau, très majoritaire.
- + Les glucides, principalement représenté par le lactose.
- + Les lipides, principalement les triglycérides rassemblent en acide gras.
- + Les sels minéraux à l'état ionique et moléculaire.
- + Les protéines caséines rassemblée en micelle, albumine et globuline solubles.
- + Les éléments a l'état de trace mais au rôle biologique important, enzymes vitamines et oligo-élément.(**Pogheon et Goursaud, 2001**).

Le lait est constitué de quartes phases, rappel:

- + Une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamine liposolubles (A et D).
- + Une phase colloïdale qui est une suspension de caséine sous forme de micelle.
- + Une phase aqueuse qui contient les constituants solubles de lait (protéine solubles, lactose, vitamine B et C, sels minéraux, azote non protéique).
- + Une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de co₂ dissous qui représentent environ 5% du volume du lait (**Fredot E., 2006**).

Tableau 01 : Composition moyenne du lait entier (FREDOT E., 2006).

Composants	Teneurs (g/100g)
Eau	89.5
Dérivés azotés	3.44
Protéines	3.27
Caséine	2.71
Protéines solubles	0.56
Azote non protéique	0.17
Matières grasse	3.5
Lipides neutres	3.4
Lipides complexes	<0.05
Composés liposolubles	<0.05
Glucides	4.8
Lactose	4.7
Gaz dissous	5% du volume du lait
Extrait sec total	12.8g

➤ **Eau :**

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doublets d'électrons libres lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïdale avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque les matières grasses possèdent un caractère non polaire (ou hydrophobe), elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion du type huile dans l'eau. Il en est de même pour les micelles de caséines qui formeront une suspension colloïdale puisqu'elles sont solides (Amiot et al., 2002).

➤ **Matière grasse :**

Jeantet et al., rapportent que la matière grasse est présente dans le lait sous forme de globules gras de diamètre de 0.1 à 10µm et est essentiellement constituée de triglycérides (98%). La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport

énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acides gras saturés et de 35% d'acides gras insaturés. Elle renferme :

- ✚ Une très grande variété d'acides gras (150 différents).
- ✚ Une proportion élevée d'acides gras à chaînes courtes, assimilés plus rapidement que les acides gras à longues chaînes.
- ✚ Une teneur élevée en acide oléique (C18 :1) et palmitique (C16 :0).
- ✚ Une teneur moyenne en acide stéarique (C18 :0) (**Jeantet et al., 2008**).

➤ Les glucides :

Le constituant principal de la matière sèche du lait est le lactose qui présente une moyenne de 50 g/l (**Linden et Lorient, 1994**).

D'autres glucides peuvent être présents en faible quantité, comme le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose. En outre, certains glucides peuvent se combiner aux protéines (**Amiot et al., 2002**).

➤ Les lipides :

Les lipides du lait n'ont aucun rôle particulier dans le phénomène de coagulation. Ils sont constitués en majeure partie de triglycérides qui représentent 97 à 99 % des lipides totaux (**Boyaval et al., 1995**).

En plus des triglycérides, on trouve des phospholipides, des stérols et du cholestérol qui constituent 1 à 3 % des lipides totaux (**Linden et Lorient, 19**).

➤ Les protéines:

Selon **Jeantet et al**, le lait de vache contient 3.2 à 3.5% de protéines réparties en deux fractions distinctes :

- ✚ Les caséines qui précipitent à pH 4.6, représentent 80% des protéines totales.
- ✚ Les protéines sériques solubles à pH 4.6, représentent 20% des protéines totales (**Jeantet et al., (2007)**).

La caséine :

Caséine est le nom de groupe de la classe dominante des protéines du lait. Les caséines

forment facilement des polymères contenant des molécules de type Identique ou différent. En raison de l'abondance des groupes ionisables et des Parties hydrophobes et hydrophiles de la molécule caséique, les polymères Moléculaires formés par les caséines sont très spéciaux. Ils sont constitués de Milliers de molécules individuelles et forment une solution colloïdale, qui donne au lait écrémé sa teinte bleue blanchâtre. Ces complexes moléculaires s'appellent des Micelles caséiques. Comme ces micelles ne font que 0,4 microns, elles ne sont visibles qu'au microscope électronique (**Manuel de transformation du lait, 2007**).

La caséine est la principale protéine du lait et est utilisée comme ingrédient dans plusieurs produits, y compris le fromage, les produits de boulangerie, les peintures et les colles. Elle est extraite du lait écrémé par précipitation avec de la présure ou grâce à des bactéries lactiques acidogènes inoffensives (**FAO, 2019**).

Tableau 02: Classification des protéines (**Brunner, 1981 cité par Pougeon, 2001**).

NOMS	% Protéines	Nombre d'Acides Aminés
CASEINES	75-85	
Caséine aS1	39-46	199
Caséine aS2	8-11	207
Caséine	25-35	209
Caséine k	8-15	169
Caséine g	3-7	

Les protéines de lactosérum :

Les protéines du lactosérum représentent 15 à 28% des protéines du lait de vache et 17 % des matières azotées (**Derby, 2001**).

Thapon, définit les protéines du lactosérum comme protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riches en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique. (**Thapon J.L., 2005**).

Tableau 03: Classification des protéines du lactosérum (Thapon J.L., 2005).

PROTEINES DU LACTOSERUM	15-22	
β-Lactoglobuline	7-12	162
α-Lactalbumine	2-5	123
Sérum-albumine	0.7-1.3	582
Immunoglobulin's (G1, G2, A, M)	1.9-3.3	-
Proteases-peptones	2-4	-

➤ **Les minéraux :**

Selon **Gaucheron**, le lait contient des quantités importantes de différents minéraux. Les principaux minéraux sont calcium, magnésium, sodium et potassium pour les cations et phosphate, chlorure et citrate pour les anions (Tableau 3) (**Gaucheron, 2004**).

Tableau 04 : Composition minérale du lait de vache (**Jeantet et al,(2007)**)

Eléments minéraux	Quantité
Calcium	1043-1283
Magnésium	97-146
Phosphate inorganique	1805-2185
Citrate	1323-2079
Sodium	391-644
Potassium	1212-1681
Chlorure	772-1207

➤ **Les vitamines :**

Les vitamines sont des substances organiques que l'on rencontre dans de très faibles concentrations chez les animaux et dans les végétaux. Elles sont essentielles aux processus vitaux élémentaires. Bien que généralement très complexe, la composition chimique des vitamines est maintenant connue.

Le lait contient de nombreuses vitamines. Parmi les plus connues, citons- les vitamines A, B1, B2,C et D. Les vitamines A et D sont solubles dans les graisses,ou solvants

des matières grasses, alors les autres sont solubles dans l'eau (**Manuel de transformation du lait, 2007**).

Tableau 05 : Composition vitaminique moyenne du lait cru (**Amiot et al, 2002**).

Vitamines	Teneur moyenne		
Vitamines liposolubles			
Vitamine A (+ carotènes)	40µg	/	100ml
Vitamine D2	4	µg/	100ml
Vitamine E	100	µg/	100ml
Vitamine K	5 µg/ 100ml		
Vitamines hydrosolubles			
Vitamine C (Acide ascorbique)	2mg/		100ml
Vitamine B1 (thiamine)	45	µg/	100ml
Vitamine B2 (riboflavine)	175	µg/	100ml
Vitamine B6 (pyridoxine)	50	µg/	100ml
Vitamine B12 (cyan cobalamine)	0,45	µg/	100ml
Niacine et niacinamide	90	µg/	100ml
Acide pantothénique	350	µg/	100ml
Acide folique	5,5	µg/	100ml
Vitamine H (biotine)	3,5	µg/	100ml

➤ **Les enzymes :**

Les enzymes sont un groupe de protéines produites par les organismes vivants. Ils ont la propriété de déclencher des réactions chimiques et d'affecter le cours et la vitesse de ces réactions. Les enzymes le font sans être eux-mêmes affectés; c'est pourquoi on les appelle parfois biocatalyseurs. Les enzymes du lait proviennent soit du pis de la vache soit des bactéries. Les premiers sont les constituants normaux du lait; on les appelle enzymes originaux. Les derniers, les enzymes bactériens, varient en type et en abondance suivant la nature et la taille de la population bactérienne. Plusieurs des enzymes du lait sont utilisés pour le contrôle de la qualité. Parmi les plus importants, citons la peroxydase, la catalase, la

phosphatase et la lipase (**Manuel de transformation du lait, 2007**).

Tableau 06 : Caractéristiques des principaux enzymes du lait (**Vignola, 2002**).

Groupe d'enzymes	Classe d'enzyme	pH	Temperature C°
Hydrolases	Estérases :		
	Lipases	8	37
	Phosphatase alcaline	9-10	37
	Phosphatase acide	4.0-5.2	37
	Protéases :		
	Lysozyme	7.5	37
	Plasmine	8	37
Déshydrogénases ou	Sulfhydrile oxydase	7	37
Oxydases	Xanthine oxydase	8.3	37
Oxygénases	Lactoperoxydase	6.8	20
	Catalase	7	20

I.5. Qualité de lait cru :

I.5.1. Qualité organoleptique :

Les caractéristiques organoleptiques du lait sont récapitulées dans le tableau 07

Tableau 07 : Caractéristiques organoleptiques du lait (**Veisseyre R., 1975**).

Couleur	Blanc-jaunâtre à blanc-mât
Odeur	Peu accentué, fonction de l'espèce et l'alimentation
Saveur	Légèrement sucrée (le lactose à un faible pouvoir sucrant)
Viscosité	Deux fois plus visqueux que l'eau: - plus visqueux chez les monogastriques que chez les polygastriques - plus visqueux au début de lactation (colostrum)
Propreté	Le lait doit être propre c'est-à-dire ne doit pas contenir d'éléments

Physique	Figurés.
----------	----------

I.5.2. Qualité physico-chimique :

➤ La densité :

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale. (**Vierling, 2008**).

➤ L'acidité de titrable ou acidité Dornic :

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18° Dornic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement (**Mathieu, 1998**).

C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes. (**CIPC lait, 2011**)

➤ Le pH :

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du pH, car : $pH = \log 1 / [H_3O^+]$.

A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait. (**CIPC lait, 2011**).

Un lait mammiteux, contenant des composés à caractéristiques basiques, aura un $pH > 7$ et le colostrum a un pH voisin de 6. (**Luquet, 1985**).

➤ Point de congélation :

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes, Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et - 0,55°C.(**Mathieu, 1998**).

➤ **Point d'ébullition :**

D'après **Amiot et Coll.**, on définit le point d'ébullition comme la température atteinte lorsque la pression de vapeur de la substance ou de la solution est égale à la pression appliquée. Ainsi comme pour le point de congélation, le point d'ébullition subit l'influence de la présence des solides solubilisés. Il est légèrement supérieur au point d'ébullition de l'eau, soit 100.5°C.(**Amiot et Coll., 2002**).

I.5.3. La qualité microbiologique:

Le lait contient une flore originelle (moins de 1000 germes par ml : bactéries lactiques, germes saprophytes) s'il est prélevé dans de bonnes conditions et issu d'un animal sain (**Guiraud. 1998**).

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif (**Billon et al., 2009**).

Ces germes pathogènes est due à un état pathologique avec ou sans infection du pis (mammite ou maladie). Comme il peut être le siège d'une contamination, microbienne surtout à la ferme dont les sources sont multiples (Fèces et téguments de ranimai, sol, air, eau, animal, litière et aliments, manipulateurs, équipements de traite et de stockage du lait, insectes ...etc.).

➤ **Flore originelle :**

Le lait contient relativement peu de microorganisme quand il est sécrété à partir de la mamelle d'un animal en bonne santé. Il devrait contenir moins de 5000UFC. La flore naturelle du lait cru est un facteur essentiel particulièrement à ces propriétés organoleptiques (**Fotou et al,2011**).

Le Lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées «lacténines» mais leur action est de très courte durée environ 1 heure.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Guiraud, 2003).

- **Les bactéries lactiques :**

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation (Vignola, 2002).

Tableau 08: Flore originelle du lait cru (Amiot et al., 2002).

Microorganismes	Pourcentage (%)
Micrococcus sp.	30-90
Lactobacillus	10-30
Streptococcus ou Lactococcus	< 10
Gram négatif	<10

➤ **Flore de contamination :**

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (Vignola, 2002).

Tableau 09 : Germes contaminant le lait cru. (Jakob et al., 2009).

Germes Gram positif	Sources de contamination	Psychrotrophes
Germes sporulés Aérobie	Terre, poussière, foin	certaines espèces
Germes sporulés anaérobies (clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, boue	Non
Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
Microcoques	Peau, résidus de lait	certaines espèces
Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
Germes Gram négatif	Sources de contamination	Psychrotrophes
Colibactéries (E. coli)	Fèces, eaux usées	Non
Entérobactéries	Plantes, fèces, eaux	Certaines esp
Pseudomonas	Eau, sol	Oui
Alcaligenes, Flavobacterium	Eau, sol	Oui
Levures	Sol, plantes, résidus de lait	Oui

➤ **Flore d'altération :**

Seules quelques-unes des espèces présentes seront responsables de l'altération du produit. Elles sont d'abord sélectionnées en fonction des conditions physico-chimiques mises en jeu (nature de produit, pH, pression partielle en oxygène, température de stockage, etc.) (Bonnyfoy et al., 2002).

● **Bactéries de type coliforme :**

Les coliformes sont des entérobactéries (bacilles Gram négatif, asporulés, glucose+, oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz. (Cuq, 2007).

Leur développement est freiné par l'abaissement du pH et leur croissance est stoppée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Ils sont peu résistants à la chaleur. **(Minor et Richard,1993)**.

- **Levures et moisissures :**

Les levures et moisissures sont des cellules eucaryotes rattachées au règne végétal par leur structure cellulaire. Regroupées sous le vocable de flore fongique, elles peuvent être retrouvées aussi bien dans le lait cru, le lait en poudre que dans tous les autres produits laitiers. **(Abdessalam A., 1984)**.

- **Flore pathogène :**

La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait, alors, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux) ou bien liées à l'Homme **(Brisabois et al.(1997))**. Parmi ces germes :

- **Bactéries infectieuses :**

Les principaux micro-organismes infectieux :

- ✓ **Salmonelles :**

Sont des bactéries Gram - en forme de bâtonnets, anaérobies facultatives, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae **(Crump et al., 2017;Holschbach et al., 2018)**. Au sein de deux espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, des centaines de sérotypes différents ont été découverts. Les salmonelles peuvent se développer dans des environnements acides. Une croissance à pH 3,7 a par exemple été rapportée. Cependant d'autres facteurs peuvent influencer celle-ci, tels que la température, l'oxygène disponible, le milieu de croissance, le taux d'inoculation et le sérotype **(J. D'Amico et al., 2017)**.

Les bactéries du genre *Salmonella* sont à l'origine de la salmonellose, une maladie se transmettant principalement par voie fécale au sein des ruminants et responsable de toxico-infections liées à la consommation d'aliments ou d'eau contaminés. Cette contamination est

également possible suite à un contact avec l'animal contaminé ou avec son environnement. Certaines souches de salmonelles causent des mammites et par conséquent, les micro-organismes pathogènes peuvent se retrouver dans le lait (**J. D'Amico et al., 2017; Holschbach et al., 2018; FAO, 2019**).

Les personnes contaminées par ce micro-organisme pathogène peuvent présenter les symptômes suivants : diarrhée, forte fièvre accompagnée de frissons et maux de tête, douleurs abdominales, vomissements (**Santé Publique, 2018**).

✓ *Listeria* :

Le genre *Listeria* comporte huit espèces, dont *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène pour l'Homme et les animaux, Gram +, sous forme de bâtonnets. Elle est responsable de la toxi-infection appelée listériose. Elle résiste à des conditions de pH entre 4,30 et 9,40, et peut vivre jusqu'à une activité d'eau aussi faible que 0,92. De plus, cette bactérie psychrotrophe a la capacité de se développer à des températures basses, sous 7 °C (**ANSES, 2011; Gérard et al., 2018**). À cause de sa résistance aux conditions extrêmes, ce pathogène peut survivre durant la conservation du produit au réfrigérateur. C'est pourquoi, malgré le respect de la chaîne du froid lors de la production et de la conservation d'aliments, il est possible de conserver des traces de *L. monocytogenes*. Différentes sources de contamination sont possibles. La contamination peut être due à l'animal ou à l'environnement de production. Le traitement thermique permettant l'élimination de ce pathogène doit se faire à une température de minimum 65°C (**ANSES, 2011**).

Les symptômes de la listériose sont la diarrhée, le vomissement, la fièvre, les maux de tête, les convulsions, les frissons, ou encore la gastroentérite et la myalgie. Elle peut également mener à la méningite et la septicémie (**Akrami-Mohajeri et al., 2018**).

✓ *Campylobacter* :

Un autre micro-organisme pathogène peut également être présent au sein des produits laitiers à base de lait cru : *Campylobacter* (**DiversiFerm, 2014**). Ce genre bactérien est à l'origine d'une gastroentérite qui touche l'Homme mondialement. Il s'agit d'une bactérie Gram -, de forme spiralée ou incurvée. Il comporte une vingtaine d'espèces (**ANSES, 2011**). L'espèce la plus répandue parmi les micro-organismes pathogènes est *Campylobacter*

jejuni (**Ozturkoglu-Budak et al., 2017**). Cette dernière figure parmi une vingtaine du genre à avoir la capacité d'être thermotolérantes (T° optimale = 41,5 °C). La transmission à l'Homme est indirecte, suite à une consommation d'aliments contaminés (lait cru et eau contaminée) (**ANSES, 2011; Santé Publique, 2018**).

Cette bactérie est à l'origine de la campylobactériose, responsable de diarrhées, de douleurs abdominales, de fièvres, de céphalées, et de nausées et/ou vomissements (**OMS, 2018b**).

- **Bactéries toxigènes :**

Qui produisent une toxine dans l'aliment qui est responsable de l'intoxication du consommateur. Il n'est donc pas suffisant de détruire la bactérie pour éviter l'incidence de la maladie. De plus, certaines toxines sont très résistantes aux traitements thermiques, telle que la pasteurisation et même la stérilisation (**Lamontagne et al., 2002**).

Les principaux micro-organismes toxigènes :

- ✓ **Staphylocoques :**

Un autre micro-organisme pathogène rencontré dans le lait est *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie coagulase-positif produit des toxines responsables de l'intoxication alimentaire staphylococcique (**Sugrue et al., 2019**). Par exemple, en ce qui concerne les produits laitiers, la toxine produite est l'entérotoxine staphylococcique C (SEC) (**FAO/OMS, 2005**). Cette bactérie peut causer des mammites chez les animaux en lactation. Toutes les souches de *S. aureus* n'ont pas la capacité de produire des toxines. Différents paramètres physico-chimiques peuvent influencer la production de toxine, tels que le pH, la température et la concentration en sels (**Panthi et al., 2017**). La contamination par *S. aureus* provoque chez l'homme des nausées, des vomissements incoercibles, des douleurs abdominales, des diarrhées, des vertiges, des frissons, et une faiblesse généralement accompagnée d'une fièvre modérée (**Santé Publique, 2018**).

✓ *Escherichia coli*

Une bactérie Gram-, anaérobie facultative et figurant dans la flore microbienne humaine, *E. coli*, est un indicateur de contamination fécale et de conditions hygiéniques pauvres (**Sugrue et al., 2019**). Tout comme pour *S. aureus*, toutes les souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes. Certaines souches d'*E. coli* sont capables de produire des Shiga-toxines (STEC), provoquant une grave maladie (**OMS, 2019**). Certaines souches peuvent résister à des températures de réfrigération. Par exemple, *E. coli* O157:H7 peut croître à des températures proches de 7 °C dans le lait et est le sérotype le plus important d'un point de vue santé publique (**OMS, 2018**).

Les symptômes dus à l'infection par les STEC/VTEC sont des crampes abdominales, des diarrhées (parfois sanglantes), de la fièvre et des vomissements. *E. coli* O157:H7 se transmet à l'homme par des aliments contaminés, tels que le lait cru (**OMS, 2018; Santé Publique, 2018**).

✓ Clostridies sulfito-réducteurs :

Ce sont des bâtonnets sporulés, mobiles, Gram+anaérobies stricts, présentent généralement dans le sol et l'eau, mais aussi dans le tube digestif Humain et animal, le pouvoir pathogène est dû à la synthèse des toxines. (**Lamontagne et al., 2002**).

I.6.Principales activités des micro-organismes dans le lait :

Les altérations du lait sont associées à la multiplication de levures, moisissures et bactéries. Les contaminations bactériennes sont les plus fréquentes et les plus importantes et leurs potentialités de développement les plus à craindre. Ces processus de dégradation sont possibles, lorsque les conditions du milieu environnant sont favorables à la prolifération microbienne et à l'activité enzymatique. De graves défauts de goût et d'odeur peuvent apparaître. (**Kim et al., 1982**).

Parmi ces activités :

➤ Acidification :

Un tel processus conduit à la coagulation de la caséine et à la prise en masse du lait. Selon la température du lait et les bactéries impliquées, le phénomène de

coagulation sera plus ou moins rapide : de 10°C à 37°C, le germe le plus fréquemment impliqué est *Streptococcus lactis* avec plus rarement association avec des coliformes, entérocoques, microcoques et lactobacilles. Au-dessus de 37°C, les germes en cause sont *Streptococcus thermophilus*, Entérocoques fécales et *Lactobacillus bulgares*.

A des températures inférieures à 10°C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytiques : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, microcoques (**Leyral et Vierling, 2007**).

➤ **Protéolyse :**

Au cours de leurs activités métaboliques, certains microorganismes, grâce à l'action de leurs protéases, dégradent des fractions protéiques du lait. Ce phénomène produit la libération de sous-produits très variés, dont des peptides à longue ou courte chaîne à l'origine des goûts amers. Les germes incriminés sont *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*. (**Vignola, (2002); Guiraud, (2003)**).

➤ **Lipolyse :**

La lipolyse est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres. Au-delà de certains seuils, cette augmentation peut provoquer l'apparition de défauts de goûts (rance) dans les produits laitiers. (**Heuchel et al, (2003)**).

Dans un lait cru réfrigéré, la flore dominante est représentée par les psychrotrophes. 70% ou plus de cette population possèdent une activité lipolytique. Cependant, elle n'est perceptible au goût qu'à partir des teneurs de 10^6 à 10^7 germes/ml, c'est-à-dire pour des laits crus considérés comme très pollués. (**Chilliard et Lamberet, (1984)**).

I.7. Evolution et altération du lait de vache:

Suivant le degré de dégradation des constituants du lait sous l'effet des microorganismes, on distingue quatre états bactériologiques du lait (**Medjoudj et Salhi, 2013**).

➤ **Phase bactériologique ou de latence :**

Du fait des substances antibactériennes du lait et des bactériocines produites par les bactéries lactiques, les autres germes tendent à stagner ou à régresser. C'est une phase d'adaptation. Le lait peut alors se conserver pendant longtemps sous réfrigération. Toutefois, cette durée est réduite considérablement à une température élevée (**Petransxiene et Lapied, 1981**).

➤ **Phase d'acidification :**

Durant cette phase, l'acidité ionique diminue et le degré Dornic augmente. La fermentation du lactose par les espèces du groupe lactique principalement, aboutit à la production d'acide lactique. Les streptocoques sont les premiers germes acidifiants intervenant par abaissement du pH et par augmentation de l'acidité, puis viennent les lactobacilles acidophiles qui, en se proliférant, abaissent d'avantage le pH et entravent la croissance d'autres germes (**Medjoudj et Salhi, 2013**).

➤ **Phase de neutralisation :**

Durant cette phase, l'acide produit est utilisé par les levures acidophiles, ce qui entraîne une désacidification. Ainsi, le pH augmente et tend à s'équilibrer vers la neutralité (pH= 7). Cette phase dite de neutralisation correspond à la reprise d'activité des germes putréfiantes, d'où la nécessité d'un contrôle des germes acidogènes (**Medjoudj et Salhi, 2013**).

➤ **Phase d'alcalinisation :**

Elle est également dite de putréfaction et se traduit par une production d'hydrogène sulfuré, indice de dégradation systématique du lait, car il affecte aussi bien les caractères hygiéniques qu'organoleptiques (**Petransxiene et Lapied, 1981**).

I.8.Conservation du lait à la ferme

La réfrigération du lait à la ferme constitue un grand progrès d'un point de vue hygiénique (le taux de contamination des laits collectés en bidons non réfrigérés dépassait souvent 10⁶ germes/ml alors qu'il est, maintenant, inférieur à 50 000 germes/ml). Mais, la

flore dominante n'est pas la même car le froid favorise le développement d'espèces psychotropes qui peuvent générer des enzymes protéolytiques et lipolytiques susceptibles d'altérer la qualité et la stabilité des laits **(Veisseyre, 1979)**.

Le froid peut également entraîner des perturbations de nature physico-chimiques ou biochimiques avec des conséquences sur la qualité technologique des laits (stabilité thermique, aptitude à la transformation en fromage). Les plus importants de ces perturbations sont la solubilisation de la β -caséine, la solubilisation des sels minéraux, la tendance à la cristallisation de la matière grasse et l'altération de l'équilibre des bactéries dans le lait **(Bennett et al., 2005)**. C'est pourquoi il est recommandé, pour certaines fabrications, de ne pas prolonger la réfrigération **au-delà de 48 heures**.

En outre, cette évolution conduit à un mélange de laits issus de plusieurs traites et provenant de plusieurs troupeaux, ce qui peut avoir un impact négatif sur les producteurs qui font des efforts de qualité **(Académie des Technologies, Académie d'Agriculture de France, 2004)**.

Ainsi et afin d'obtenir un lait cru de bonne qualité microbiologique, deux paramètres sont à prendre en considération: le premier étant la réduction au minimum de la contamination initiale; le second étant le refroidissement rapide du lait à basse température (< 4°C) pour ralentir le développement des microorganismes ce qui nous conduit souvent à surestimer les avantages que présente l'utilisation du froid artificiel omettant les faits que la qualité microbiologique du lait dépend avant tout des soins qui sont apportés au moment de sa récolte et que le froid n'améliore pas la qualité microbiologique du lait, il ne fait que la conserver **(Dieng, 2001)**.

Chapitre 02: Les huiles essentielles et des généralités sur le romarin

II.1. Définition de l'huile essentiel:

Selon la Pharmacopée Européenne 7ème édition, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie (EDQM, 2011).

Selon la 8ème édition de la Pharmacopée française de 1965, les huiles essentielles, nommées également « essences » ou « huiles volatiles », étaient « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (ANSM, 1965).

Selon la norme ISO 9235 :2014, une huile essentielle est définie comme « le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (ISO, 2014).

II.2. La composition des huiles essentielles

Une huile essentielle renferme majoritairement des terpènes , issus de la condensation d'unités isopréniques, et des dérivés aromatiques, aliphatiques, dérivés du phénylpropane (Couic-Marinier et Lobstein A, 2013).

➤ Composés terpéniques

Seuls les monoterpènes en C₁₀ et les sesquiterpènes en C₁₅ peuvent être extraits par distillation, les autres terpènes (diterpènes en C₂₀ et triterpènes en C₃₀) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau (Couic-Marinier F. et Lobstein A.,2013).

- Les monoterpènes

Les monoterpènes (figure 1) sont surtout présents chez les conifères. Composés anti-infectieux (bactéricides virucides et fongicides), qui doivent être utilisés parallèlement aux phénols, selon les cas, lors d'infections, ce sont également d'excellents

immunostimulants. Ils ont une action révulsive sur la peau et sont utiles en cas de douleurs localisées : ce sont de bons antalgiques à action percutanée (**Couic-Marinier F. et Lobstein A.,2013**).

- **Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes (figure 2), sont légèrement hypotenseurs, calmants et anti-inflammatoires. Les azulènes confèrent aux HE qui les renferment une couleur bleu sombre (HE de matricaire). Ils peuvent être dermocaustiques et néphrotoxiques (**Couic-Marinier F. et Lobstein A.,2013**).

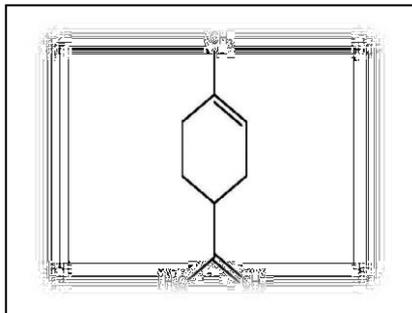


Figure 01: Monoterpène

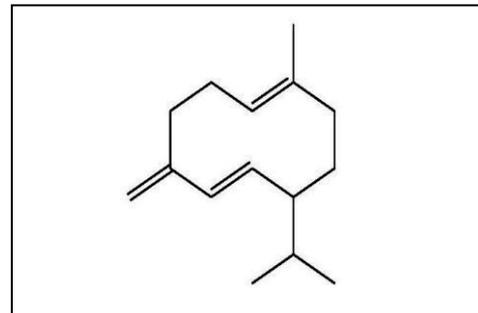


Figure 02 : Sesquiterpène

- **Les composés aromatiques**

Dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthol et l'aldéhyde (HE de badiane, d'anis, de fenouil).

Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraînaibles par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (ex. HE de céleri) (**Couic-Marinier F. et Lobstein A.,2013**).

II.3.Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs techniques d'extraction des Huiles essentielles dont le choix de la technique dépend de teneur en huile et sa nature physicochimique et en fonction de matériel disponible.

L'extraction des huiles essentielles se fait par des procédés divers.

➤ Hydrodistillation

Deux méthodes sont décrites ci-dessous :

• Méthode de Moritz

il s'agit d'une hydrodistillation simple qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau. L'ensemble est, ensuite, porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile se sépare par différence de densité **(BRUNETON J., 1987)**.

L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger (figure 3). Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobage permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon **(BRUNETON J., 1987)**.

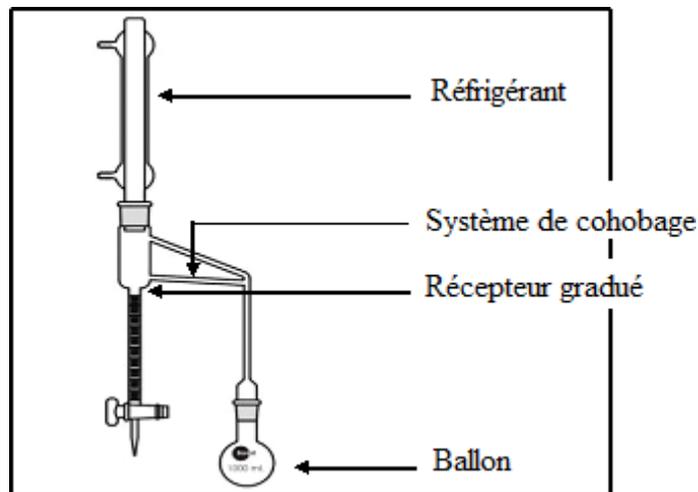


Figure 03 : Dispositif d'hydrodistillation en montage Clevenger **(BRUNETON J., 1987)**.

- **Méthode de Parnas-Wagner**

Dans la distillation à vapeur saturée, la matière végétale est placée sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic et n'est pas en contact avec l'eau (figure 4). Les principes volatils sont entraînés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation (**KESBI A., 2011**).

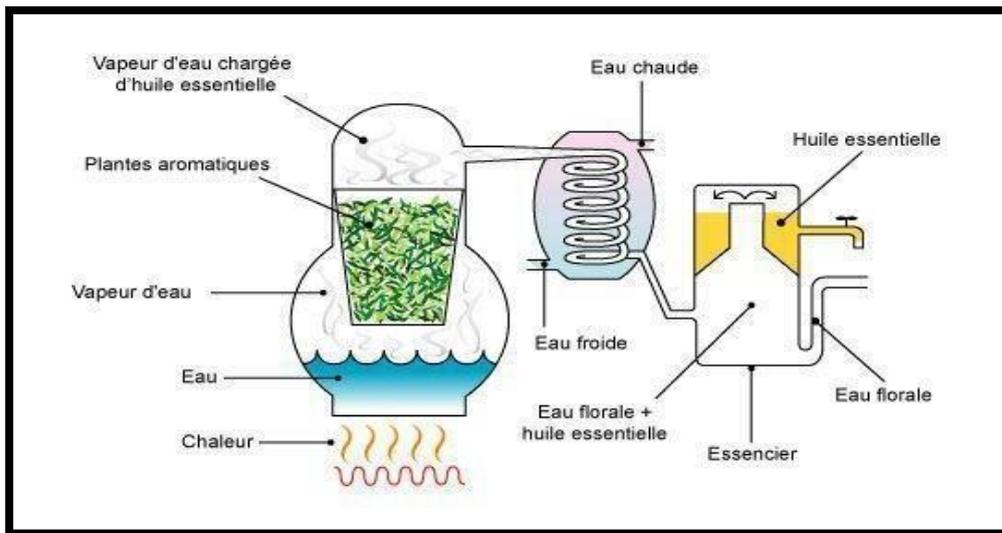


Figure 04 :Montage d'extraction par distillation à vapeur saturée (**KESBI A., 2011**).

- **Hydro-diffusion**

Le terme hydrodiffusion est attribué au type de transport contrôlé par la polarité des constituants. Elle serait responsable de la vitesse relative de la distillation des différents composants aromatique dépendants d'avantage de leurs solubilités dans l'eau que de leur point d'ébullition. Si l'hydrodiffusion constituait l'étape limitant de l'hydrodistillation, alors l'ordre de sortie des composés serait dicté par leurs polarités et non par volatilités (**CHACOU M. et BASSOU k.,2007**).

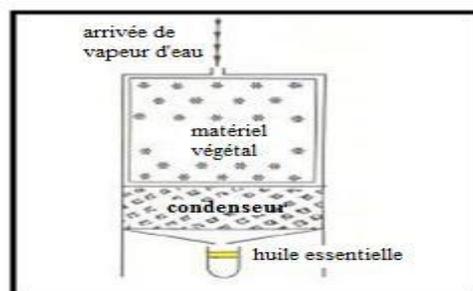


Figure 05 : Procédé d'hydrodiffusion (**BRUNETON J., 1987**).

➤ **Extraction au CO² supercritique**

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Dans cette technique, un courant de CO₂ à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraîne les H.E qui seront, ensuite, récupérées (**BRUNETON J., 1987**).

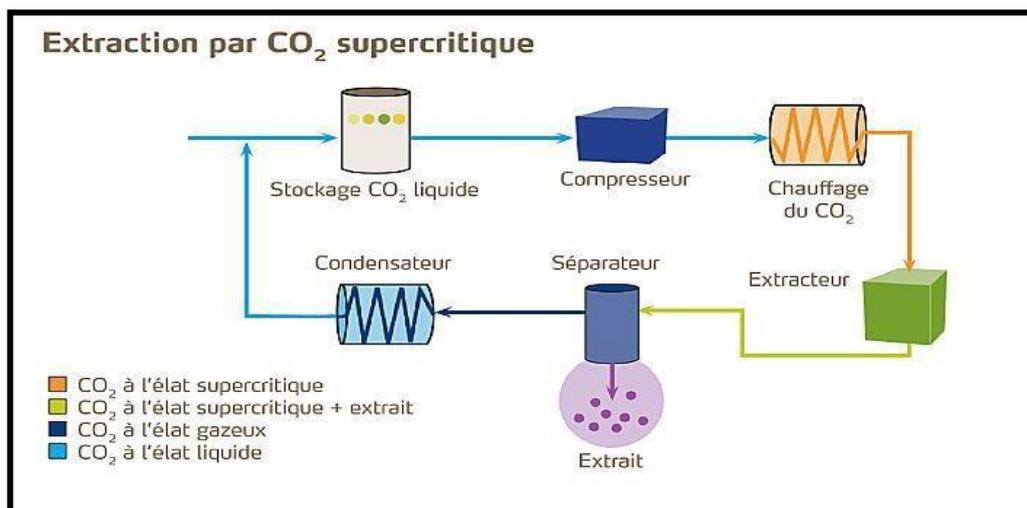


Figure 06 : Procédé d'extraction par CO₂ supercritique (**BRUNETON J., 1987**).

➤ **Extraction sans solvant assistée par micro-ondes :**

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale. Le montage obtenu se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique (figure 7). Le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Les graines sont en permanence humides, ce qui ne laisse aucune chance à la réalisation d'éventuelles réactions secondaires, néfastes à la qualité du produit obtenu (**BRUNETON J., 1987**).

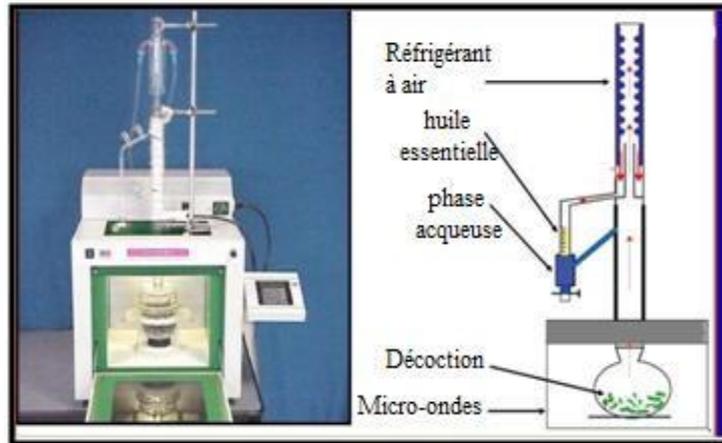


Figure 07 : Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-onde (**BRUNETON J., 1987**)

➤ **Extraction par solvants volatils**

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

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont : l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (figure 8) (**BOUAINE A., 2017**).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (**BRUNETON J., 1987**) .

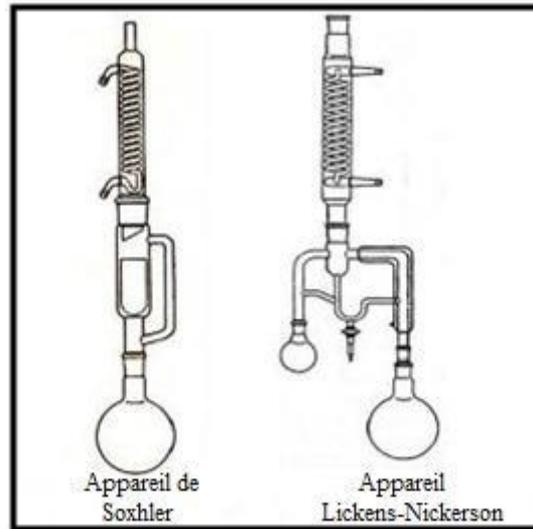


Figure 08 : Procédé d'extraction par solvant (**BRUNETON J., 1987**).

II.4.L'huile essentiel dans l'industrie agro-alimentaire :

L'activité antimicrobienne des extrais des plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps c'est pour cela, que l'on pense de plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires. C'est ainsi que Bekhechi et Abdelouahid (2010) ont eux aussi étudié la conservation alimentaire par les épices, les aromates et les huiles essentielles qui sont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût ainsi qu'un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer.

Plusieurs huiles essentielles, ont en laboratoire, une activité antimicrobienne avérée. Mais avant leur adoption en tant qu'agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier les résultats expérimentaux dans l'aliment sélectionné. En général, les résultats expérimentaux obtenus en milieu modèle se confirment sur les aliments, mais avec des concentrations d'huiles essentielles un peu plus élevées. Les études faites à travers le monde, montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments.

II.5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" ou approuvés comme additifs alimentaires. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais cependant des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne. **(Cosentino ., Tuberoso et al., 1999).**

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudo mycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures **(Billerbeck G., 2000).**

II.6. Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases **(Zaika , 1998):**

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

II.7.Effet de la composition chimique des huiles essentielles sur l'activité antimicrobienne:

Les huiles essentielles sont extraites soit des feuilles, des graines, des écorces, des racines ou d'autres structures spécialisées. Une huile essentielle est un mélange complexe de plusieurs composés d'arômes volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (ex : carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (ex : linalool), aldéhydes (ex : cinnamaldéhyde), cétone (ex : menthone), esters (ex : acétate de linalyle) et éthers. La plupart de ces composés est dotée de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cinnamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym).

La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également. Il est donc important de sélectionner une huile essentielle standardisée dont les composants actifs sont clairement identifiés et quantifiés. **(Oussalah et al, 2007).**

II.8.Historique du *Rosmarinus officinalis*

Selon une légende, le Romarin était à l'origine une plante à fleurs blanches. Avant de donner naissance à l'enfant Jésus, Marie aurait déposé sa cape de couleur bleue sur un Romarin planté devant l'étable. La cape aurait déteint sur l'arbrisseau et c'est ainsi que, depuis, le romarin fleurit bleu. Certains voient dans cette légende une autre origine possible au nom Romarin à savoir « Rose de Marie ».

L'eau de Hongrie, alcoolat à base de Romarin pour se parfumer ou à boire, viendrait d'Elisabeth de Pologne, reine de Hongrie. Elle l'aurait utilisée en 1378 à l'âge de 72 ans **(ZAOUI A.,2012).**

Nommé rose marine (Romarin vient du latin *ros* = rosée et *marinus* = marin), herbes aux couronnes, encensier, plante méditerranéenne sauvage ou cultivée (**TERZO M et RASMONT P.,2007**).

II.9.Origine et aire géographique

Le Romarin spontané qui pousse sur les côtes méditerranéens, et le sud-ouest de l'Asie, et souvent cultivé dans les jardins comme clôture..Il pousse aussi spontanément dans le sud de l'Europe, elle est assez répandue dans les montagnes. Sur les pentes montagneuses aride set ensoleillées, notamment en Espagne, en Dalmatie, en Tunisie, au Maroc et dans le sud de la France [**FRELY R.,2006, BURG N.,2014, BRUN CH.,2012**].

Le Romarin affectionne particulièrement les terrains calcaires .c'est pourquoi on les trouve essentiellement dans les garrigues maquis non-loin de mer. Il est bien caractérisé des collines sèches .maquis, sur sol argileux, c'est une cicum-méditerranéenne, buisson aromatique haut (**ZOUBEIDI CH.,2004**).

En Algérie, Le Romarin est l'une des sept espèces végétales excédants 50.000 hectares sur le territoire national (**FRELY R.,2006**).

II.10.Etymologie du Romarin

Le nom « romarin » vient du latin « *ros marinus* » (rosée de mer) (**Auguste S.,1862**), ou bien du grec « *rhops myrinos* » (buisson aromatique)(**Helmut G.,1996**), ou encore du latin « *rhus marinus* » (Sumac de mer) (**Rameau J., et al.,2008**):. On l'appelle également « herbe-aux-couronnes », et en provençal, «encensier»(**Huguette M.,2008**).

Noms vernaculaire

Iklil al jabal, Klil, Hatssa louban, Hassalban, Lazir, Azîir, Ouzbir, Aklel, Touzala (**O.P.U.NT**).

Appellations régionales en Algérie : En plus souvent

Région de l'Est : Eklil

Région de l'Ouest : Helhal

Région du Centre : Yazir

II.11. Classification botanique

Tableau 10: Position systématique du romarin

Règne	Plantae
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. 1753
Période de floraison	Février à Avril
Couleur des fleurs	Bleu / Mauve

Variété:

On dénombre plus de 150 variétés de Romarin. Elles se différencient par leur taille maximale (d'une dizaine de centimètres à 2 mètres), leur tenue (vertical ou rampant), la couleur de leurs fleurs (violette, bleue, blanche, rose) et de leurs feuilles, leur rusticité...etc. **(DELAVEAU P. et al. ,1985)**

II.12. Description botanique :

Le Romarin, plante commune à l'état sauvage, est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, trouvée dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (Zermane A.,2010). Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (Zeghad N.,2009), de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé.

Les feuilles sont coriaces, persistantes, sessiles, linéaires, entières, enroulées sur les bords, vertes et ponctuées dessus, blanches tomenteuses à la face inférieure (Rameau J-C. et Dumé G.,2008).



Figure 09: Descriptif de la fleur de *Rosmarinus officinalis* L (ONESCO.,1960).

Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées, et son odeur est extrêmement odorante et tenace.

La floraison commence dès les mois de Janvier / Février et se poursuit jusqu'en Avril / Mai (**Zeghad N.,2009**).

Les fleurs sont réunies au sommet des rameaux, bleues pâles à blanchâtre, pratiquement sessiles, disposées en petites grappes axillaires et terminales, bractées tomenteuses lancéolées (**Rameau J-C. et Dumé G.,2008**).

Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant un petite dent vers leur base comme pour la plupart des Lamiacées (**Zeghad N.,2009**).

Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (Tétrakène). Il attire les insectes (Entomophiles) pour assurer la pollinisation (Entomogame) (**Eloutassi N.,2004**).

II.13.Composition chimique de la plante:

La constitution de l'huile essentielle varie selon la phase de développement et l'origine des feuilles utilisées pour l'extraction (**BHAR H. et BALOUK A.,2011**):

- Huile essentielle : 1,8 cinéole, alpha-pinène, camphre de romarin.
- Diterpènes : acide carnosolique, rosmadial.
- Triterpènes et stéroïdes : acide aléanolique, acide ursotique.
- Lipides : n-alkanes, isolalkanes, alkanes.
- Rosmaricine.
- Acide rosmarinique
- Tanin.

II.14.Composition chimique de l'huile essentielle

Tableau 11: Variation de la composition chimique (%) de l'huile essentielle de romarin en fonction de l'origine géographique de la plante (**BOELENS,1985**).

Les valeurs sont exprimées en % par rapport à l'huile essentielle.

Origine (nb analyse)	Alpha-Pinène	Verbénone	Camphre	Bornéol	Eucalyptol (ou Cinéol)
Algérie (1)	26	26	8	4	Trace
France (17)	12.5	5.5	25	6.3	18.5
Italie (3)	10	Trace	11	6.3	44
Maroc (1)	12	Trace	15	5	40
Tunisie (3)	11	2	10	7.3	48
Espagne (6)	21	3	17.5	3	23
Portugal (1)	12	Trace	9	Trace	14

De ce fait, la grande variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle a permis d'établir 03 chémotypes en regroupant les composés dominants et la localisation géographique (**GRANGER et coll., 1973**).

- Type alpha-pinène/verbénone localisé en Algérie.
- Type camphre/bornéol localisé en Espagne et en France.
- Type eucalyptol localisé en Italie, Maroc et Tunisie.

La partie expérimentale

I. Lieu et période de travail:

Les différentes expérimentations ont été effectuées en juin dans les structures suivantes:

-Extraction de l'huile essentielle a été faite dans le laboratoire de la faculté de biologie.

-Le reste de la partie expérimentale à été effectuée dans le laboratoire du GIPLAIT (Groupement Industriel de Production Laitière) qui se trouve dans la zone de Saida.

Objectif:

L'objectif de cet travail est résumé comme suit:

-L'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* collectée dans la région de Saida et l'évaluation du rendement.

-L'étude de l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle vis-à-vis des souches bactériennes.

-La conservation du lait contenant l'huile essentielle tout en comparant avec d'autre sans huile essentielle.

II. Matériel et méthode :

II.1 Matériel végétale:

Les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* ont été collectées dans la région de SAIDA plus précisément pépinière Vieux-Saida en Avril. Le matériel végétal cueilli est séché pendant 8 jours à l'air libre et à l'abri de la lumière puis une dessiccation a été effectuée dans l'étuve à 40° C jusqu'à ce que son poids soit stable(**photo 01**).

II. 2 Matériel au laboratoire:

Bec bunsen.

Les tubes à essai et les boites de Pétri.

Les flacons.
Pipette pasteur.
Micro filtre de 0.2um.
Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.
Plaque chauffante
Réfrigérateur
Autoclave
Etuve
PH-mètre
Balance électrique.
Bain-marie.

II.3 Méthode d'extraction d'huile essentielle:

L'extraction d'huile essentielle est réalisée par hydro-distillation des parties aériennes de la plante durant 2h 30min, à la température de 100°C dans un appareil de type Clevenger (**photo 02**). La vapeur d'eau enrichie de constituants volatils est condensée puis décantée à 20°C. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile est récupérée, déshydratée par le sulfate de sodium (Na_2SO_4) et conservée à 4°C. Cette opération est suivie par le calcul des rendements.

➤ Le protocole d'extraction de l'huile essentielle :

Dans un ballon d'une capacité de 1 litre, on immerge 60 grammes de matière végétale. Puis, on ajoute un volume d'eau qui correspond à 450 ml de la capacité du ballon. Ensuite, on adapte le ballon à l'appareil de condensation et on alimente le réfrigérant en eau. Par conséquent, le ballon et son contenu sont placés sur la plaque chauffante. Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans le ballon sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie le ballon au réfrigérant. Enfin l'huile essentielle obtenue, moins dense que l'eau, est récupérée à l'aide d'une micropipette (pour éviter que l'HE se coince entre les joints) dans un tube recouvert d'un papier d'aluminium pour protéger de la lumière et stockée à 4°C (**photo 04**).



Photo 01: Dessiccation des parties aériennes à 40°C.



Photo 02: Montage d'hydro distillation de type Clevenger.

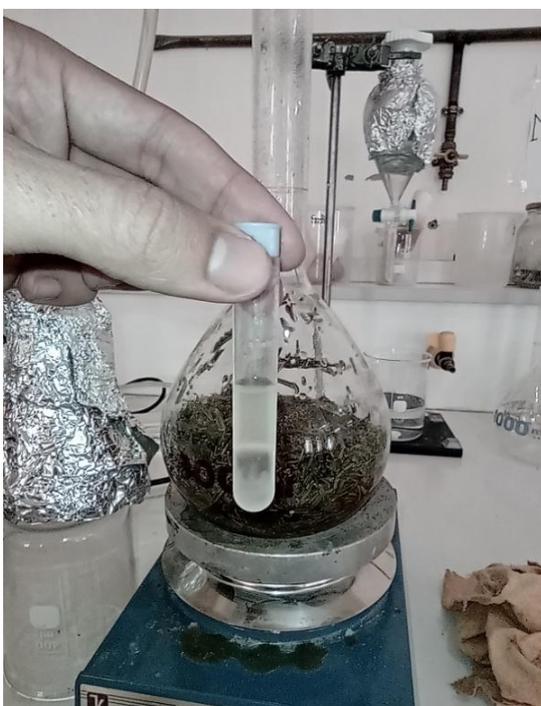


Photo 03: L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.



Photo 04: Conservation de l'huile essentielle au réfrigérateur à 4°C.

➤ **Le rendement de l'huile essentielle:**

Selon la norme Afnor (1986), le rendement en huile essentielle (Rd), est :

$$Rd = \frac{M'}{M} \times 100$$

- Rd : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).
- M' : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).
- M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

➤ **Suivi de la cinétique d'extraction**

La cinétique d'extraction a pour objectif de déterminer le temps nécessaire pour extraire la quantité maximale d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer la quantité extraite en fonction du temps d'extraction. Dans notre étude, la quantité extraite est déterminée toutes les cinq minutes en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau (**Bachelot et al., 2006**).

II.4 Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* :

La méthode de puits est utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Pour cela on prépare une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche dans de l'eau physiologique (Na Cl) et on ensemence la souche dans une boîte de Pétri contenant de la gélose Mueller Hinton. Puis on creuse des puits d'un diamètre de 6 mm sur le centre de chaque boîte et on injecte 25 µl d'huile essentielle dans le puits. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures.

Après 24 heures d'incubation, une zone claire apparaîtra autour des puits si l'huile essentielle inhibe le développement microbien.

Le Repiquage des souches bactériennes est réalisé par la méthode des stries sur gélose nutritive, puis incubées à 37°C pendant 24 heures afin d'obtenir des colonies bactériennes pures et jeunes servant à préparer l'inoculum.

Confirmation de l'identité par l'examen macroscopique:

02 Bactéries a Gram négatif :

- Escherichia coli*: Colonies rondes, lisses, abords réguliers, aplatée (sur gélose nutritive).
- Pseudomonas aeruginosa*: Colonies verdâtres à contour irrégulier avec un odeur aromatique (sur gélose nutritive).

02 Bactéries a Gram positif :

- Staphylococcus aureus*: Colonie fine de couleur jaune-orange (sur milieux Chapman).
- Bacillus subtilis*: Colonies a forme irrégulière translucide de couleur blanc crème, les marges dentelées (sur gélose nutritive).

➤ **Le protocole :**

Couler la gélose de Mueller-Hinton dans les boites de pétrie jusqu'à 4mm d'épaisseur (**photo 05**).

Préparation de l'inoculum : A partir des boites contenant les souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*).

On racle 4 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube qui contient l'eau physiologique stérile. On utilise les écouvillons pour obtenir un étalement uniforme en nappe (**photo 06**).

Après 15 mn, des puits ont été creusés à l'aide d'embouts de micropipette (l'extrémité épaisse de 6 mm). Une goutte de gélose MH est déposé dans le fond des puits pour limiter sa diffusion sous la gélose. Ensuite dans chaque puits on distribue 25 µl de l'huile (**photo 07**).

Enfin les boites de pétri sont maintenues à 4°C pendant une heure pour que l'huile essentielle puisse diffuser. L'incubation des boites s'effectue à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries.

➤ **Lecteur des résultats :**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits à l'aide d'un pied de coulisse(**Ponce et al., 2003**)

Résistante ou Non sensible (-) : diamètre < 8 mm.

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

II.5 Les huiles dans le processus de la bio-conservation:

➤ **Échantillonnage du lait:**

Le lait cru utilisé pour la conservation a été menée directement par les collecteurs au niveau de laboratoire de **GIPLAIT**.

Les prélèvements ont été collectés directement du citerne des collecteurs dans un flacon stérile(**photo 08**). Ces échantillons ont fait l'objet d'une série d'analyses physiques et chimiques.

Enfin le lait cru est distribué dans des flacons stériles à raison de 100 ml de lait cru pour chaque flacon (**photo 09**).

➤ **Préparation de l'huile essentielle :**

A partir d'une solution mère de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, quatre concentrations : 50mg /ml , 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, et 6,25 mg/ml ont été préparé.

Les différentes concentrations de l'huile ont été ajoutées au lait puis homogénéisées. Un témoin négatif a été préparé sans addition de l'huile essentielle (**photo 10**).



Photo 05: Gélose Muller Hinton dans les boîtes de Pétri à 4mm.

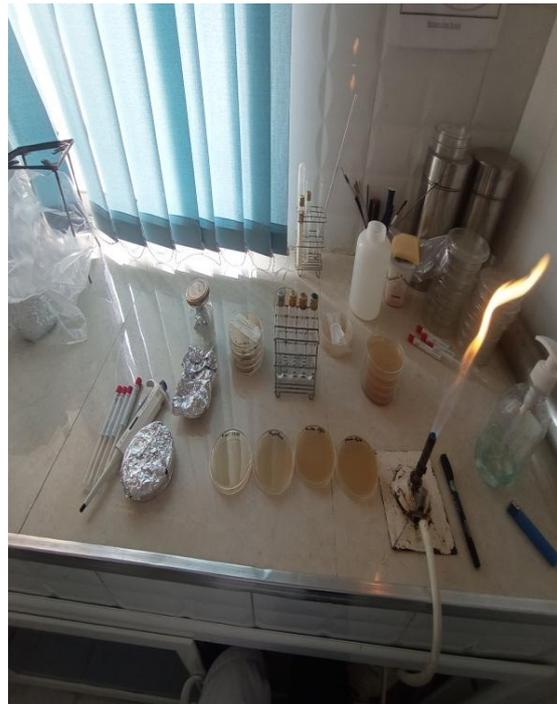


Photo 06: Ensemencement à partir de l'inoculum bactérien en nappe

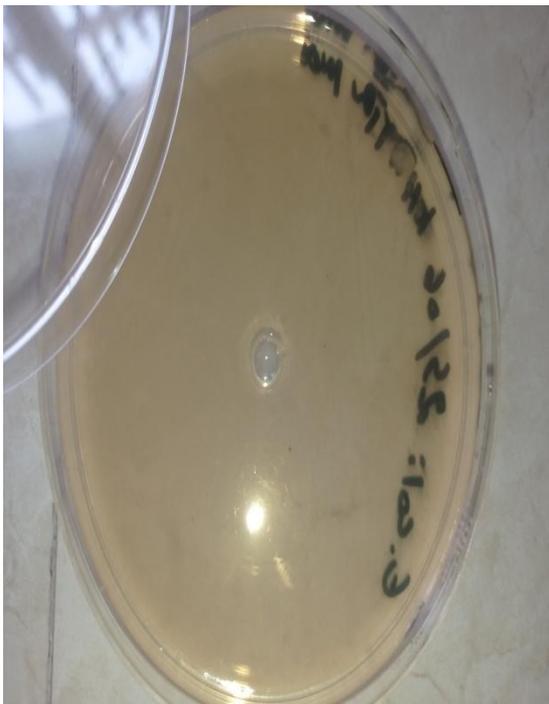


Photo 07: Technique de puits dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne.



Photo 08: Prélèvement du lait.



Photo 09: Préparation des flacons du lait pour la bio conservation.



Photo 10: Dépôt de l'huile essentielle dans les flacons du lait.

Analyses du lait cru pendant la conservation

- **Analyses physico-chimiques:**
- **pH:**

Le pH est obtenu à l'aide d'un pH-mètre. La valeur est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans le lait (**photo 11**).

- **Acidité de Dornic:**

À 10 ml de lait, on ajoute deux gouttes de phénol phtaléine à 1 % puis on suivi l'acidité en ajoutant la solution de la soude à 0.1 N goutte à goutte à l'aide d'une burette à robinet jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistante (**photo 12**). Le résultat est lu directement depuis le tube.



Photo 11: PH-mètre.



Photo 12: Mesure de l'acidité de Dornic.

III. Résultats et discussion :

➤ **Rendement:**

Le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 01: le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

La méthode	Hydrodistillation de type Clevenger
La durée	2h 30min
Le rendement (%)	1.25 %



Photo 13: La quantité en huile essentielle extraite par rapport à la quantité de la plante initiale.

D'après le tableau on constate qu'après l'extraction des parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* par l'hydrodistillation notre espèce a donné un rendement de 1.25 % qui est conforme aux normes d'AFNOR (0.5 à 2 %).

En comparaison avec d'autres travaux de recherche ce taux est équivalent à celui de l'huile essentielle extraite de la même espèce, récoltée dans la région de Mascara (1.29 %) (Belkhodja H.,2016).

Les travaux de Mouas , (2018) , effectués sur le romarin d'Ain Ouassara (Djelfa) et de Sidi Kebir (Blida), montrent des résultats inférieurs à ceux qu'on a obtenu , avec un

rendement en huiles essentielles plus élevé enregistré au niveau de l'écotype Blida (0.76%) suivi par celui de Djelfa (0.58%) .

Ce rendement peut être considéré comme important par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source d'huiles essentielles. Il est plus élevé que celui de Menthe (0.72%) et de Thymus (0.65%) (**Ismaili et al., 2016**).

Les variations constatées dans le rendement peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à la plante elle-même (la période de la récolte et la partie utilisée).

Selon Jordan *et al.* , le meilleur rendement en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* est trouvé en été, coïncide avec la haute température et la plus photopériode. Ces mêmes auteurs révèlent que l'été est le meilleur moment pour exploiter les huiles de romarin.

D'autres facteurs peuvent influencer le rendement d'extraction: les matériaux des appareils utilisés, la méthode et la durée d'extraction , la régularité de la chauffe, le refroidissement du distillat ...etc. (Bruneton, 1993 ; Bennadja *et al.*, 2013).

➤ La cinétique d'extraction de l'huile essentielle :

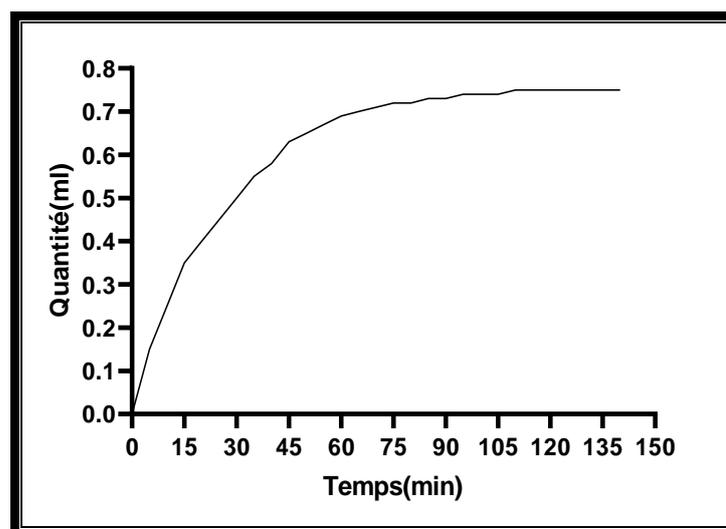


Figure 10: La cinétique d'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Les résultats montrent que l'extraction en huile essentielle passe par deux phases. La première phase se caractérise par l'augmentation du quantité d'extraction en huile

essentielle, de 0,1 à 0,69 ml suite à l'éclatement intense des poches schizolysigènes. Cette augmentation s'observe dans l'intervalle de temps de 5 à 90 minutes. La deuxième phase s'observe à partir de 90 minutes et se caractérise par un palier où la quantité d'extraction a atteint un taux constant de $0,7 \pm 0,05$ ml. Cette stagnation est due à l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle.

➤ **L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* :**

L'activité antibactérienne d'huile essentielle a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'huile essentielle à tester vis-à-vis des bactéries suivantes : *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats obtenus pour déterminer le pouvoir antibactérien d'huile essentielle sont présentés dans la figure suivante (les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures):

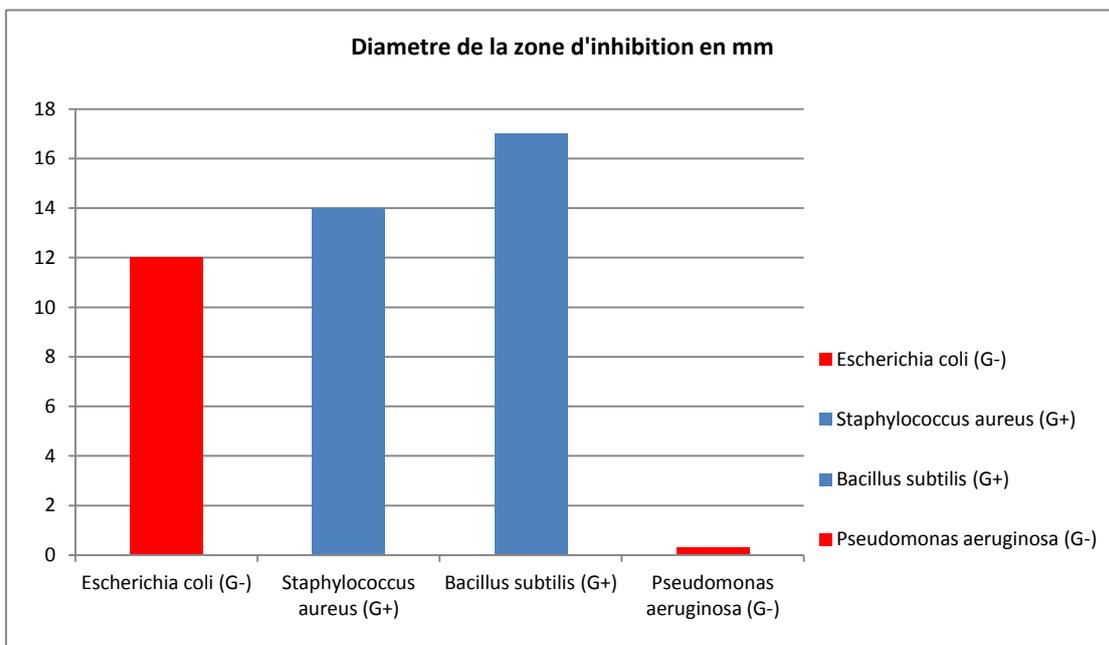


Figure 11: Représentation graphique de sensibilité des souches.

À l'issue des résultats obtenus à travers de la figure précédente, il ressort que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* présente une activité antibactérienne contre trois bactéries sur quatre bactéries examinées.

Selon la transcription des valeurs des diamètres d'inhibition présentées dans la figure, les souches *Escherichia coli* et les *Staphylococcus aureus* sont classées sensibles à l'huile essentielle de romarin avec une zone d'inhibition de 12 mm et 14 mm et la bactérie *Bacillus subtilis* est classée très sensible avec une zone d'inhibition de 17 mm. Par contre, *Pseudomonas aeruginosa* a une résistance extrême (0 mm) vis-à-vis de cette huile essentielle (**photo 14,15, 16,17**).

Dans notre étude, l'huile essentielle a été jugé plus efficace sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif ce qui est conforme avec des études antérieures où les huiles essentielles présente une activité antibactérienne considérable contre les bactéries à gram positif que les bactéries à Gram négatif.

Le type des bactéries a une influence sur l'action des huiles essentielles ou il était observé que les bactéries de gram positif sont plus sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries de gram négatif; Cette différence de sensibilité est due à la structure de leur membrane cellulaire ou les bactéries de gram positif n'ont pas la membrane externe qui peut être la raison pour laquelle elles seraient plus sensibles à l'action des composés des huiles essentielles et les bactérie gram négatives sont composées de deux couches qui protègent la cellule et assurent une rigidité; En effet, la membrane des bactéries de gram négatif rend leurs surface très hydrophobe (barrière efficace de perméabilité) tandis que les acides lipotéichoïques de la membrane cellulaire des bactéries de gram positif peuvent faciliter la pénétration des composés hydrophobes (**Mona et al., 2013**).

Différents auteurs attribuent l'activité antimicrobienne des huiles essentielles à leurs degrés d'hydrophobicités (caractéristique lipophile) (**GUTIERREZ J. et al.2008, TAJKARIMI M., et al., 2010**).

Sikkema *et al.*, (1994) ; Okoh *et al.*, (2010), expliquent que la caractéristique hydrophobe des huiles essentielles permet à ces dernières de se dissoudre dans les lipides des membranes

cellulaires et mitochondriales, ce qui provoqueraient des perturbations de la structure cellulaire qui aboutiraient en définitif à la fuite du contenu intracellulaire du microorganisme

Les investigations de Hindou et al. (1989) ont prouvé que *P. aeruginosa* est révélée la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes.

Pseudomonas aeruginosa a la réputation d'être très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail composés organiques (**Tasso et Nychas, 1995**).



Photo 14: Zone d'inhibition chez *Escherichia coli* (technique de puits)

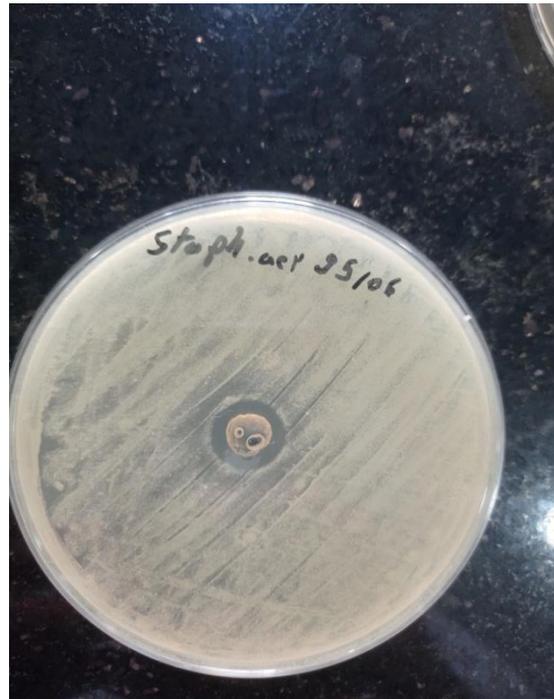


Photo 15: Zone d'inhibition chez *Staphylococcus aureus* (technique de puits)

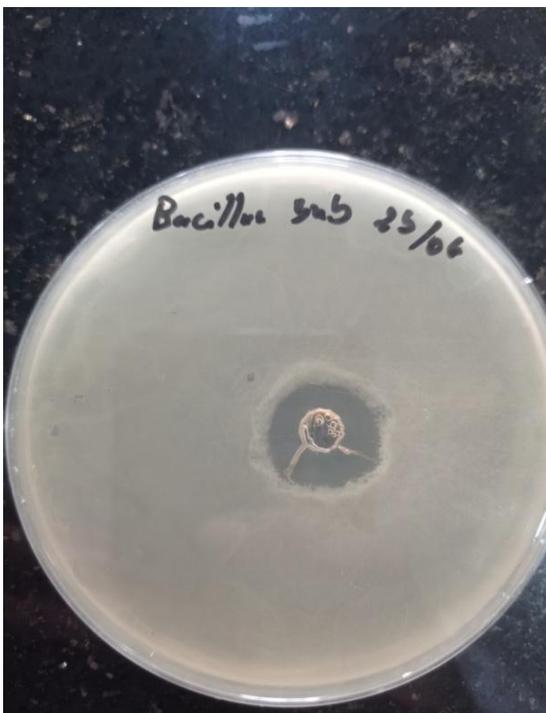


Photo 16: Zone d'inhibition chez *Bacillus subtilis* (technique de puits).

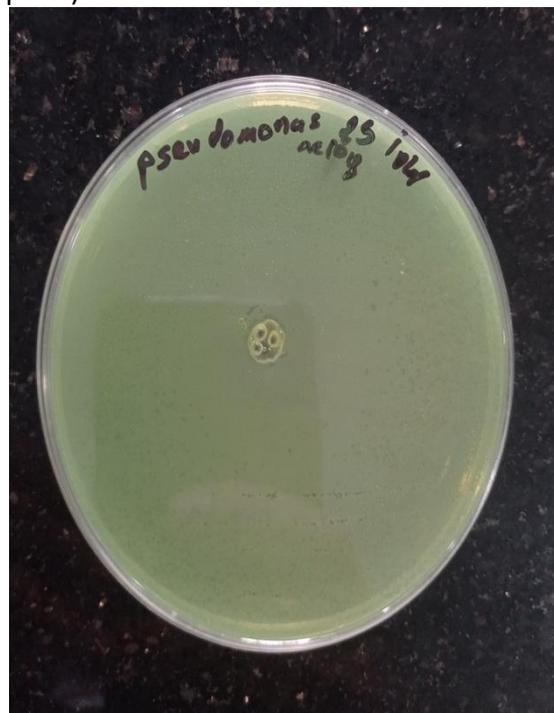


Photo 17: Zone d'inhibition chez *Pseudomonas aeruginosa* (technique de puits).

➤ Les analyses du lait cru pendant la conservation:

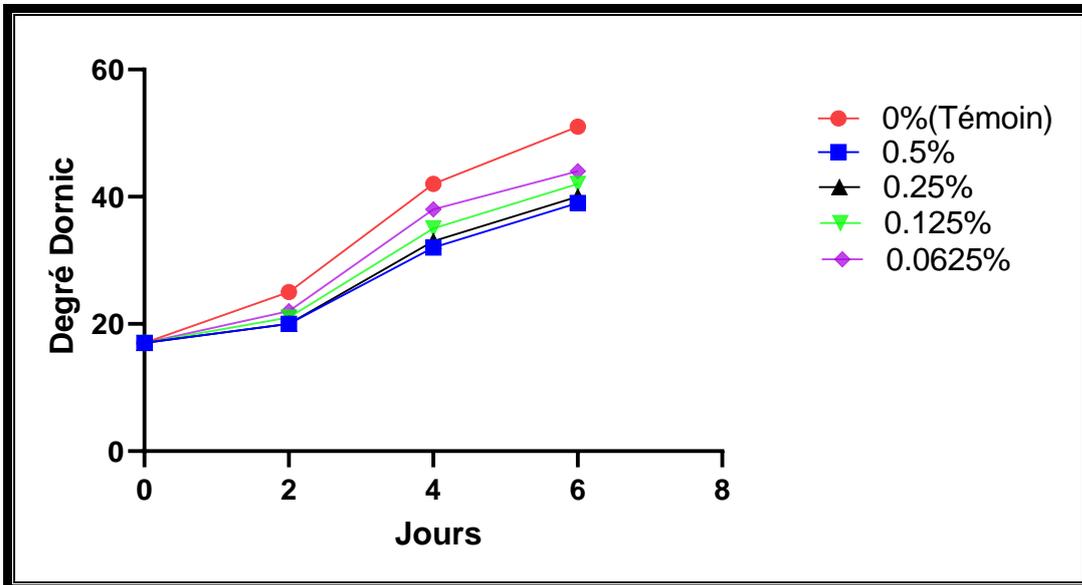


Figure 12 : Variation de l'acidité de Dornic en fonction du temps de stockage à une température de 4°C.

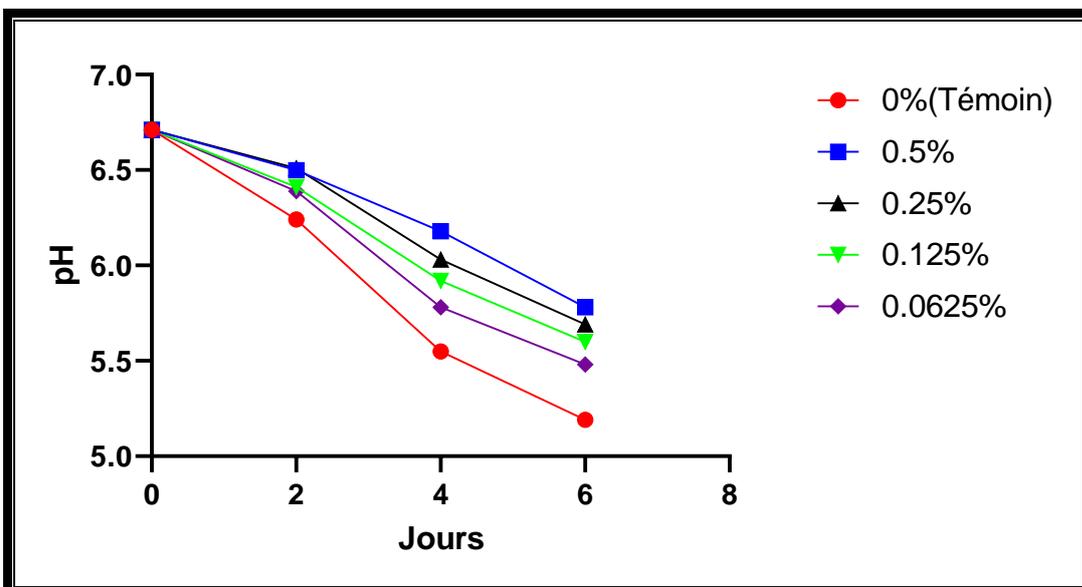


Figure 13 : Variation du pH en fonction du temps de stockage à une température de 4°C.

Selon la figure 12 le suivi de l'évolution de l'acidité de Doronic au cours du temps montre que l'acidité de Dornic augmente rapidement dans le lait témoin négatif par rapport aux laits traités par l'huile essentielle. L'acidité de lait témoin est révélée plus élevée que les laits traités par l'huile essentielle.

Selon la figure 13 le suivi de l'évolution du pH au cours du temps montre que le pH du lait témoin négatif diminue plus rapidement que les laits traités par l'huile essentielle. Le pH du lait témoin est révélé plus acide que le pH des laits traité par l'huile essentielle.

Ces résultats montrent l'impact de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* dans le lait cru. L'huile essentielle a une activité antibactérienne et a donc le potentiel d'inhiber le développement de bactéries qui fermentent le lactose en acide lactique, ce qui ralentit l'acidification du lait et ralentit ainsi sa dégradation.

Le pH du lait dépend de son état de fraîcheur. il est d'environ 6,7 pour un lait frais puis il diminue au cours du temps **(CIPC Lait,2011)**.

La fermentation du lactose aboutit à la production d'acide lactique. Les streptocoques sont les premiers germes acidifiants intervenant par abaissement du pH et par augmentation de l'acidité, puis viennent les lactobacilles acidophiles qui, en se proliférant, abaissent d'avantage le pH et entravent la croissance d'autres germes **(Medjoudj et Salhi, 2013)**.

Conclusion :

Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif : la valorisation des parties aériennes de romarin (*Rosmarinus officinalis*) par l'utilisation de son huile essentielle comme agent naturel conservateur du lait cru.

Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes : Le rendement moyen en huile essentielle de romarin obtenu par hydro distillation est de l'ordre de 1.25 %. L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle par la méthode de puits a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antibactérien vis-à-vis des bactéries étudiées: *B. subtilis* , *S. aureus*, *E. coli*, tandis que *P. aeruginosa* s'est révélée résistante.

Les différents essais concernant l'incorporation de l'huile essentielle dans le lait ont montré que cette huile a menée une stabilité du lait. En effet les résultats des analyses physiques et chimiques indiquent que les laits à l'huile essentielle de romarin sont plus stables que le lait témoin et que le lait à 0,5% d'HE est plus stable que les laits à 0,125% et 0,25% et 0,0625%.

Au terme de ce travail, les résultats ont montrés que l'huile essentielle de romarin témoigne une activité antibactérienne et un ralentissement de processus d'altération du lait, ces études pourront être approfondies par d'autres, donc il est souhaitable:

- ✓ De déterminer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) d'huile essentielle vis-à-vis des bactéries et une étude microbiologique du lait traité par l'huile essentielle au cours de la bioconservation.
- ✓ De déterminer les composants de l'huile essentielle de *R. officinalis* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) ;
- ✓ D'extraire les constituants actifs de l'huile essentielle de *R. officinalis* via des études photochimiques spectrales et de les appliquer directement dans le lait.

Références

1. **Bouix M. et Leveau J.Y. 1984:** Contrôle Microbiologique, biotechnologie. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 469 p.
2. **Dossou J., Hounzangbe-Adote S., Soule H., 2006:** Production et transformation du lait frais en fromage peuhl au Bénin. Guide de bonnes pratiques, GRET CAD/FSA, 33 p.
3. **Essawi T. et Srour M., 2000 :** Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology, 343-349 p.
4. **Mouna M., 2015:** Activité antibactérienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camendulensis, Thèse de doctorat, université Kasdi Merbah, Ouargla.
5. **Aboutayb R., 2009:** Technologie du lait et dérivés laitiers <http://www.azaquar.com>.
6. **LARPENT J, 1997.** Microbiologie alimentaire. Paris : Lavoisier.
7. **Arezki B., 2018:** L'Office national interprofessionnel du lait : les algériens consomment annuellement 55 litres de lait, en plus de la moyenne mondiale. Article publié en 2018.
8. **LAROUSSE AGRICOLE., 2002.** 767p.
9. **Anonyme. 2000.** Manuel de transformation du lait/chapitre 01, p2.
10. **Leroy A.M. 1965.** « Le producteur du lait «guide du contrôle laitier et beurrier agrude».
11. **Cheftel J.C et Cheftel H., 1996.** Introduction à la biochimie, à la technologie des aliments. Vol 1. Edition : Lavoisier, Paris. pp : 43.
12. **Pougheon S et Goursaud J., 2001:** Le lait et ses constituants caractéristiques physicochimiques. In : lait nutrition et santé. Ed. Tec et Doc. Lavoisier Paris. pp : 4- 4
13. **FREDOT E., 2006:** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages).
14. **Manuel de transformation du lait, 2017 /** Chapitre 2 -page 23-30
15. **FREDOT E., 2006.** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier: 25 (397 pages)
16. **Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P et Simpson R., 2002:** Composition propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In : Science et technologie du lait- Transformation du lait. Presse International Polytechnique Canada.

17. **JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P. et BRULE G., 2007:** Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 17 (456pages).
18. **Linden G et Lorient D., 1994:**. Biochimie agro-alimentaire : Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition. Masson. Paris. p141-163.
19. **Boyaval P., Corre C., Depuis C., et Roussel F., 1995:**Effect of free fatty acid on propionic acid bacteria. Le lait. 75. P17-29.
20. **FAO, 2019:**Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.
21. **THAPON J.L., 2005:** Science et technologie du lait, Agro campus-Rennes, France: 14(77 pages).
22. **Debry, 2001:**Lait, nutrition et santé, Edition : Tec et Doc, Lavoisier, Paris.p21,556.
23. **GAUCHERON F., 2004:** Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages).
24. **Vignola C., 2002:** Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechniques, Canada. pp : 3-75.600p
25. **Veisseyre R.,1975 :**Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait, livre 3eme édition,Paris 714 p.
26. **Vierling. (2008) :** Aliments et boissons filières et produits. 3ème édition Biosciences et techniques.Paris.pp : 15-16
27. **Mathieu J., (1998).** Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la Roche-Sur-Foron. Initiation à la physico-chimie du lait. Ed. Tec & Doc : Lavoisier, Paris. pp : 12-210.
28. **CIPC Lait Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles., 2011:** Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait 2011-02.
29. **Luquet FM, (1985).** Laits et produits laitiers ; vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Société Scientifique d'hygiène Alimentaire. Edition Technologie et documentation- Lavoisier. Paris, 139p
30. **GUIRAUD J.P., 1998 :** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD. Paris volume 1. p136 et p.141 volume 2 P282 et p 292.
31. **Billon P., Corbet V., Leclerc M., Menard JL., Sauvee O. et Troboa D., 2009:** Traite des vaches laitière, matériel, installation, entretient. 1 ère Edition France Agricole. Institut d'élevage. Produire mieux. 849 p
32. **FOTOU k ., TZORZ A., VOIDAROU Ch., ALEXOPOULOS A.,PLESSAS S, .AVGERIS I., BEZIRTGLOUE, AKRIDA-DEMERTZI K.,DEMERTZI P.G.,2011:** Isolation of Microbiol pathogens subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epuris (Greece) and their role in its hygiene .Anaerobe p17, 315, 319.

33. **Bonnyfoy C., Guillet F, Luyral G., Bourdis E-V., 2002** : Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires. Aquitaine : Doin, Paris. 248p.
34. **Cuq J.L., 2007**: Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du Languedoc. Université de Montpellier. pp: 20-25.
35. **Minor L. et Richard C., 1993**: Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur. Pp 112-120.
36. **ABDESSALAM A., 1984**: Contribution à l'étude du lait des ceintures laitières périurbaines de la zone cotonnière du Sénégal. Th. Méd. Vét., Dakar, IQ95, n021, 126p
37. **Brisabois A, Lafarge V, Brouillard A, de Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B et Thorel MF.,1997**: Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1). pp: 452-471. **Crump J.A. & Wain J., 2017**: Salmonella. *Int. Encycl. Public Heal.* **6**, 425-433
38. **Holschbach C.L. & Peek S.F., 2018**: Salmonella in Dairy Cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **34**(1), 133-154.
39. **J. D'Amico D. & Donnelly C.W., 2017**. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *In: Cheese*. Elsevier, 573-594.
40. **FAO, 2019**: Enteric infection due to Salmonella and Campylobacter. <http://www.fao.org/3/y5516e/y5516e05.htm>, (19/03/2019).
41. **Santé Publique, 2018**. Toxi-Infections Alimentaires Collectives 1 -49.
42. **ANSES, 2011**: Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: Campylobacter jejuni - Campylobacter coli. *anses* 79(1), 358.
43. **ANSES, 2011**: Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments: Listeria monocytogenes. *ANSES* 1 -17.
44. **Gérard A., El-Hajjaji S., Niyonzima E., Daube G. & Sindic M., 2018**: Prevalence and survival of Listeria monocytogenes in various types of cheese-A review. *Int. J. Dairy Technol.* **71** (4), p 825-843
45. **Akrami-Mohajeri F., Derakhshan Z., Ferrante M., Hamidiyan N., Soleymani M., Conti G.O. & Tafti R.D., 2018**: The prevalence and antimicrobial resistance of Listeria spp in raw milk and traditional dairy products delivered in Yazd, central Iran (2016). *Food Chem. Toxicol*,p 141-144.
46. **Sugrue I., Tobin C., Ross R.P., Stanton C. & Hill C., 2019**: Foodborne Pathogens and Zoonotic Diseases. *In: Raw Milk*. Elsevier, p259-272.

47. **FAO/OMS, 2005:** FAO/WHO Regional Meeting on Food Safety for the Near East. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/Meeting/009/y6024e/y6024e01.pdf>
48. **Panthi R.R., Jordan K.N., Kelly A.L. & Sheehan J.J. (Diarmuid), 2017:** Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. *In: Cheese*. Elsevier, p 23-50.
49. **DiversiFerm, 2014:** À Propos Du Lait Cru
50. **Ozturkoglu-Budak S. & De Vries R.P., 2017:** *Mold-ripened and raw milk cheeses: Production, risks, and benefits to human health*, Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan, Elsevier Inc., p 353-361.
51. **Lamontagne Michel Claud P, Champagne J, Reitz A, Sylvain M, Nancy G, Marysel, Julie J et Ismail F., 2002:** Microbiologie de lait. Science et technologie de lait École polytechnique de Montréal.
52. **Leyral G et Vierling É., 2007:** Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4e édition Biosciences et techniques. 87p
53. **Kim H, Hardy J, Novak G, Ramet JP et Weber W., 1982:** Les goûts anormaux du lait frais et reconstitué. Collection FAO Alimentation et nutrition n°35
54. **Heuchel V, Chatelin YM, Breau S, Sobolewski F, Blancard N, Baraton YetAyerbe A., 2003:** Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. Renc. Tech. Ruminant n°10. pp : 223-226.
55. **Medjoudj K et Salhi K., 2013:** Analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait cru collecté au niveau de la laiterie d'Amizour. Mémoire de Master professionnel, Sciences Alimentaires. Bejaia : Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 65 p.
56. **Petransxiene D., et Lapied L., 1981:** La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. Edition : Tech et Doc, Lavoisier. Paris. P: 228.
57. **Veisseyre R. 1979:** Technologie du lait constitution, récolte, traitement et transformation de lait. 3eme édition. Edition la maison rustique, Paris. pp : 112- 133.
58. **Académie des Technologies, Académie d'Agriculture de France AAF., 2004:** Rapport : Progrès technologiques au sein des industries alimentaires. Impact sur la qualité des produits. La filière laitière.
59. **EDQM, 2011 :** Pharmacopée Européenne. 7 édition.
60. **ANSM, 1965 :** Pharmacopée française. 8 édition.
61. **ISO, 2014:** Matières premières aromatiques naturelles - vocabulaire - matières premières aromatiques d'origine naturelle. ISO 9235, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

62. **Couic-Marinier F. et Lobstein A.,2013:** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques.
63. **Mallappa Kumara Swamy, Mohd Sayeed Akhtar , and Uma Rani Sinniah ,2016:** Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review.
64. **Bekhechi C., Abdelouahid D., 2010.** Les huiles essentielles. Office des publications universitaires. Alger. 7-43
65. **COSENTINO,S. et TUBEROSO, B. et PISANO, M.et F. PALMAS. 1999 :** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, Department of Experimental Biology, University of Cagliari, Sardinia, Italy and 2 Department of Toxicology, University of Cagliari, Sardinia, Italy
66. **Billerbeck, G. , 2000:**"Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'aspergillus niger. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur." *Faculté des sciences pharmaceutiques*, Institut national polytechnique de Toulouse (236).
67. **Zaika, L. L., 1988:** Spices and herbs -their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety* 9(2), 97-118.
68. **Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. ,2007:** "Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*". *Food Control*, **18**, 414-420.
69. **BRUNETON J., 1987:** Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier - Tech. & doc, 584.
70. **KESBI A., 2011:** Étude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'eucalyptus globulus dans la région de Ouargla. mémoire de master en génie des procédés. Ouargla : Universite Kasdi Marbah, 44p.
71. **CHACOU M. BASSOU k.,2007:** Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* Lisdue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES microbiologie. Université deKasdi Merbah Ouargla, 2007.pp.14-27.

72. **BOUAINE A., 2017:**étude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales : lentisque et myrte. Mémoire de master en science et techniques. Fès : université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 44p.
73. **ZAOUI A.,2012:** *Ecologie et systématique de genre Rosmarinus L. dans la région de sud algérois (wilaya de Djelfa)*.Thèse Mag. Univ. Djelfa.109p.
74. **TERZO M. et RASMONT P.,2007:***Les livrets de l'Agriculture n° 14 : Abeilles sauvages, bourdons et autres insectes pollinisateurs.* Ed. Victor Thomas, Paris.48 p.
- [30] **FRELY R.,2006:** *vosre beauté par les plantes* .Ed. ROMAGNAT :de Borée, France. 179 p.
75. **BURG N.,2014:** Les plantes : le romarin . Journal La Provence. N°146.
76. **BRUN CH.,2012:** Dossier des aromatiques : le Romarin .*article. Féminin bio.* France
77. **ZOUBEIDI CH.,2004:** *Etude des antioxydants dans le Rosmarinus officinalis (labiatea)*. Thèse Mag. Univ. Ouargla. 67 p.
78. **Auguste S.,1862:** Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne.
79. **Helmut G.,1996:**Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen.
80. **Rameau J., Mansion D., Dumé G.,2008:** Flore forestière française : Région méditerranéenne.
81. **Huguette M.,2008:** La route des épices.
82. **O.P.U.NT.WS.**Benston, Fleurs algériennes.P54.
83. **DELAVEAU P. et al. ,1985:** Secret et veryus des plantes médicinales. Deuxième édition, édition Sélection du Reader's Digest, Paris. p 463. Sciences de la Vie, n°29 : 11 -20
84. **Zermane A.,2010:** « Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes Agroalimentaires » ; thèse de doctorat, université de Mentouri ; Constantine.
85. **Zeghad N.,2009:** « Etude du contenu polyphénoliques de deux plantes médicinales D'intérêt économique (Thymus vulgarise, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur Activité antibactérienne » ; thèse de magistère thèse de magistère, université de Mentouri ; Constantine.
86. **Makhloufi A.,:**« Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux Plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (matri caria : Pubescents (des.) Et *Rosmarinus officinalis* l) et leur impact sur la conservation des Dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; université d'Boubaker belkaid.
87. **L'Organisation des Nations Unies pour l'éducation La science et la culture, 1960:***Les plantes médicinales des régions aride* .Ed. Oberthur, rennes, Paris.52p.

88. **Rameau J-C., Dumé G.,2008:** « Flore forestière française : Région méditerranéenne » Edition Forêt privée française ; pp 897.
89. **Eloutassi N.,2004:**« Elaboration de procédés Biotechnologiques pour la valorisation Du romarin (*Rosmarinus officinalis*) marocain » ; thèse de doctorat, université de Sidi Mohamed Ben Abdellah ; Fès.
90. **Boelens M.H.,1985:** The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L., **Pertumer and Favorist**,10, 21-37
91. **Granger R., Passet J., Arbouss G.,1973:** L'essence de *Rosmarinus officinalis* L., Part Cosm Sav France,3, (6), 307-312.
92. **Bhar H. et Balouk A.,2011:** *Les plantes aromatiques et médicinales ces plantes odorantes qui soulagent la douleur* .dossier.L'espace Marocain N° 68 / 2° Trimestre. Maroc, 42 p
93. **Ponce A G., Fritz R., Del Valle C., Roura S. I., 2003:** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT-Food Science and Technology 36(7) : 679-684.
94. **Guiraud J .P., 2003:**Microbiologie alimentaire. Eds. Dunod, Paris, p 395.
95. **Belkhodja H.,2016:** Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara : Evaluation biochimique des marqueurs d'ostéoarticulation et de l'activité biologique. Thèse de doctorat. Univ de Mascara.
96. **Mouas Y., 2018:** Effet comparatif des paramètres physiologiques, biochimiques et thérapeutiques de romarin *Rosmarinus officinalis* L. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques, Univ. Blida 1.
97. **Ismaili, R., Lamiri, A., & Moustaid, K., 2016:** Study of anti-eczema activity of essentials oils of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum* and *Mentha spicata* from Morocco. International Journal of Innovation and Applied Studies 14 (1): 113.
98. **Jordan M.J., Lax V., Rota M.C., Loran S. & Sotomayor J. A., 2013 :**“Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract”, Industrial Crops and Products, V.48, pp 144– 152.
99. **Bruneton J., 1993:** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire, 3^{eme} édition. 634 p.
100. **Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hadeif Y. and Chefrour A., 2013:** Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. Journal of Life Sciences. 7(8) : 814-819.

101. **Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., 2006** : Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne, pp.1-18
102. **MONA M. ORABY, ALI M. EL-BOROLLOS, 2013**: Essential oils from some Egyptian aromatic plants as an antimicrobial agent and for prevention of potato virus Y transmission by aphids. *Annals of Agricultural Science* 58, 97–103.
103. **GUTIERREZ J., BARRY-RYAN C., BOURKE P., 2008**: The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of Food Microbiology*, Vol. 124. Pp 91-97. 63
104. **TAJKARIMI M., S.A. IBRAHIM , D.O. CLIVER, 2010**: Antimicrobial herb and spice compounds in food. *food control*.
105. **SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., Poolman B., 1994**: Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, N°. 11. Pp 8022-8028.
106. **OKOH O., SADIMENKO A.P., AFOLAYAN A.J., 2010**: Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, Vol. 120. Pp 308-312.
107. **Hinou J.B. Harvala C.E., Hinou E.B., 1989**: Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie* 44, 4 p
108. **Tassou C., Drosinos E. H., Nychas G.-J. E., 1995**: Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp. 593– 600.
109. **FLEURETTE, J., FRENEY J., 1995**: "Antiseptie et désinfection". gas chromatography and enantioselective gas chromatography–mass spectrometry analyses. *Journal of Chromatography A* 1212, 114–123.
110. **CIPC Lait Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles , 2011**: Avis relatif à la définition et aux méthodes d’analyse de l’acidité du lait n°2011-02.

Annexes

Fiche de renseignements 01

le :.....

La Cinétique d'extraction de l'huile essentielle:

Le temps (min)	La quantité d'huile essentielle (ml)
0 min	
5 min	
10 min	
15 min	
20 min	
25 min	
30 min	
35 min	
40 min	
45 min	
50 min	
55 min	
60 min	
65 min	
70 min	
75 min	
80 min	
85 min	
90 min	
95 min	
100 min	
105 min	
110 min	
115 min	
120 min	
125 min	
130 min	
135 min	
140 min	

Fiche de renseignements 02

le :.....

Les analyses de bio conservation du lait:

	<i>PH</i>					<i>Acidité de Dornic</i>				
HE	0%	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%	0%	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%
J0										
J2										
J4										
J6										
J8										