



DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mr BOUADJEMI khaled

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

THÈME

**Etude comparative des différents parties de la plante
romarin «*Rosmarinus officinalis*» par rapport aux
pouvoirs antibiotiques sur le yaourt**

Soutenue publiquement le 04 /07 /2018

DEVANT LE JURY

Président	M ^{ME} AIT CHAABANE.O	MCB	U. Mostaganem
Encadreur	M BENMILOUD.D	MA	U. Mostaganem
Examineur	M BELABBAS.M	MA	U. Mostaganem.
Examineur	M AIT SAADA	MCA	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Biochimie N°01 de la faculté SNV-U.Mostaganem

Année universitaire 2017 / 2018

Remerciement

Avant tous, mes remerciements infinis à « Dieu le tous Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Monsieur **BENMILOUD .D** maître assistante. A l'université de Mostaganem qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

J'aimerais également remercier Monsieur **BENABDELMOUMENE.D** Docteur en Biochimie Alimentaire à l'université de Mostaganem pour leurs encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie vivement **M. Abbassa Hammou** , **M. Seffih abdessamed** et **M. Hakim El-katroussi** pour leur conseil très précieux et leur aide pendant de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury **Mme. AIT CHAABANE.O**, **M. AIT SAADA .D** et **M. BELABBAS.M** de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres de laboratoire de biochimie et microbiologie de l'université de Mostaganem pour leur aide précieuse.

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

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de agronomie l'université de Mostaganem pour l'aide pendant ma formation d'étude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :

A mes très chers parents qui ont sacrifié de leur existante pour bâtir la mienne

Qui par leur précieux conseils et contient ont sa me guider ver la voix de la réussite.

A ma petite famille

A mes chers frères

A mes chères sœurs

A mess très chers amis pour leur aide et encouragement pendant cette Période de thèse.

A toute la promotion biotechnologie agroalimentaire 2018.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو رصد حموضة اللين وإضافة تركيزات مختلفة (5% و 10%) من الزيوت الأساسية للروزماري «إكليل الجبل المخزنية» تم الحصول عليها من مناطق مختلفة للنبته (ورقة، زهرة، ساق و جذر) تم قياس حموضة الزبادي خلال فترتين ، التخمر وبعد التخمير

أظهرت النتائج أن تأثير التركيز لم يكن معنويا ($P>0.05$) في حين كان تأثير جزء النبتة معنويا ($P<0.05$) القيم التي تم الحصول عليها على حموضة اللين وإضافة العينات من زيوت الجذور اقل خلال الفترتين (التخمير وبعد التخمير) ، في حين تم تسجيل اعلى قيم الحموضة في منتجات اضيف إليها الزيت الأساسي للأوراق ، تشير هذه النتائج بشكل عام أن الزيت الأساسي للجذور له قدرة أقوى لتثبيط البكتيريا حمض اللاكتيك مقارنة مع الأجزاء الأخرى للنبته. النتائج التي تم الحصول عليها مرضية لدرجة تجعل من الممكن إنتاج منتج أكثر ملائمة للحفظ. هذا العمل يحتاج دائما للتأكيد والتعميق من خلال دراسات اخرى.

الكلمات المفتاح: الزبادي ، الزيوت الأساسية ، إكليل الجبل المخزنية ، حموضة الدورنيك .

Résumé

L'objectif de cette étude consiste à suivre l'évolution de l'acidité du yaourt additionné avec des différentes concentrations (5%,10%) d'huiles essentielles (HE) du romarin «*Rosmarinus officinalis*» obtenues à partir des différentes parties du plant (feuille, fleur, tige et racine).

L'acidité du yaourt a été mesurée pendant deux périodes, fermentation et post acidification.

Les résultats montrent que l'effet concentration n'a pas été significatif ($p > 0.05$), par contre l'effet partie végétal a été significatif ($p < 0.05$).

Les valeurs de l'acidité obtenues sur les échantillons de yaourt additionnés avec l'HE des racines ont été plus faibles pendant les deux périodes (fermentation et post acidification), tandis que les plus fortes valeurs d'acidité ont été enregistrées sur les produits additionnés avec l'HE provenant des feuilles, ces résultats indiquent d'une manière générale que l'HE des racines présentent un pouvoir inhibiteur plus fort vis-à-vis des bactéries lactiques comparées à celles des autres parties végétales.

Les résultats obtenus sont satisfaisants dans la mesure où ils permettent de fabriquer un produit plus apte à la conservation.

Ce travail nécessite toute fois d'être confirmé et approfondi par d'autres études.

Mots clés: Yaourt, huile essentielle, *Rosmarinus officinalis*, l'acidité Dornic

Abstract

The objective of this study is to follow the evolution of the acidity of added yoghurt with different concentrations (5%, 10%) of essential oils (HE) rosemary "*Rosmarinus officinalis*" obtained from different parts of the plant (leaf, flower, stem and root).

The acidity of the yoghurt was measured during two periods, fermentation and post acidification.

The results show that the concentration effect was not significant ($p > 0.05$), whereas the plant part effect was significant ($p < 0.05$).

the acidity values obtained on the yoghurt samples added to the HE of the roots were lower during both periods (fermentation and post acidification), while the highest acidity values were recorded on the added products with HE from the leaves, these results indicate generally that root HE exhibits stronger inhibitory potency against lactic acid bacteria compared to other plant parts.

The results obtained are satisfactory to the extent that they make it possible to produce a product more suitable for preservation.

This work always needs to be confirmed and deepened by other studies.

Keywords: Yogurt, essential oil, *Rosmarinus officinalis*, Dornic acidity

LISTE DES FIGURES

Figure01: *Rosmarinus officinalis* L.....03

Figure02: Photo de *Rosmarinus officinalis* L.....04

Figure03: Feuille de *Rosmarinus officinalis* L.....04

Figure04 : La fleur de *Rosmarinus officinalis* L.....05

Figure 05 : Racine de *Rosmarinus officinalis* L.....05

Figure 06 : Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du romarin.....06

Figure 07: Aspects morphologiques du Romarin.....06

Figure08: L'hydrodistillation traditionnelle.....12

Figure09 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....13

Figure 10: Schéma des principales cibles cellulaires des constituants des extraits méthanoliques et aqueux à effet antibactérien22

Figure11 : Schéma illustrant les interactions de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait.....25

Figure12: schéma de croissance relative des bactéries du yaourt..... 26

Figure13: Schéma de protocole expérimental.....27

Figure14: Appareillage utilisé pendant la distillation d'huile essentielle30

Figure 15: évolution de l'acidité du yaourt étuvé à base de [] différent de ≠ parties du plant romarin durant la fermentation.....34

Figure 16 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé à base de [] différent de ≠ parties du plant romarin durant du post acidification.....36

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Aspect botanique

I.1. plante sélectionné <i>Rosmarinus officinalis</i>	02
I.2.Origine du nom.....	02
I.3.Distribution géographique	02
I.4.Description botanique	03
I.4.1. Feuille.....	04
I.4.2.fleure.....	04
I.4.3-racine.....	05
I.4.4-tige.....	05
I.5.Classification.....	06
I.5.1.Classification classique.....	06

Chapitre II : Aspect biologique

II.1.Principes actifs.....	07
II.2.Composition chimique de romarin.....	07

II.3. Facteurs influençant la composition.....	08
II.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin.....	08
II.5. Utilisation.....	09

Chapitre III : Les Technique d'extractions

III .1. Définition.....	10
III.2. Distillation.....	10
III.3. Extractions par les solvants.....	12
III.4. Extraction par Hydrodistillation.....	12
III.5. L'expression a froid.....	13
III.6. Extraction au CO2 supercritique.....	14
III.7. Hydrodistillation par micro- ondes sous vide.....	14
III.8. L'enfleurage.....	15
III.9. Autres techniques.....	15

Chapitre IV : pouvoir antibactérienne (bactéricide et bactériostatique)

IV.1. Definition.....	17
IV.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide.....	17
IV.2.1. bactericide.....	17
IV.2.2. bactériostatique.....	18
IV. 3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	18
IV. 4. Morphologie des bactéries lactique.....	18
IV.4.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	19
IV.4.2. <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus Lb</i>	19
IV.5. Mécanismes d'action de l'extrait sur les bactéries.....	20

Chapitre V : Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne

V .1. Techniques de détermination de l'activité antimicrobienne.....	22
V .2.Techniques de screening des huiles essentielles.....	22
V.2.1. Aromatogramme	22
V.2.2. Technique de diffusion en puits.....	23
V .3. Techniques de détermination de concentration minimale CMI.....	23
V .3.1. Techniques de diffusion en milieu solide.....	23
V .3.2 Techniques de diffusion en milieu liquide.....	24
V.3.2.1 Test de microdilution.....	24
V.3.2.2 Test de macrodilution.....	24
V .3. 3Techniques de diffusion en phase vapeur	24
V.3.3.1 Méthode des micro-atmosphères.....	24
V .4.la lactofermentations.....	25

DEUXIEME PARTIE:MATERIELS ET METHODES

1. objectif.....	27
2. protocole expérimentale.....	27
3. Structure de stage.....	28
4. Matériels.....	28
4.1. Appareillage et produits chimiques.....	28
a. Appareillage.....	28
b.Produits chimiques.....	28
4.2 Matériel végétal.....	28

4.3 lait fermente.....	28
5. Méthodes.....	29
5.1. Extraction par La distillation (Entraînement à la vapeur d'eau).....	29
5.2. Procédé d'extraction.....	29
6. Plan expérimentale.....	31
7. Mesure de l'acidité.....	32
8. calculs statistique.....	32

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Interprétation des résultats de l'acidité.....	33
1. 1. Période de fermentation.....	33
a. Résultats.....	33
b. Interprétation.....	34
1. 2. Période de post acidification.....	35
a. Résultats.....	35
b. Interprétation.....	36
2. Discussion générale.....	37

Conclusion

Référence bibliographiques

Annexes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 01 : Masse et forme de chaque partie utilisée dans l'extraction31

Tableau n° 02 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé a base de [] différent de ≠ parties
du plante romarin durant la fermentation.....33

Tableau n° 03 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé a base de [] différent de ≠ parties
du plante romarin durant du post acidification.....35

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATF : Antifongique.

BL : Bactéries lactiques.

CMF : Concentration Minimale Fongicide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DI : Diamètre d’Inhibition.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DLC : date limite de consommation.

EtOH : éthanol.

EE : Extrait éthanolique.

EP : Extrait de Plante.

EV : Entraînement à la Vapeur.

EST : Extrait Sec Total.

FIL : Filière laitière.

HD : Hydrodistillation.

H.E : Huile Essentielle.

HIV : Virus de l’Immunodéficience Humaine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PAM : Plantes Aromatique et Médicinales.

SFME: Solvent Free Microwave Extraction

Ssp : sous-espèce.

UFC : Unité formant colonie.

VMHD: Vacuum Microwave Hydrodistillation.

Introduction

Depuis longtemps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies. Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles (**Goeb, 1999**).

Selon **Hostettmann(1997)**, connaître une plante ayant des vertus médicinales suppose pouvoir décrire sa morphologie et son anatomie, connaître son origine et son mode d'action, apprécier l'incidence de ceux-ci sur sa qualité, analyser sa composition chimique et les facteurs qui peuvent la faire varier, connaître la structure et les propriétés des principes actifs aussi bien que leur activité pharmacologique, savoir apprécier la qualité par des éléments objectifs et mettre en œuvre des méthodes pour la contrôler et enfin d'appréhender tous les problèmes liés à l'utilisation des plantes et des produits qui sont issus: indication, contre -indication, effets secondaires, interactions médicamenteuses.

Rosmarinus officinalis est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des huiles essentielles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux. Aujourd'hui, le *Romarin* est entré dans la médecine moderne (**Hostettmann ,1997**)

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité anti bactérienne de l'extrait obtenu par la distillation de la plante ***Rosmarinus officinalis*** pour d'éventuelles utilisations comme agent naturel conservateur et aromatique dans le lait fermenté.

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoie et al., 2010**).

D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Holley et al., 2005**).

I.1. Plante sélectionné *Rosmarinus officinalis*

Le romarin est un arbrisseau qui se reconnaît de loin à son odeur pénétrante (**Beniston, 1984**).

Le romarin est connu depuis l'antiquité, c'est l'espèce la plus utilisée dans le méditerranéen surtout en Algérie. Elle possède plus de 3300 espèce et environ 200 genres.

Le romarin est retrouvé à l'état sauvage. Il peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen (**Emberger, 1960**) .en Algérie, nous la trouvons dans les jardins, les parcs des sociétés, des écoles.....et les zones cultivées à l'entrée.

I.2.Origine du nom

Le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin

«Ros» rosée

«Marinus»: marin ou de marin

- **Nom commun** : Romarin

- **Noms arabe** : Iklil Al Jabal, Klil, Hatssa louban, Hassalban, Lazir ,Azlîr, Ouzbir ,Aklel, Touzala (**O.P.U.NT.WS.Benston**).

- **Autre nom** : herbes aux couronnes, herbes aux troubadours, encensier, arbre de marine, rose de mere, rose de marine, roumaniou, roumarine.

- **Nom scientifique** : *Rosmarinus officinalis L.*, le mot romarin (*Rosmarinus*)

- **Dérive du latin** «Ros» rosée ; «Marinus» : marin ou de marine et en anglophones: Rosmary (:<http://nature.jardin.free.fr/>).

I.3.Distribution géographique

Plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie (**Quezel et Santa, 1963**).

le *Rosmarinus officinalis* est originaire du bassin méditerranéen (**Iserin et al., 2001**).

Commun dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec

(**Schauenberg et Paris, 1977**).

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires.



Figure01: *Rosmarinus officinalis* L. Djebel Antar, Béchar (Makhloufi Ahmed)

Appellations régionales en Algérie : En plus souvent

Région de l'Est : Eklil

Région de l'Ouest : Helhal

Région du Centre : Yazir (O.P.U. NT. WS. Benston)

I.4.Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) (Wikipédia,2008).



Figure02: Photo de *Rosmarinus officinalis* L (Wikipédia, 2008).

I.4.1. Feuille

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (gonzalez-trujano et al., 2007 ; Atik Bekkara et al., 2007).



Figure03: Feuille de *Rosmarinus officinalis* L Source (Academic, 2000-2014)

I.4.2. Fleure

Les fleurs sont des pentamères, en général Hermaphrodites. Le calice est plus ou moins bilabié persistant et la corolle bilabiée, longuement tubuleuse, parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre inférieure trilobée, la supérieure est bilobée.

L'androcée est formé de 4 étamines, la cinquième étant très réduite, parfois 2 étamines et 2 staminodes. Le Gynécée forme 2 carpelles biovulés subdivisés chacun par une fausse cloison en 2 logettes uniovulées (Madadori ,1982).le style bifide gymno basique est le fruit constitué par 3 akènes plus ou moins soudées par leur face inter.



Figure04 : La fleur de *Rosmarinus officinalis* L Source (Valter Jacinto ,2015)

I.4.3.racine

C'est la partie souterraine de la plante, spécialisée dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux et dans la fixation au sol, la racine du *Rosmarinus officinalis* est profonde et pivotante.



Figure 05 : Racine de *Rosmarinus officinalis* L. (paprikaetchocolat.wordpress.com)

I.4.4.tige

Arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètres cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme axillaire plus ou moins simulant des épis (Sanon, 1992).

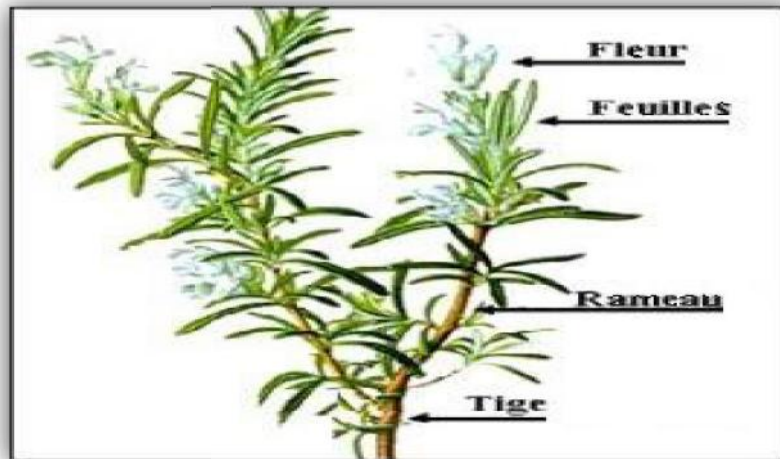


Figure 06 : Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du *romarin* (Sanon, 1992).

I.5.Classification :

I.5.1.Classification classique

La classification des lamiacées selon Quezel et Santa:



Règne Plantae
Embranchement Spermaphytes
Sous embranchement Angiospermes
Classe Dicotylédones
Ordre Lamiales (labiales)
Sous ordre : Lamiales
Familles Lamiaceae
Genre *Rosmarinus*
Espèce *Rosmarinus officinalis*
(Quezel et Santa, 1963).

Figure 07: Aspects morphologiques du *Rosmarinus* (Quezel et Santa, 1963).

II.1.Principes actifs

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- Les acides phénoliques : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique (**Ibañez et al., 2003**).
- Les flavonoïdes : genkwanine, cirsimaritrine , ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline (**Okamura et al.,1994**) apigénine (**Yang et al., 2008**).

II.2.Composition chimique de romarin

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7à80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène.

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial , des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque , des acides gras organiques .

L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (**Bellakhdar, 1997**) et de la résine (**Beloued, 1998**).

Les sommités fleuries renferment une essence aromatique riche en camphre, en cinéole, en alpha-pinène, en bornéol et en camphène.

Elle est riche en tanins, en flavonoïdes (apigénine, diosmine), en diterpènes tricycliques, triterpènes et en acides-phénols, dont l'acide rosmarinique et la rosmaricine.

Entre autre, **Gonzalez trujano** et ses collaborateurs (**2007**). Ont démontré d'après un criblage phytochimique la présence de flavonoïdes, des tanins, des saponines et l'absence des alcaloïdes.

Concernant les éléments minéraux, la spectrométrie d'émission atomique à pue identifié 18 éléments :

Al : 146.48 mg/kg ; Ca : 7791.80 mg/kg ; Fe : 330.16 mg/kg ; K : 14916.23 mg/kg ; Mg : 1634.55 mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97.36 mg/kg ; Sr : 74 .65 mg/kg (**Arslan et al., 2007**).

II.3. Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (**Svobda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2003**).

II.4. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques (**Gianmario et al ., 2007**). Et une action sur le système nerveux (**Gonzalez et al ., 2007**). Le romarin possède d'excellentes propriétés anti-oxydante et antimicrobienne (**Jones ,1998 ;Thoresen et Hildebrand ,2003**). Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes.

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

➤ Anti spasmodiques, diurétiques, hépato protectrices, soulagement des désordres respiratoires (**Lemonica et al., 1996**).

Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives (**Ibañez et al ., 2000**).

➤ Anti-inflammatoires, antimétastatiques (**Cheung et Tai ,2007**).

➤ Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires (**Singletary et Nelshoppen ,1991**) et la prolifération des tumeurs cutanées (**Huang et al ., 1994**).

➤ D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (**Offord et al ., 1995**). Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (**Aruoma et al ., 1996**). Alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (**Paris et al ., 1993**).

➤ On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (**Poletti, 1988**).

➤ Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, (**Soyal et al., 2007**). Ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste (**Heinrich et al., 2006**).

➤ Il est connu pour ces multiples propriétés. En raison de sa teneur en Huile essentielle, en médecine traditionnelle, le romarin aide à la digestion, traite les céphalées et les migraines, les blanchêtes, les coliques, améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs. Il est utilisé en usage externe pour soigner les rhumatismes et les troubles circulatoires (**Teuscher, 2005**). C'est un hypoglycémique, il soigne les affections oculaires (**Bnouham et al., 2002**). Et est utilisé comme antiseptique, cholagogue, antispasmodique, vulnéraire et diurétique (**Koubissi, 2002**). L'acide rosmarinique développe une activité antiinflammatoire in vivo chez le rat (**Anton et Wichil, 1999**). L'infusion de feuilles de romarin, calme les nerfs, surtout au moment de la ménopause (**Volak et Stodola, 1983**). Aussi permet de lutter contre certains agents pathogènes : antimycosique et antibactérien, les affections de la peau : infections, plaies, nettoyage de la peau et des zones génitales. Accélère la pousse des cheveux. L'huile essentielle de Romarin peut déclencher des convulsions et des crises d'épilepsie.

II.5.Utilisation

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique

Il est considérée utile pour contrôler l'érosion du sol (**Heinrich et al.,2006**).

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (**Arnold et al., 1997**).

Il est utilisé sous diverses formes :

- **Décoction** : le faire bouillir en même temps avec de l'eau.
- **Infusion** : le mettre dans un liquide initialement bouillant et le laisser refroidir afin qu'il libère tout les éléments actifs.
- **Autres** : sous forme d'huiles essentielles(en distillant les feuilles), gélules ou bains (**Chen et Ho, 1995**).

III .1.Définition

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction de essences végétales.

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les huiles essentielles, huiles lourdes...). Le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées ; Les principales méthodes d'extraction sont :

- Distillation à vapeur saturée
- Entraînement à la vapeur d'eau
- Hydro diffusion
- Expression à froid
- Extraction par solvants
- Hydro distillation
- Extraction par les corps gras
- Extraction par micro- ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (**Marie Elisabeth et Lucchesi, 2005**).

III.2.Distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (**Franhomme et Pénéol, 1990**). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

Tout d'abord, l'hydro distillation .Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau

placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

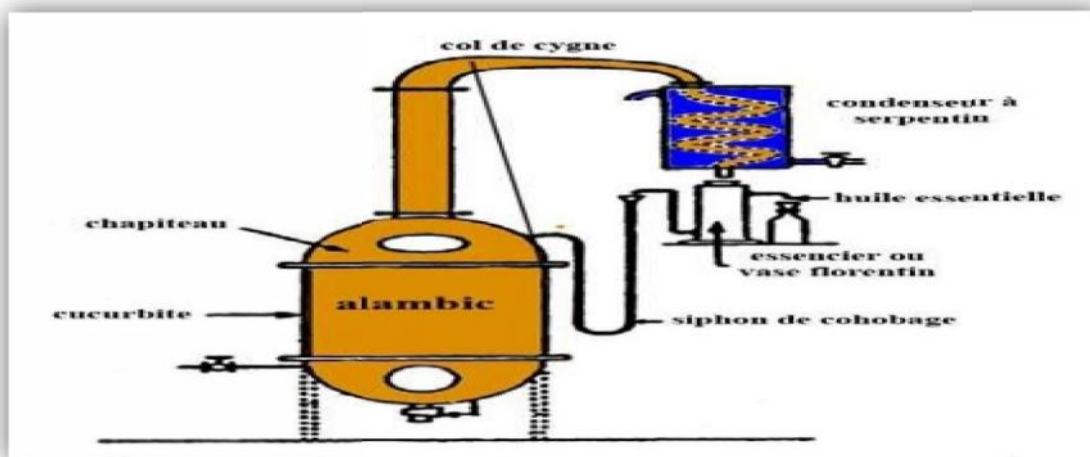


Figure08: L'hydrodistillation traditionnelle (Franchomme et Péroël, 1990).

Ensuite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (steam distillation).

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau.

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Franchomme et Péroël, 1990).

Enfin, la troisième technique est l'hydro diffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (perdescendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Franchomme et Péroël, 1990 ;Richard, 1992).

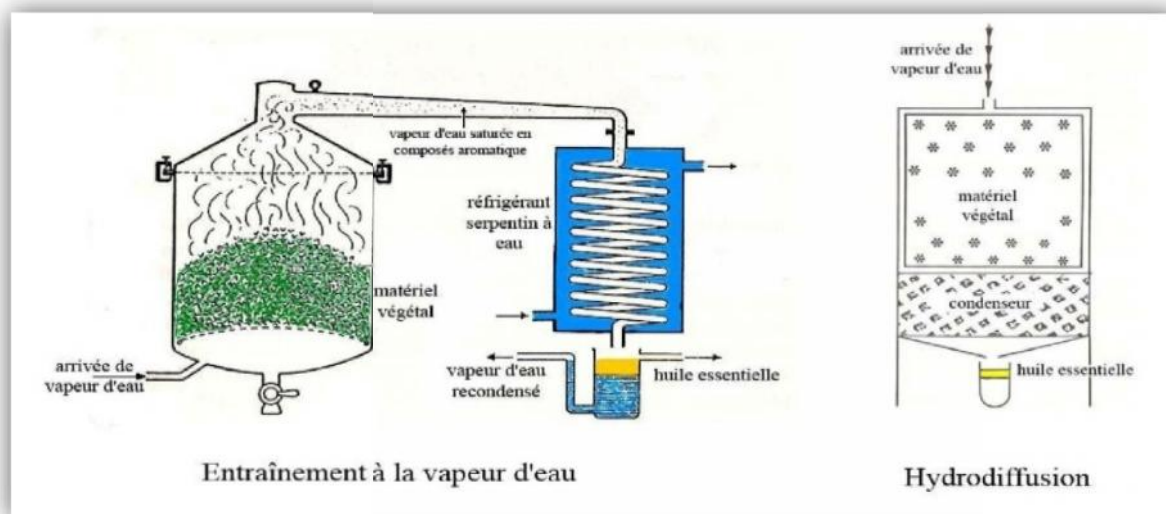


Figure 09 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Franchomme et Péroël, 1990 ;Richard, 1992).

III.3.Extractions par les solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée.

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite.

L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants et leur manque de sélectivité peuvent entraîner de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines.) dans le mélange pâteux et imposer par conséquent une purification ultérieure (Shellie et al., 2004).

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 (Wan et al., 1995).

III.4. Extraction par Hydrodistillation

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau.

L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme les HE sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles (**Fasty, 2007**).

La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir.

La vapeur redevint donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface).

On les récupère alors par décantation (**Franchomme, 1990**).

III.5. L'expression à froid

Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. C'est une méthode artisanale qui est totalement abandonnée. Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange, etc.) de l'écorce ou des fruits (**Benjilali, 2004**). Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique. La rupture de la paroi des poches oléifères fait intervenir trois procédés :

- Une technique qui agit sur le fruit entier, elle utilise des machines exerçant une action abrasive.
- Une technique qui agit sur le fruit sans endocarpe. Elle utilise des machines exerçant une pression suffisante pour libérer l'essence.
- Un troisième procédé permet d'extraire en une seule opération l'essence et le jus sans mélanger les deux produits (**Garnero, 1996**).

Le produit obtenu se nomme « essence » et non huile essentielle, car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a lieu (**Couic-Marinier, 2013 ; Lamendin, 2004**).

III.6. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique.

Au-delà du point critique (P = 73,8 bars et T = 31,1 °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (**Pellerin, 2001**).

En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils.

Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars (**Richard , 1992**).

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante (**Wenqtang et al., 2007**).

III.7. Hydrodistillation par micro- ondes sous vide

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction ou SFME) a été conçue pour des applications en laboratoire pour l'extraction d'huiles essentielles de plantes aromatiques (**Chemat et al., 2004**).

Cette technologie est une combinaison de chauffage micro-ondes et d'une distillation à la pression atmosphérique.

Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes, sans ajout de solvant organique ou d'eau. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle.

Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par le végétal. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la

condensation du distillat, compose d'eau et d'huile essentielle, par la suite facilement séparable par simple décantation. D'un point de vu qualitatif et quantitatif, le procédé SFME semble être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydrodistillation ou l'entraînement a la vapeur **(Lucchesi et al., 2004b)**. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel.

Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage.

Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées **(Bendahou et al., 2007 ; Luque de castro et al., 2007)**.

Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées **(Lucchesi et al., 2004a)**.

III.8. L'enfleurage

L'enfleurage est une technique qui date de l'Antiquité égyptienne. Elle consiste à déposer des Plantes en particulier les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de rose) sur une couche de graisse animale qui se sature en essence. On épuise ensuite le corps gras par l'alcool qui récupère les senteurs et qui sera ensuite évaporé sous vide **(Belaiche,1979 ; France-Ida ,1996)**.

Cette technique est actuellement abandonnée au profit de l'extraction par les solvants en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite **(Abou Zaid, 1988)**.

III.9. Autres techniques

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités **(Ferhat et al., 2010)**.

Parmi ces techniques, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons **(Kaufmann et Christen, 2002 ; Hemwimon et al., 2007 ; Piochon, 2008 ; Ferhat et al., 2010 ; Dupuy, 2010)**. L'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état subcritique.

L'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente (**Ferhat et al., 2010**).

Il existe différents procédés d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation. L'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation de la plante fraîche ou sèche reste la technique la plus utilisée.

En conclusion, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque méthode possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commande ainsi que l'aspect économique qui est tout aussi important (**Collin, 2000**).

IV.1. Définition

Les H.E les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries (**Pauli, 2001**).

IV.2. Notion du bactériostatique et du bactéricide

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité létale
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

L'activité bactériostatique est souvent plus assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide. Cependant il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (**Kunle et al., 2003 ; Walsh et al., 2003**).

IV.2.1. bactéricide

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries (**Muanda, 2010**).

Cette action bactéricide des huiles essentielles sur la cellule bactérienne demeure encore insuffisamment élucidée (**Lakhdar et al., 2012**). Plusieurs mécanismes seraient mis en jeu (**Bakkali, 2008**).

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques (**Rafi et al., 1994**).
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (AND, ARN, protéines et peptido-glycanes (**Combe et al.,1988**).
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective (**Bouchikhi ,1994**) et détérioration membranaire.
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique (**Cox et al., 1998**).
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne (**Pattnaik ,1995**).

-Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion (**Rafi et al., 1994**).

IV.2.2.bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées.

L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration inhibitrice d'antibiotique pour laquelle il n'a plus des germes microbiens visibles (**Muanda, 2010**).

IV. 3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure...) d'autre part (**Kalemba et al ., 2003**).

IV. 4. Morphologie des bactéries lactique

Les bactéries lactique sont des bactéries Gram positive, non-sporulantes, immobiles, catalase-négatives, qui croissent sous des conditions anaérobies et utilisent les sources de carbone pour produire de l'acide lactique comme seul ou majeur acide organique (**Yao et al., 2009**).Sont généralement mésophiles. La majorité des souches croître à un pH de 4,0 à 4,5 (**Caplice et Fitzgeralda, 1999**).

On peut distinguer trois formes caractéristiques: les sphériques, les allongées et les spiralées. La position des bactéries les unes par rapport aux autres est également une caractéristique distinctive importante.

Les diplocoques sont disposés en paires. Les staphylocoques forment des groupes (du grec *staphulê* = grain de raisin), alors que les streptocoques forment des chaînes (du grec *streptos* = chaîne) (**Escott et al.,2006**).

Les bactéries allongées (bacilles) peuvent varier en longueur et en épaisseur. Elles forment également des chaînes. Les bactéries spiralées (spirilles) peuvent également varier en longueur et en épaisseur, et en nombre de spires.

La taille des coques varie entre 0,4 et 1,5 µm (1 µm = 0,001 mm). La longueur des bacilles peut varier entre 1 et 10 µm, même si quelques espèces sont plus grandes ou plus petites, et La structure cellulaire des bactéries Comme toutes les autres cellules, contient un semi-liquide, une substance riche en protéines appelée cytoplasme. Le cytoplasme contient les ribosomes, où a lieu la synthèse des protéines, et les enzymes qui participent au métabolisme de la cellule. La matière de réserve, telle que les graisses et le glycogène, se trouve également dans le cytoplasme.

L'ensemble sert de "squelette" à la bactérie et lui donne sa forme définitive. Cette paroi cellulaire est également entourée à l'extérieur d'une couche visqueuse plus ou moins développée. Lorsqu'elle est très épaisse, on parle alors de "capsule" (Escott et al., 2006).

IV.4.1. *Streptococcus thermophilus*

Bactéries sous forme de petites boules (coques) reliées en chaînettes plus ou moins longues (streptocoques). La variété la plus fréquente dans le yaourt est *Streptococcus thermophilus* (Righi, 2006).

St. thermophilus est un coque à Gram positif, anaérobie facultatif, se trouve dans les laits fermentés et les fromages (Dellagio et al., 1994 ; Roussel et al., 1994) .

Cette espèce se distingue essentiellement des autres Streptocoques lactiques par la croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43 °C, l'absence de tout antigène de group D, sa thermorésistante à 60 °C (parfois 65 °C) pendant 30 minutes (Garvie, 1984), une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl (Hardie, 1986b), le GC % de son ADN varie de 37 à 40 % (Farrow et Collins, 1984).

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés. Cette bactérie augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (composés de galactose, glucose, ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et mannose) (Bergamaier, 2002).

IV.4.2. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Lb

bulgaricus appartient au Groupe I de la subdivision du genre *Lactobacillus* de la classification d'Orla –Jensen (1919), qui regroupe les espèces homofermentaires obligatoires. C'est un bacille Gram+, non sporulé, immobile, il est isolé sous forme de bâtonnets en chainettes. *Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile et sa température optimale de croissance est variée de 43-46°C (Radke michell et Sandine, 1986). Le GC% de son ADN varie de 49-51% (Bottazzi, 1988).

L.bulgaricus est un bacille Gram positif, immobile ; sporulé ; microaérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chainettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres ; il est incapable de fermenter les pentoses.

L. bulgaricus est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Cette bactérie à un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt. (**Marty-Teyssset C. De La Torre F et Garel J-R, 2000**).

IV.5. Mécanismes d'action de l'extrait sur les bactéries

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalembe et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004**).

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Carson et al., 2002**). Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action. Le mode d'action des HE dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (**Cox et al., 2000; Carson et al., 2002**).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- 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 (**Daferera et al., 2003**).

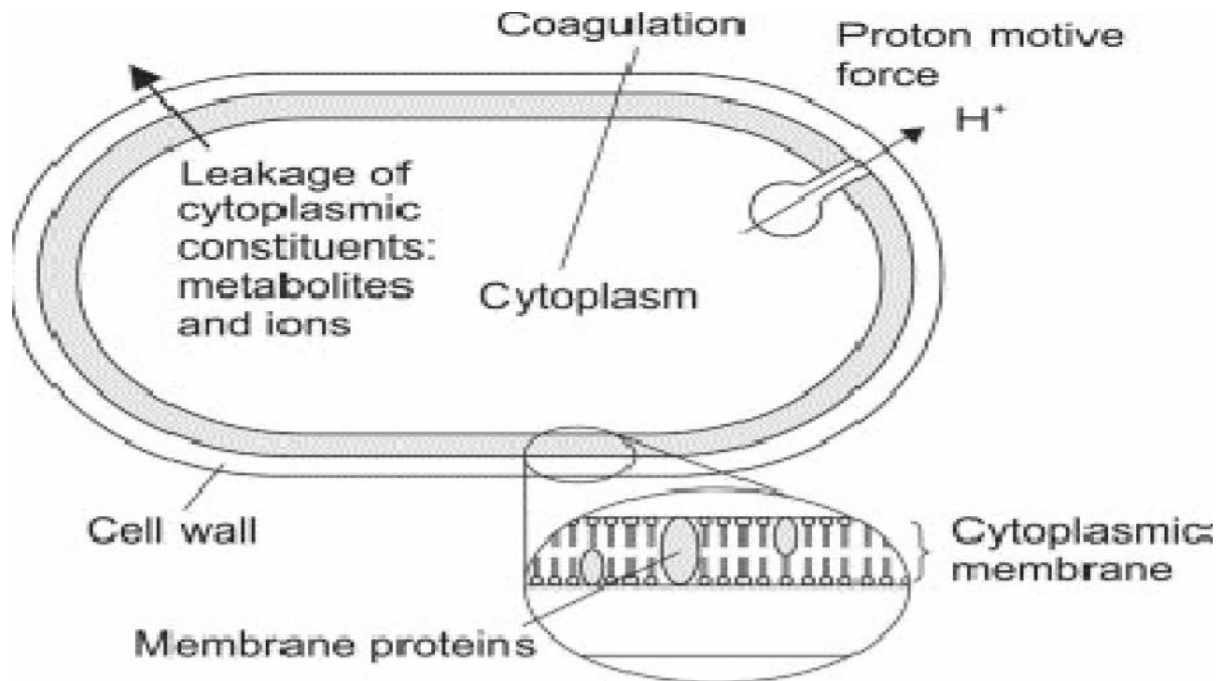


Figure 10: Schéma des principales cibles cellulaires des constituants des extraits méthanoliques et aqueux à effet antibactérien (Burt, 2004). Dégradation de la paroi cellulaire, endommagement de la membrane plasmique, altération des protéines, perte du contenu cellulaire (ions et métabolites), coagulation des constituants du cytoplasme et inhibition de la force proton motrice.

V.1. Techniques de détermination de l'activité antimicrobienne

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon :

- Le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux.
- La nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, en puits, en solution alcoolique ou dispersion dans un émulsifiant.

Une première étape consiste à faire un « screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes après sous-culture sur milieu sans antibiotique (**Andrews,2001 ; Cosentino et al.,1999**).

V.2. Techniques de screening des huiles essentielles

V.2.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E. testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (**Boudjema et al., 2010**). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar1 réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d' H.E.

V.2.2. Technique de diffusion en puits

Un puits (d'environ 6mm) est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle pure ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées (**Dorman et Deans ,2000**).

Pour ces 2 techniques, la sensibilité du germe testé peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (**Duraffourd et al.,1990**).

V.3. Techniques de détermination de concentration minimale CMI

L'efficacité de l'huile essentielle contre les microorganismes peut être fourni par la concentration minimal inhibitrice CMI; est la concentration la plus faible de l'huile essentielle capable d'empêchée le développement d'un microorganisme grâce au méthode de dilution on peut déterminé la CMI ,elle consiste si elle se fait au à préparé une série du tubes contenant l'eau physiologique plus l'extrait chaque tube avec concentration déterminé le1er tube 25 % et le 2eme tube 50 % et le 3eme tube 75 % et le 4eme tube 100 % et on préparé des boites pétrie chaque boites contenant le milieu de culture avec les souches bactériennes ,et on appliqué le méthode de disque , on imbibée les disques avec les déférentes dilutions et placée sur le géloses inoculée dans les boites .on calcule le CMI est égale la concentration de dilution la plus faible qui inhibant la croissance de bactérie après 6 à 8 heure d'incubation (**Caillet et Lacroix ,2007**).

V .3.1. Techniques de diffusion en milieu solide

L'huile essentielle est mélangée aux concentrations désirées avec le milieu gélosé liquéfié par simple agitation manuelle. Après refroidissement, on ensemence et on incube (**Taudou, 1990**).

L'adjonction d'un émulsifiant (Tween 80), inerte, stable et dépourvu d'action synergique antibiotique, peut être réalisée pour améliorer la solubilité de l'huile essentielle et sa diffusion dans la gélose.

Ainsi, l'huile essentielle est préparée dans une solution de Tween 80 à la concentration désirée. Le mélange est agité manuellement pendant 10 minutes, puis ajouté au milieu gélosé liquéfié, L'ensemble est coulé en boîte de pétri est effectué après refroidissement de la gélose (**Perruci et al., 1994**).

V.3.2. Techniques de diffusion en milieu liquide

V.3.2.1. Test de microdilution

L'incorporation de l'huile essentielle dans le milieu de culture liquide se fait en utilisant un émulsifiant (Tween 80) pour préparer les solutions de l'huile essentielle à la concentration désirée. La détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle se fait au moyen d'une microplaque de 96 puits. La détermination de la CMI est réalisée en faisant appel à un indicateur de croissance en solution (Triphényl Tétrazolium Chloride) (TTC).

La croissance bactérienne est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge de la solution témoignant de la réduction ou la précipitation du TTC. La CMI est ainsi déterminée par le dernier puits de la microplaque, par ordre décroissant de concentration, qui ne montre aucun changement de couleur. La CMB est calculée en transportant 10 µl des puits ne montrant pas de croissance bactérienne sur un milieu solide. La plus faible concentration tuant 99,9% des micro-organismes en culture sur ce milieu correspond à la CMB (**Carson et al., 1995**).

V.3.2.1. Test de macrodilution

Le principe est le même que celui du test de microdilution, sauf qu'il est effectué dans des tubes contenant l'huile essentielle, à différentes concentrations, incorporée dans un bouillon de culture liquide. La CMI est déterminée au niveau du dernier tube ne montrant aucune croissance microbienne visible (**Onawunmi, 1989**).

V.3.3. Techniques de diffusion en phase vapeur

V.3.3.1. Méthode des micro-atmosphères

Le disque imprégné d'essence est disposé au centre géométrique du couvercle de la boîte de pétri et non plus au contact avec la gélose. La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte. La lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halot qui sera mesuré par un pied à coulisse.

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles, elle met en évidence seulement la sensibilité du microorganisme testé aux constituants volatils à la température d'incubation (**Kellner et Kobert, 1954**).

V.4. lactofermentations

"Une fermentation est la transformation d'une substance organique (fruit, légume, céréale, légumineuse, lait, poisson, viande, etc.) sous l'action de ferments ou enzymes produits par des bactéries ou des champignons microscopiques."

La fermentation lactique du yaourt est de type homofermentaire, c'est-à-dire qu'une mole hydrolysé par la β D-galactosidase en glucose et galactose s'accumule et le glucose est utilisé pour la production d'acide lactique : 1 lactose = 1 galactose + 2 acide lactique

L'acidité d'un yaourt est communément exprimée en degrés Dornic (0,1 g/l acide lactique). L'acidité recherchée se situe entre 100 et 130°D. Par ailleurs, la production d'acide lactique a un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques et plus particulièrement sur *St. thermophilus* (Loones, 1994).

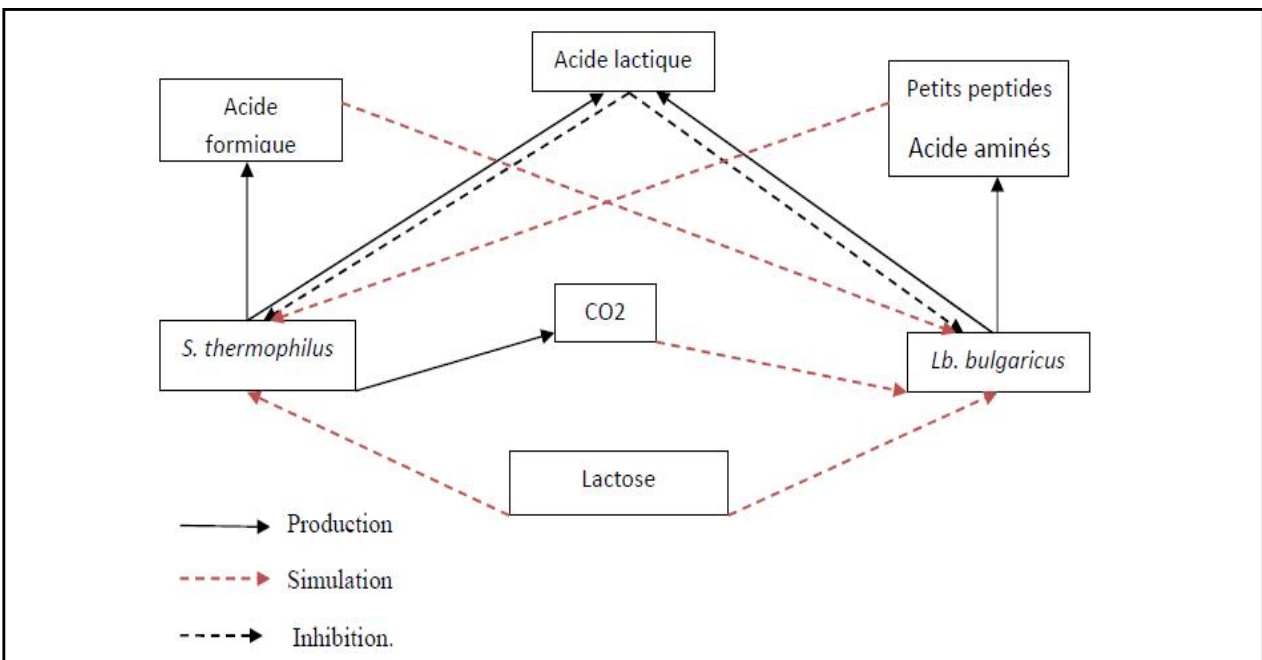


Figure 11 : Schéma illustrant les interactions de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Driessen, 1981).

Une acidité trop forte, est la conséquence d'un déséquilibre en faveur de lactobacilles, ou d'une conservation à température trop élevée (Loones, 1994).

L'association de souche de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* pour la fabrication du yaourt est l'exemple le plus connu et probablement le plus stable. Dans le lait, *Lb. bulgaricus*

plus protéolytique que *St. thermophilus* fournirait les acides aminés et / ou les peptides dont cette souche a besoin et stimulerait ainsi sa croissance (Desmazeaud et Hermier, 1972).

En retour, la croissance de *St. thermophilus* en absence de faible concentration d'oxygène produirait de l'acide formique stimulant le développement de *Lb. bulgaricus* (Veringa et al., 1968).

En plus du formiate, le CO₂ produit par *St. thermophilus* à partir de l'urée présente dans le lait (Tinson et al., 1982b) serait lui aussi nécessaire pour stimuler la croissance de *Lb. bulgaricus* (Driessen et al., 1982).

Cette interaction peut aboutir à une augmentation de la croissance de ces souches (Driessen et al., 1982) et à une acidification du lait plus importante que la somme de ces activités propre à chacune des deux espèces (Moon et Reinbold, 1976 ; Accolas et Auclair, 1983).

Cependant la réussite de l'association dépend de la concentration des deux bactéries et des propriétés des souches elles-mêmes. Pour fabriquer un bon yaourt, le rapport entre les deux bactéries doit être :

-La dominance du *St. thermophilus* conduit un yaourt sans arôme et celle du *Lactobacillus* à un yaourt trop acide (Rasic et Kurman, 1978).

-*St. thermophilus* pourrait aussi inhiber la croissance de *Lb. bulgaricus* quand la culture mixte arrive en phase stationnaire (Moon et Reinbold, 1976).

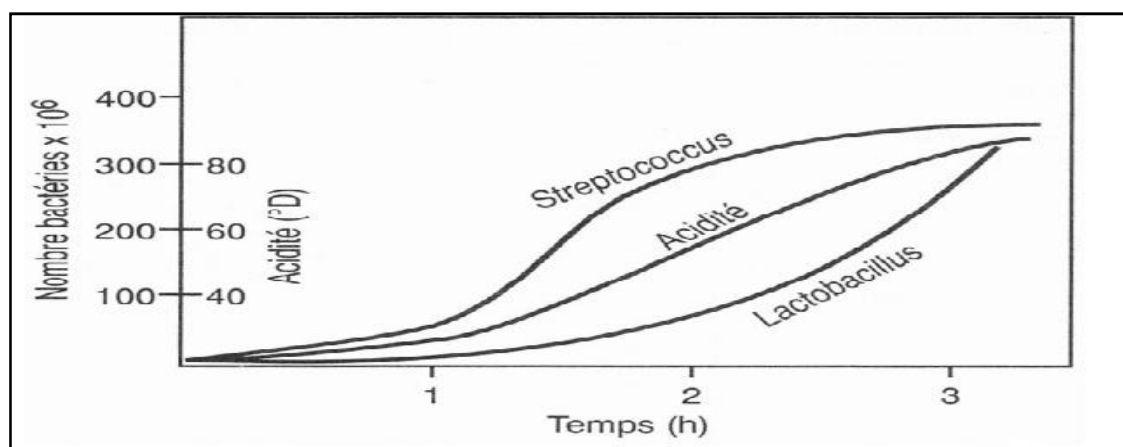


Figure 12:schéma de croissance relative des bactéries du yaourt (Philippe, 2010).

1. Objectif

On se propose dans cette étude d'évaluer l'acidité du yaourt additionne à des doses de extrait des différents parties du romarin durant deux périodes expérimentales de fermentation et post acidification, qui permette juger l'états d'utilisation des HEs comme un conservateur naturel.

2. protocole expérimentale

Le protocole général de notre travail est comme suite :

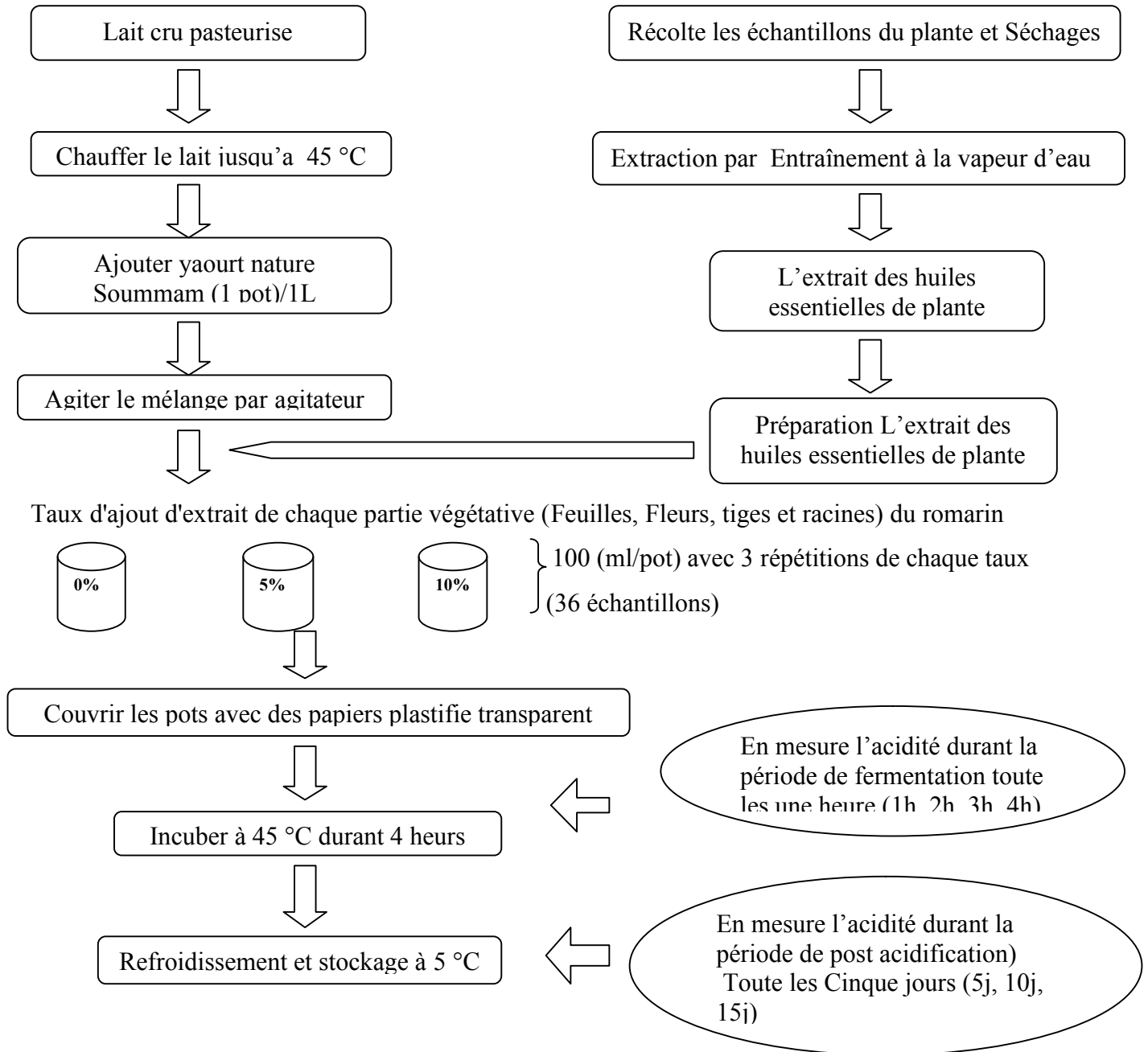


Figure 13 : Schéma de protocole expérimental

3. Structure de stage

Selon l'objectif visé, la pratique est réalisée dans deux des laboratoires pédagogiques de biochimie et de microbiologie de l'université de Abdelhamid Ibn Badis (uni-Mostaganem)

4. Matériels

4.1. Appareillage et produits chimiques

a. Appareillage

-Appareil de distillation de type Clevenger, Agitateur, Balance de précision, Plaque chauffante, Réfrigérateur, Autoclave, Etuve (Mettler) réglée à 45°C, Micropipette, Bécher, Pipette 10 ml, Burette.

b. Produits chimiques

-Hydroxyde de sodium NaOH (0.1N), eau distillée.
-Phénolphthaléine 1 %.

4.2. Matériel végétal

La récolte de notre plante a été effectuée au moins d'avril 2018, au niveau de la région montagne d'AMI MOUSSA de la wilaya de Relizane **Annexe 01**

La plante récoltée est lavée avec l'eau de robinet suivi par l'eau distillée.

Le matériel végétal est constitué de différentes parties du plant *Rosmarinus officinalis* L (Feuilles, Fleurs, tiges et racines) à l'état fraîches **Annexe 02**

4.3. Lait fermenté

On appelle lait fermenté un produit laitier obtenu par la fermentation du lait, lequel peut avoir été fabriqué à base des produits obtenus à partir de lait avec ou sans modification de composition, par l'action de micro-organismes appropriés et résultant dans la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique). Ces levains (micro-organismes) doivent être viables, actifs et abondants dans le produit à la date de durabilité minimale (**Codex Alimentarius, 1975**).

Le yaourt est un lait fermenté moderne. Selon le Codex Alimentarius (norme N°A-11(a) 1975) « le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par la fermentation lactique grâce à *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et *Streptococcus salivarius thermophilus* à partir du lait frais, ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition (de lait en poudre, poudre de lait ...). Les microorganismes doivent être viables

et abondants ». De plus la quantité d'acide lactique libre contenue dans 100 g de yaourt ne doit pas être inférieure à 0,7g (**FRANCE / Ministère de l'Economie et des Finances, 2009**).

5. Méthodes

5.1. Extraction par La distillation (Entraînement à la vapeur d'eau)

Deux méthodes de distillation sont principalement utilisées: l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au procédé de distillation puisque c'est un équipement que nous possédons au sein de notre laboratoire.

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles Essentielles. À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (**Dastmalchi et al., 2008**).

5.2. Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par distillation en utilisant l'appareil de Rota-vapeur (**figure 14**).

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de L'alambic, sans que le matériel végétal ne soit pas en contact avec l'eau (**Belaiche, 1979 ; Lucchesi, 2005 ; Ferhat et al., 2010**). Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes.

La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents (**Padrini et Lucheroni, 1996**). Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions, la fragilité

thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).



Figure 14: Appareillage utilisé pendant la distillation d'huile essentielle (laboratoire de Biochimie N°01 au niveau de faculté SNV université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem).

Poids identifié en (g) de chaque partie de la plante sèche (romarin) est introduite dans une ampoule de 2L au-dessus d'un ballon imprégné de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles récupérées dans des tubes à essai stérile et stockée à 5°C **Annexe 03et 04.**

Tableau 01 : Masse et forme de chaque partie utilisée dans l'extraction

Partie du plant concerné	Forme de la partie utilisée	Masse (g)
Feuilles	Feuilles seule	828.9
Fleurs	Fleurs seule	740.1
Tiges	Tiges sont coupes tout d'abord en bâtonnets de 2 a 3 cm de longueur	907.7
Racines	racines sont coupes tout d'abord en bâtonnets de 2 a 3 cm de longueur	905.6

6. Plan expérimentale

Notre yaourt a été fabriqué au sein du laboratoire de la faculté du SNV de l'université d'Abdelhamid Ibn Badis (uni-Mostaganem) dont le mode opératoire est le suivant :

-Le lait pasteurisé est acheté à l'unité GIPLAIT et il est transporté dans une glacière au laboratoire de l'université

-Ramener le lait et verser en des béchers puis chauffer le lait jusqu'à 45°C.

-Ajouter le yaourt nature Soummam (un pot) dans 1L avec l'agitation de mélange par un agitateur après verser dans des pots de 100ml **Annexe05**

-ajouter d'extrait de chaque partie végétative (Feuilles, Fleurs, tiges et racines) du romarin (0%,5%,10%) et couvrir les pots avec des papiers film, l'incubation à 45°C durant 4 heures et chaque heure on mesure l'acidité, à la fin de l'incubation on obtient le yaourt qui va refroidir et stocké à 4 °C.

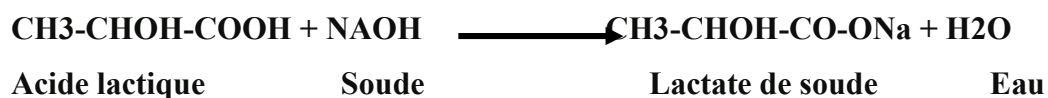
7. Mesure de l'acidité

Mesure et suivi de l'acidité Dornic pour un but de Permet juger à l'état de fermentation et conservation du lait fermenté.

L'acidité titrable du yaourt est déterminée selon la norme française **V 04 206 (septembre 1996)**, elle est exprimée en degré Dornic où $1^{\circ}\text{D} = 0,1 \text{ g d'acide Lactique par litre}$.

Cet acide lactique est libéré par les ferments lors de la fermentation du yaourt.

C'est cette molécule qui rend le pH du yaourt acide.



La détermination de l'acidité Dornic se base sur un titrage de l'acidité par la soude (N/9) en présence de la phénolphtaléine (1%) comme indicateur coloré.

Pour cela, 10ml de l'échantillon est placé dans un bécher, puis ajouté 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine et par la suite titré avec la solution de NAOH à N/9 est placée dans une burette jusqu'au virage de la coloration au rose correspondant à la zone d'équivalence **Annexe06**.

Le volume de NaOH ainsi obtenu est noté en ml puis les résultats sont exprimés selon le calcul suivant :

$$^{\circ}\text{D} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

$^{\circ}\text{D}$: acidité en acide Dornic.

V : volume de soude.

L'acidité Dornic a été mesurée pour un pot de yaourt conservé à 5°C .

8. calculs statistique

Les résultats vont être traités tout d'abord par une analyse de variance bi-factorielle en randomisation, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls (logiciel slat box 6.4).

1. Interprétation des résultats de l'acidité

1.1. Période de fermentation

a. Résultats

Les résultats de mesure d'acidité du yaourt étuvé de différentes parties du *Rosmarinus officinalis* sont consignées dans le tableau n°02 et la figure 15

Tableau n° 02 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé a base de [] différent de ≠ parties du plante romarin durant la fermentation.

		H1	H2	H3	H4
Feuille	0%	31±1 ^L	52±1 ^G	62,33±2,52 ^D	74±1 ^A
	5%	28±1 ^M	50,33±0,58 ^G	54,67±2,08 ^F	67,83±2,02 ^C
	10%	30±1 ^L	53±3 ^G	58,5±1,32 ^E	63,33±2,52 ^D
Fleure	0%	32,5±1,32 ^L	48,83±2,56 ^H	62,33±2,52 ^D	75,83±0,76 ^A
	5%	27,83±1,61 ^M	33,67±1,26 ^L	45±2,65 ^J	58,67±2,31 ^E
	10%	29±1 ^L	33,67±2,47 ^L	42,83±2,25 ^J	57,67±1,76 ^E
Tige	0%	30,17±0,76 ^L	40,83±4,25 ^K	50,33±1,53 ^G	71,33±1,53 ^B
	5%	20,67±2,10 ^N	31±1 ^L	43,33±3,21 ^J	58,5±2,6 ^E
	10%	25±1,5 ^N	31,33±1,53 ^L	46,17±161 ^I	58,17±2,36 ^E
Racine	0%	31,67±1,53	44±1,73 ^J	51±1 ^G	72±1 ^B
	5%	28±1 ^M	30,83±1,04 ^L	44±1,73 ^J	61±1,73 ^D
	10%	19±1 ^N	28,83±1,26 ^L	43,33±2,02 ^J	51±1 ^G

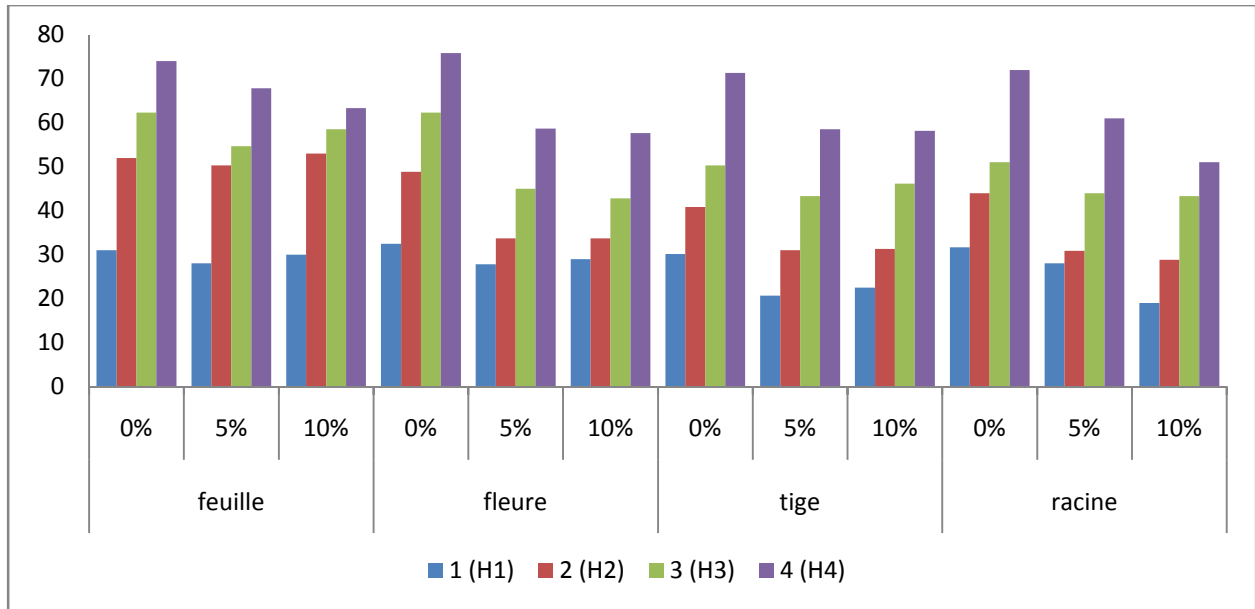


Figure 15: évolution de l'acidité du yaourt étuvé a base de [] différent de ≠ parties du plante romarin durant la fermentation.

b. Interprétation

Au cours de la fermentation, l'évolution des valeurs d'acidité des laits fermentés sont marqués d'une nette augmentation de 31.33 °D en moyenne 1 heure de fermentation pour les échantillons témoins, par contre de 26.12°D pour la concentration de 5% d'extrait des différentes parties de la plante est de 25.75°D pour la concentration de 10% d'extrait des différentes parties de la plante.

Le rapport de différence de l'acidité du yaourt supplémenté en extraits de racine après 1 heure de fermentation est estimé à 41.43%.

Après 4 heures de fermentation, les laits préparés a 10% extrait des différentes parties de la plante présentent les taux d'acidité les plus faibles de 57.54 °D en moyenne par apport aux essais expérimentaux, les témoins 73.29°D contre 61.5°D pour 5%.

Le rapport de différence de l'acidité du yaourt supplémenté en extraits de racine après 4 heure de fermentation est estimé à 32.74 %.

Nous avons remarqué que la partie racine a un effet hautement significatif sur l'acidité des différents produits laitiers, cette prévalence est très sensible entre les différentes parties du romarin.

1.2. Période de post acidification

a. Résultats

Les résultats de mesure d'acidité du yaourt étuvé de différentes parties du *Rosmarinus officinalis* durant du post acidification sont consignées dans le tableau n°03 et la figure 16

Tableau n° 03 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé a base de [] différent de ≠ parties du plante romarin durant du post acidification.

		5J	10J	15J
Feuille	0%	79,17±0,29 ^B	87,33±1,53 ^A	78±2,65 ^B
	5%	72±3,61 ^H	73,67±2,1 ^B	75,83±3,33 ^B
	10%	74,67±4,04 ^B	70±1,73 ^E	74±3,61 ^B
Fleure	0%	77,33±0,58 ^B	79,5±0,5 ^B	74,33±2,10 ^B
	5%	71±1,73 ^C	78,33±2,89 ^C	68,33±2,89 ^G
	10%	63,83±1,26 ^I	72±1 ^H	72,67±2,52 ^B
Tige	0%	77,83±0,76 ^C	78,83±2,02 ^B	75,67±1,15 ^B
	5%	69,67±6,51 ^F	74,67±3,79 ^B	70,17±2,25 ^D
	10%	70,17±4,37 ^D	70,33±4,04 ^D	68,67±1,53 ^G
Racine	0%	75±1,73 ^L	78,17±0,76 ^B	72,33±1,16 ^B
	5%	71±1,73 ^C	78,33±2,89 ^B	71,67±2,89 ^B
	10%	63,83±1,26 ^H	72±1 ^B	66,33±2,1 ^H

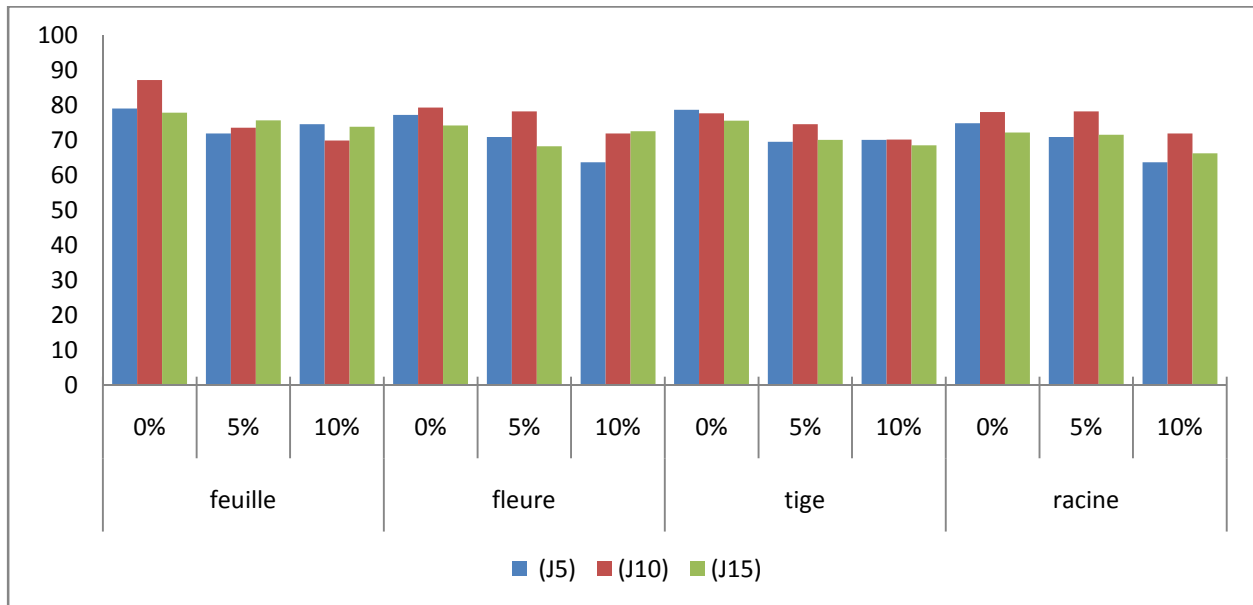


Figure 16 : évolution de l'acidité du yaourt étuvé à base de [] différent de parties du plante romarin durant du post acidification.

b. Interprétation

D'après nos résultats, il s'avère que l'utilisation d'une concentration de 10% d'extrait de la racine touche sensiblement l'acidité du yaourt, les échantillons témoins présentent des teneurs en acidité très importante après 5 jours de conservation. Toutefois, une concentration de 10% de extraite de feuille de romarin ne change pas l'acidité du yaourt.

Le rapport de différence de l'acidité du yaourt supplémenté en extraits de racine après 5 jours de conservation est estimé à 15%.

Après 10 jours de conservation concernant l'acidité Dornic elle augmente avec le temps dans tous les échantillons témoins et dans les concentrations suivantes (extraite de feuille a 5%, extraite de Fleur a 5% et 10%, extraite de tige a 5% et extraite de racine a 5% et 10%), par contre pour le cas feuille a 10% l'acidité Dornic diminue et se stabilise pour le cas tige a 10%.

Le rapport de différence entre l'acidité du yaourt après 10 jours a 0% par rapport a l'acidité de la fleur a 10% sont à 26.90%.

Après 15 jours de conservation, nos résultats de l'acidité du yaourt ne montrent pas de différence significative entre les concentrations d'extraits des différentes parties de la plante et les échantillons témoins qui présentent la diminution de l'acidité du yaourt.

Le rapport de différence entre l'acidité après 15 jours supplémentée en extraits de racine après 15 jours de conservation est estimée à 14.96%.

Nous avons remarqué que la partie racine a un effet hautement significatif sur l'acidité des différents produits laitiers, cette prévalence est très sensible entre les différentes parties du romarin.

2. Discussion générale

D'une façon globale, durant la période expérimentale de la fermentation, les laits fermentés expérimentaux sont caractérisés par une augmentation remarquable d'acidité Dornic soit de 57.54 à 73.29°D en moyenne.

Cette augmentation d'acidité Dornic est la conséquence d'une fermentation du lactose du lait en acide lactique effectuée par les souches spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. (Cachon et al., 1998).

Toutefois, durant l'expérimentation l'acidité des produits n'a pas dépassé les normes admises commercialement de 80-85°D (William, 1984).

À ce propos, Guyot, 1992 rapportent que le démarrage de la fermentation lactique est assuré par les *Streptococcus thermophilus* qui les utilise pour leur développement, les acides aminés libérés des caseinates par hydrolyse enzymatique effectuée par les aminopeptidases secrétées par les *Lactobacillus bulgaricus*. Ces derniers stimulés par certains composés élaborés, cette fois-ci par les *Streptococcus thermophilus* au cours de leur processus de fermentation tel que l'acide formique, l'acide acétique et le CO₂ (Assche, 1994).

Globalement, au cours de la conservation l'acidité des laits fermentés préparés à des concentrations de 5% et 10%, est nettement plus faible que le témoin 0%, cette diminution de l'acidité s'exprime par l'effet bactériostatique de l'extrait de déférent partie du romarin dont l'action semble d'autant plus accentuée que le taux incorporé est important dans les laits fermentés acidifiés.

Ces résultats démontrent l'impact de la présence de l'huile essentielle de déférent partie du romarin. Elle peut abaisser favorablement son acidité titrable avec une possibilité d'inhiber le développement des bactéries lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique.

Comparant nos résultats aux données bibliographiques, on peut dire qu'ils sont comparables à ceux trouvés par (Amellal, 2008), et presque identique avec ceux trouvés par (Ladj, 2011)

Revenant sur les normes SALVADORIENNE NSO67.01.10:06 qui fixent l'acidité du yaourt nature ou édulcore aromatisé avec ou sans fruits de 60 à 120 °D. Cette diminution de la croissance des germes, notamment en souches spécifiques ensemencées *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* s'est sans doute soldée par une mauvaise fermentation du lactose constitutif du lait en acide lactique, suivie d'une diminution d'acidité titrable.

Conclusion générale

Le romarin est utilisé dans l'industrie alimentaire comme alternative aux additifs chimiques pour la préparation de la volaille, de l'agneau, du veau, des fruits de mer, des saucisses et salades ainsi que des soupes et chapelures. Le romarin est également utilisé comme épice dans les croustilles, les chips et des frites françaises (Moino et al., 2008 ; Georgantelis et al., 2007 ; Janz et al., 2007 ; O'Grady et al., 2006 ; Sebranek et al., 2005 ; Djenane et al., 2002 ; Sanchez-Escalante et al., 2001).

Ce travail avait pour objectif de réaliser la fabrication d'un nouveau produit naturel qui est un yaourt additionné de l'huile essentielle du romarin, suivi par mesure de l'acidité Dornic pour un but de Permet juger à l'état de fermentation et conservation du lait fermenté

A la lumière des résultats expérimentaux effectués aux cours de la fermentation et la période de post acidification sur les yaourts expérimentaux, il résulte ce que suit :

Au cours de la fermentation, l'évolution des valeurs d'acidité des laits fermentés sont marqués d'une nette augmentation de 31.33 °D en moyenne 1 heure de fermentation pour les échantillons témoins, par contre de 26.12°D pour la concentration de 5% d'extrait des différentes parties de la plante est de 25.75°D pour la concentration de 10% d'extrait des différentes parties de la plante.

D'après nos résultats, il s'avère que l'utilisation d'une concentration de 10% d'extrait de la racine touche sensiblement l'acidité du yaourt, les échantillons témoins présentent des teneurs en acidité très importante après 5 jours de conservation. Toutefois, une concentration de 10% de extraite de feuille de romarin ne change pas l'acidité du yaourt.

Le rapport de différence entre l'acidité après 15 jours supplémentée en extraits de racine après 15 jours de conservation est estimé à 14.96%.

Nous avons remarqué que la partie racine a un effet hautement significatif sur l'acidité des différents produits laitiers, cette prévalence est très sensible entre les différentes parties du romarin.

Près l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'HE du «*Rosmarinus officinalis*» semble être plus appropriée comme agent conservateur et aromatique dans le lait fermenté.

Même si ce travail a permis d'étudier les caractéristiques biologiques de l'huile essentielle de «*Rosmarinus officinalis*» et d'explorer la possibilité de son utilisation comme agent conservateur et aromatique dans le lait fermenté, beaucoup de questions mériteraient d'être traitées, donc il est souhaitable :

- D'isoler les bactéries lactiques du yaourt et d'étudier leur comportement vis-à-vis de l'huile essentielle de «*Rosmarinus officinalis*»
- D'étudier l'effet de l'huile essentielle de «*Rosmarinus officinalis*» sur les ferments lactiques du yaourt
- D'identifier les constituants de l'huile essentielle des différentes parties du «*Rosmarinus officinalis*» par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- D'extraire les composants actifs de l'huile essentielle «*Rosmarinus officinalis*» et de les appliquer directement dans le yaourt.

A

1-Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. (2007) Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L* poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. 7: 6-11.

2-Arslan D. and Musa Ozcan M. (2007). Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*.

3-AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57p.

4- Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J. et Halliwell B. (1996) An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology* 34 (5):456.

5- Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H. (1997) Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. Officinallis L.* from other countries. *J.essent.Oil Res.* 9: 167-175

6-Accolas J.P. et Auclair J. (1983). Thermophilic lactic starters. *Ir. J. Food Sci. Technol.*, 7: 27-38

7- Abou Zaid, E. N. (1988) Aromatic and medicinal plants—their agricultural and medicinal products. El-Dar El-Arabia for Publishing, Cairo.

8- Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS) Mai 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles.

B

9- Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. (2009), Paris; Cachan: Éditions Tec & Doc ; Éditions médicales internationales.

10- Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. (1999), 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris. p.575

- 11- Bouchikhi T.** Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles. Thèse. Doct. Universit. Balaise Pascal. Clermont-Ferrand 1994.
- 12- Bego GV., (2003)** .Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Ed. MDB.
- 13- Benjilali B., (2004)** .Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- 14- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.(2008)**,Biological effects of essential oils- A review. Food Chem Toxicol. 2008; 46: 446-475.
- 15- Burt, S. A. et Reinders R. D. (2003)** Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. Lett Appl Microbiol. 2003; 36(3):162-7.
- 16 - Burt S., (2004)** .Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods:a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- 17-Belaiche P.(1979)**.Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine.,
- 18-Boullard (2010)** .BOUDJEMAA Nour Elyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de Nigella Sativa. Université Kasdi Merbah Ouargla.
- 19-Dorman HJD. and Deans SG., (2000)** .Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology.* 88(3): 308-316.
- 20-Benikhlef Abouseyf (2014)** *Mémoire de fin d'étude en Master Intitulé Comparaisant entre les huiles essentielles et leurs effets antibactériens sur Rosmarinus officinalis de la région de Bechar et Ouargla*
- 21-Bellakhdar, J. (1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris,764 p.
- 22-Beloued,A.(1998)**.Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.
- 23- Beniston (1984)** .Fleurs d'Algérie « *Rosmarinus officinalis* ».E.N.L.Alger. p 47.

C

24-Cheung S. ET Tai J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*. 17 (6): 1525-1531

25-Combe J., Simonnet F., Simonnet G.(1988) Action du xibornol sur la division cellulaire et les synthèses macromoléculaires des bactéries à gram positif. *Ann pharm fr.*;46(1): 19-26.

26-Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013) Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*; 52 (525) : 18-21.

27-Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Bartels P.V. et Chemat F., 2004a :Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 19, pp : 188 –195.

28-Collin G.(2000)Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*;;13: 4-5.

29-Carson, C. F. et T. V. Riley. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol*; 78: 264-9.

30-Cox S D., Gustafson J E., Mann C U., Warmington J. (1998) Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*; 26: 355.

31-Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G.(2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.

32-CODEX ALIMENTARIUS, 1975.-Normes n°A 11(A).- Rome :FAO/OMS.- 86p

33- Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 1997; 9: 67-75.

D

34-DRIESSEN F. M., KINGMA F., STADHOUDERS J. (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogourt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus*

thermophilus. *Neth. Milk Dairy J.*, **22**: 135-144

35- Duval, L., *Les huiles essentielles à l'officine*,(2012). Thèse de Doctorat, Ufr de medecine et de pharmacie de ROUEN.

36-Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. (1997) Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis*; 25 (6) : 13-16.

37-Dastmalchi, K., Damien Dorman, HJ., Oinonen, PP., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R.,(2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food. Sci. tech LWT*. 41 (3), 391-400.

38- DRIESSEN F. (1981). in Mixed Culture Fermented. *In*. Les produits laitiers 2^{eme} ed., Jeantet R., Croguenec T., Mahaut M., Shuck P., Brule G. Ed. *Tec & Doc*. Paris.

39-DESMAZEAUD M., HERMIER J.H. (1972). Isolement et détermination de la composition qualitative des peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, 28 : 190-198.

40- Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C.(1990) Cahiers de phytothérapie clinique. 1.Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques,2^{ème} éd. Masson, Paris.

E

41-Emberger ,(1960) Traité botanique fascicule II. Masson. p335.

F

42-France-Ida J.(1996)Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles.*Info-essence* 1996; 3: 5-6

43-FROUHAT Zoulikha. , LAHCINI Basma (2013) Mémoire de fin d'étude en Master Intitulé Lutte biologique par l'huileessentielle de *Rosmarinusofficinalis*.

44- FRANCE / Cidil et Inra, (2009) Du lait aux produits laitiers. –Paris : Cidil. – 19p

45- FRANCE / Ministère de l'Economie et des Finances, (2009)Spécifications techniques de l'achat public lait et produits laitiers. – Paris : OEAP.-47p

46-FAO(1975). Norme FAO pour les laits fermentés. Source : <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F0d.htm>

G

47- Georges Sens-Olive, (1979) « Les huiles essentielles - généralités et définitions », dans Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, éd. Maloine.

48-Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz,F.J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 111: 476-482

49-Garnero J. Phytothérapie-aromathérapie. Encycl. Méd. Nat 1991, p :20.

50-GARNERO J., (1996) : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.

H

51-Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006) Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences.*J Ethnopharmacol.*107: 157-160.

52-Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B.et Legrand M. (1994). Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.* 16 (4): 1446-1465

53-(<http://paprikaetchocolat.wordpress.com>)

54-<http://herbierdicietdailleurs.eklablog.com/rosmarinus-officinalis-romarin-a81904754>

55-(<http://nature.jardin.free.fr/>).

56-http://animateur-nature.com/a_la_loupe/rosmarinus_a_la_loupe1.html

57-<http://www.terrain.net.nz/friends-of-te-henui-group/exotic-trees/rosemary.html>.

I

58-Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S. et Reglero G.(2000.). Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48 (9): 4060-4065

59- Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. et Hawthorne S. B. (2003). : Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, **51** (2): 375-382.

K

60- Kunle O., Okogun J., et al. (2003) Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*; 10: 59-61.

L

61-Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C. (1996). Study of the embryo toxic effects of an extract of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*). *Brazilian journal of medical and biological research*. **29** (2): 223-227.

62-Luque de castro M.D. et Friego-Capote F. (2007) :Ultrasound assistance to liquidliquid extraction : A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 583, pp : 2 – 9.

63-Lucchesi M. E., Chemat F. et Smadja J., (2004a) . Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J.Chromato A*, , Vol. 1043, pp : 323-327.

64-Lucchesi, M.-E., (2005) Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion

65-Lakhdar L., Hmamouchi M., Rida S., Ennibi O.(2012)Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: A qualitative systematic review. Trop Dent J; 35(140).

66-Lambert R. J. W., Skandamis P. N., et al.(2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol; 91(3): 453-462.

67-LOONES A., (1994). Laits fermentés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Vol II.De Roissart, H. et Luquet, F. M., *Lorica*, Paris, France. pp. 37 -151.

68- Lamendin H. Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. Chir. Dent. Fr 2004; 1185 : 78-80.

M

69-Madjour Sassia (2014)Mémoire de fin d'étude en Master Intitulé : Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis*

70-MOSTEFAI Amina2011-(2012) Mémoire de fin d'étude en Master Intitulé Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L (Lamiacées) dans la région de Tlemcen

71-Makhloufi Ahmed Thèse présentée à l'université aboubaker belkaid faculté des sciences laboratoires produits naturels par MR Makhloufi Ahmed pour obtenir le grade de doctorat d'état en biologie.

72-Madadori M.K.,(1982)- Les plantes médicinales .Guides vert .Salar.624p.

73-Moon N.J., Reinbold G.W. (1976). Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Technol.*,39:337-341

74-. Mann J. Secondary metabolism. Second edition, 1987, Clarendon press, Oxford,p.374

N

75-Nabil Bousbia(2014) Mémoire de fin d'étude en Doctorat Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires

O

76-Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. ET Pfeifer A. M. (1995.) Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchical cells. *Carcinogenesis*. 16 (9): 2057-2062.

78-Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. ET Y a g h i A. (1994.),. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37 (5): 1463-1466

79-O.P.U. NT. WS. Benston, *Fleurs algériennes*. P 54.

80-Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. (1993.). Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products*. 56 (8): 1426-1430.

P

81-Paris M., Hurabielle M.(1981)Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie, Tome I, édition Masson

82-Poletti, A.(1988). , *Fleurs et plantes médicinales*. 2ème Edition. Delachaux & Niestlé (Ed).Paris, 222p.

83-PELLERIN P., 2001 : Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* V. 94, N°954 – pp : 51-62.

84-Pattnaik S. Effect of essential oils in the variability and morphology of *Escherichia coli*. *Microbios*, 1995; 48: 195-9.

85-Peron L., Richard H. *Epices et aromates, techniques et documentations Lavoisier* 1992.

Q

86-Quezel et Santa, (1963), *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales* Tome II. C.N.R.Sc. Paris.pp.781-783-793.

R

87-Rafi A., Tasneem U S., Achfaq A., Muchtaq A. Médicinal importance of essential oils. Hamdard Medicus. 1994 ; XXXVI(3): 101-105*.

88- Rafi A., Tasneem U S., Ashfaq A. The essential oils. Hamdard Medicus, 1995; XXXV(1): 108.

89- Rafi A., Tasneem U S., Achfaq A., Muchtaq A. Médicinal importance of essential oils. Hamdard Medicus. 1994 ; XXXVI(3): 101-105

90-RASIC J.L., KURMANN J.A. (1978). Yoghurt scientific grounds, technology, manufacture and preparation. *In. Microbiologie industrielle: Les micro-organismes d'intérêt industriel*, Leveau J.Y., Boux M. Ed. *Tec & Doc*. Paris. 175p

S

91-Scheffer J.J.C. Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.* 1996; 10:S6-S7.

92- Stagliano M.(1992). Actifs et additifs en cosmétologie, techniques et documentations Lavoisier

93-Sihame Hatim.(2013) Licence en Sciences & Techniques :Biotechnologies, Hygiène & Sécurité Alimentaires Suivi des paramètres physicochimiques des dérivés laitiers :viscosité, extrait sec total, pH et acidité

94-Salem Nadjiba ;(2014) Projet de Fi n d 'E t u d e s E n v u e d e l ' o b t e n t i o n d u d i p l ô m e d e Licence Synthèse bibliographique sur le pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques

95-Soyal, D ., J i n d a l , A ., S i n g h , I., Goyal, P.K. (2007) Modulation o f r a d i a t i o n -induced biochemical alterations in mice by rosemary (*Rosemarinus officinalis*) extract. *Phytomedicine*. 14: 701-705.

96-Singletary K. W. et Nelshoppen J. M. (1991.) Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer lettres*. 60 (2) : 169-175.

97-Schauenberg O. and Paris F.,(1977).Guide to Medicinal Plants. Keats, New Canaan, CT..

98-SANON E., (1992)-Arbre et arbrisseaux en Algérie O.P.U. Ben Aknoun.Algerie N°686
Alger. 121p.

V

99-Valter Jacinto,2015

[http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M4&p=Rosmarinus+officinalis+L.](http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M4&p=Rosmarinus+officinalis+L)

100-VERINGA H. A., GALESTLOOT T. E., DAVELAAR H. (1968). Symbiosis in yoghurt (II) Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Netherland Dairy Journal*, In : Bactéries lactiques et probiotiques, Luquet F-M. et Corrieu G. Ed. *Toc & Dec*, Paris. 307p

W

101-Wikipédia.2008.L'encyclopédie libre (en ligne)<http://www.wikipédia.com>

102- Walsh S. E., Maillard J-Y., et al.(2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol*; 94(2): 240-7.

103-WANG et al (2008).Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil compared to its main components. *Food Chem.*108:1019-1022.

104-. Wichtel M. et Anton R. (1999).Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques, 1999, Ed. Tec et Doc.

105- Wegrzyn R., Lamendinh H.(2005) Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. *Chir.Dent. Fr*; 1225 :62-66.

Annexe01 : photo du plant *Rosmarinus officinalis L* (région d'AMI MOUSSA)



Annexe 02 : des différentes parties du plant *Rosmarinus officinalis* L



Tiges du plant *Rosmarinus officinalis* L



Racines du plant *Rosmarinus officinalis* L



Feuilles du plant *Rosmarinus officinalis* L



Fleurs du plant *Rosmarinus officinalis* L



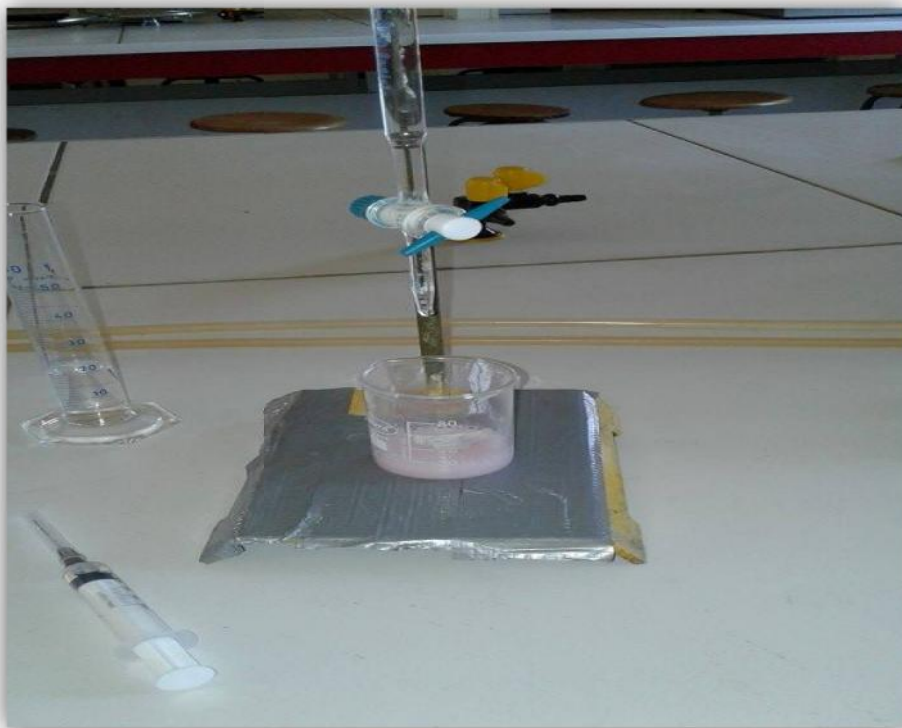
Annexe03 : les extraits de différentes parties du plant *Rosmarinus officinalis* L.



Annexe04 : l'extrait des tiges du plant *Rosmarinus officinalis* L



Annexe 05 : des pots de 100ml contiennent le mélange de yaourt + lait



Annexe 06 : le virage de la coloration au rose correspondant à la zone d'équivalence