



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la  
Recherche scientifique  
جامعة زيان عاشور-الجلفة  
Université Ziane Achour – Djelfa  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie



## Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie Appliquée  
Option : Microbiologie Appliquée

### Thème

**Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea L* sur quelques bactéries (Coliformes -staphylocoques) de contamination du lait cru (Vache-Chèvre).**

Présenté par : - BOUZAUIA Nourhane  
- MAZOUZ Sihem

Devant le jury :

Président : M. LAHRECH B.	M.A.A	Université de Djelfa
Promoteur : M. LAOUN K.	M.A.A	Université de Djelfa
Co-Promotrice: Mlle. CHENOUF N.S.	M.A.A	Université de Djelfa
Examineur 1: M. BELMAHDI M.	M.C.B	Université de Djelfa
Examineur 2 :M. BOUTAIBA S.	M.C.A	Université de Djelfa

Année universitaires : 2017/2018

# *Remerciements*

*Avant tout nous remercions ALLAH le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour faire ce travail.*

*Qu'il nous soit permis de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, y ont contribué.*

*Nos remerciements s'adressent en particulier à :*

*LAOUNK notre promoteur et Melle CHENOUF N S notre Co-promotrice, pour leurs encadrements, pour leurs conseils scientifiques judicieux et leur suivi durant la période de la réalisation de ce travail.*

*Nous exprimons nos respectueux remerciements aux membres de jury pour avoir acceptés d'évaluer ce travail.*

*Les ingénieurs de laboratoire de Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.*

*Département de Biologie de DJELFA, en particulier, M. GASSAB O (chef département de laboratoire), M. AISSA (technicien laboratoire) et Melle Mokhetari Z (ingénieur de laboratoire) pour nous avoir soutenus et encouragés tout le Long de notre travail.*

*Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.*

*À vous tous, un grand Merci.*

## *Dédicaces*

*Avec tous mes sentiments de tendresse je dédie ce  
Modeste travail à mes chers parents MAZOUZ &  
OUM SAOUD, Dieu prolonge ses vies,*

*À ma grande sœur MIMA et son mari Larbi,*

*À mes frères et sœurs : Hocine, Assia, Chaïma,  
Chahed et Oussama,*

*À mes amis Morad, Widad, Affaf, KOKI, Saâd  
Fadila Selma et Hichem, Merci d'être avec moi.*

*Et un Dédicace spécial à Zineb Mokhtari pour  
son soutien,*

*Et à tous ceux qui se sont tenus à nos côtés  
durant t notre travail.*

*Sihem*

### *Dédicaces*

*Je rends grâce à dieu, le tout puissant qui m'a accordé la patience nécessaire à la réalisation de ce modeste travail que je dédie chaleureusement :*

*- Aux êtres les plus chers à mon cœur, mes parents ahmida et Aicha , pour les efforts et les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon éducation.*

*- J'exprime mes remerciements pour les conseils et la confiance*

*Qu'ils m'ont accordé à :*

*- A mes frères Djemel et Naser el allah .*

*- A mes sœurs kaouther ,Hadjer et ma petite sabouha.*

*-A ma lout famille .*

*- A Mr Kacimi elhassani M et Moukhtari Z pour son aide tant apprécié, pour sa disponibilité, pour son soutien moral et ses conseils concluants et bénéfique.*

*- A mes amis :Houda ,Wissem,salem ,uidad ,saad ,mourad ,mouna ,*

*NOURHANE*

# Sommaire

## Liste des abréviations

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Introduction générale..... 1

### I-Synthèse Bibliographique

#### I-1-Généralités sur le lait..... 2

##### I-1-1-Différents composants chimiques du lait..... 2

##### I-1-2-Caractéristiques physiques du lait..... 2

##### I-1-3-Conditions légales de collecte et de conservation..... 3

##### I.1 4- Microflore du lait..... 3

#### I-2-Généralités sur les bactéries..... 4

##### I-2-1-Staphylocoques..... 4

###### I-2-1-1-Taxonomie et nomenclature..... 4

###### I-2-1-2- Caractères bactériologiques..... 4

###### a)- Caractères morphologiques..... 4

###### b)- Caractères culturels..... 5

###### c)-Caractères biochimiques..... 5

###### I-2-1-3-Pouvoir pathogène de *S.aureus*..... 6

##### I-2-2-Les coliformes..... 6

###### I-2-2-1-Coliformes totaux..... 7

###### I-2-2-2-Coliformes thermo-tolérants..... 7

#### I-3-Généralités sur le genévrier et les huiles essentielles..... 8

##### I-3-1-Présentation du genévrier..... 8

##### I-3-2-Généralités sur les huiles essentielles..... 8

###### I-3-2-1-Composition chimique..... 9

###### a)- Composés terpéniques..... 9

###### b)-Composés aromatiques dérivés de phénylpropane..... 10

##### I-3-3-Activité antibactérienne..... 11

### II-Matériel et Méthodes

#### II-1-Protocole expérimental..... 12

#### II-2-Matériels et produits de laboratoire..... 13

##### II-2-1-Produits de laboratoire et milieux de culture..... 13

##### II-2-2-Souches ATCC..... 13

## *Sommaire*

II-2-3-Matériel de laboratoire.....	13
II-3-Extraction des huiles essentielles.....	14
II-3-1-Matériel végétal.....	14
II-3-2-Hydro distillation.....	14
II-3-3-Décantation.....	15
II-3-4-Evaporation rotative.....	15
II-3-5-Calcul du rendement.....	16
II-4-Recherche des staphylocoques et des coliformes du lait.....	17
II-4-1-Échantillonnage.....	17
II-4-2-Recherche des coliformes.....	17
II-4-2-1-Enrichissement.....	17
II-4-2-2-Isolement et purification des coliformes.....	17
II-4-2-3-Identification biochimique (Test urée-indole).....	17
II-4-3-Recherche des <i>staphylocoques</i> .....	18
II-4-3-1-Enrichissement.....	18
II-4-3-2-Isolement et purification de <i>S.aureus</i> .....	18
II-4-3-3-Identification de <i>S.aureus</i> (Test de la coagulase).....	18
II-5-Etude de l'activité antibactérienne (aromatogramme).....	18
II-5-1-Préparation des disques.....	19
II-5-2-Ré-isolément des souches.....	19
II-5-3-Préparation des concentrations cellulaire de l'inoculum.....	19
II-6-Traitements Statistiques.....	20

## **III-Résultats et discussion**

III-1-Rendement de l'extraction des huiles.....	21
III-2-Isolement et identification des germes de contamination.....	23
III-2-1-Coliformes.....	23
III-2-1-1-Aspect de colonies.....	23
III-2-1-2-Teste Urée-indole.....	23
III-2-2-Staphylocoques.....	25
III-2-2-1-Aspect de colonies.....	25
III-2-2-2-Test coagulase.....	25

# Sommaire

III-3-Résultats de L'activité antimicrobienne.....	27
III-3-1-Activité antimicrobienne contre les coliformes.....	27
III-3-1-1-Résultats.....	27
III-3-1-2-Discussion.....	28
III-3-2-Activité antimicrobienne contre les staphylocoques.....	29
III-3-2-1-Résultats.....	29
III-3-2-2-Discussion.....	29
III-3-3-Activité antimicrobienne contre Pseudomonas et Enterococcus.....	31
III-3-3-1-Résultats.....	31
III-3-3-2-Discussion.....	31
• Activité antimicrobienne contre <i>Pseudomonas Aruginasa</i> .....	31
• Activité antimicrobienne contre <i>Enterococcus faecalis</i> .....	32
<b>Conclusion</b> .....	34

## Références bibliographiques

Annexes

Résumés

## *Liste des abréviations*

<b>ZI</b>	:	Zone d'inhibition
<b>MH</b>	:	Mueller-Hinton
<b>Jp</b>	:	<i>Juniperus phoenicea</i>
<b>HE</b>	:	Huile essentielle
<b>DMSO</b>	:	Diméthyl Sulfoxyde
<b>Do</b>	:	Densité optique
<b>UFC</b>	:	Unité(s) Formant Colonies
<b>GC</b>	:	Guanine / cytosine
<b>DNase</b>	:	Désoxyribonucléase
<b>EDTA</b>	:	Éthylène diamine tétra acétique
<b>MG</b>	:	Matière Gras
<b>T<sup>+</sup></b>	:	Témoin positif
<b>ANTB</b>	:	Antibiotique
<b>ATCC</b>	:	American type culture collection
<b>CEAEQ</b>	:	Center d'expertise et d'analyse environnementale de Québec
<b>FOA</b>	:	Food and Agriculture Organization
<b>AWWA</b>	:	American Water Works Association
<b>JORA</b>	:	Journal Officiel de la République Algérienne
<b>OMS</b>	:	Organisation Mondiale de la Santé



## *Liste des tableaux*

<b>Tableau (01) :</b>	composants de lait différents espèces animales (vache, chèvre).....	<b>2</b>
<b>Tableau (02) :</b>	Caractéristique physico-chimique du lait de chèvre et vache.....	<b>3</b>
<b>Tableau (03) :</b>	Classification botanique de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>8</b>
<b>Tableau (04) :</b>	Activité antibactérienne de <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>11</b>
<b>Tableau (05) :</b>	Tableau de prélèvement.....	<b>17</b>
<b>Tableau (06) :</b>	Rendement en huiles essentielles des feuille et des baies de <i>Juniperus phoenicea</i> ( $10^{-1}$ %). .....	<b>21</b>
<b>Tableau (07) :</b>	Rendement en huiles essentielles de <i>Juniperus phoenicea</i> selon les auteurs .....	<b>22</b>
<b>Tableau (08) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre <i>E.coli</i> .....	<b>27</b>
<b>Tableau (09) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre les <i>staphylococcus aureus</i> .....	<b>29</b>
<b>Tableau (10) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre <i>P.aeruginosa</i> et <i>E.feacalis</i> .....	<b>31</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure (01) :</b>	Structures des Composés terpéniques.....	<b>10</b>
<b>Figure (02) :</b>	Structures des composés aromatiques dérivés de phenyl propane (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ).....	<b>10</b>
<b>Figure (03) :</b>	Organigramme présenté les principales étapes du protocole expérimentale.....	<b>12</b>
<b>Figure (04) :</b>	Montage d'hydro-distillation.....	<b>14</b>
<b>Figure (05) :</b>	La décantation (Extraction liquide – liquide).....	<b>15</b>
<b>Figure (06) :</b>	Evaporation rotative (rotavapor).....	<b>16</b>
<b>Figure (07) :</b>	Rendement en huiles essentielles des feuille et des baies de <i>Juniperus phonicea</i> (10 <sup>-1</sup> %).....	<b>21</b>
<b>Figure (08) :</b>	L'aspect d' <i>E.coli</i> sur milieu Hektoen.....	<b>23</b>
<b>Figure (09) :</b>	Test uréase.....	<b>23</b>
<b>Figure (10) :</b>	Teste indole positive.....	<b>24</b>
<b>Figure (11) :</b>	Proportion des coliformes confirmés dans les deux types de lait.....	<b>24</b>
<b>Figure (12) :</b>	Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur milieu Chapman.....	<b>25</b>
<b>Figure (13) :</b>	Test coagulase positif de <i>S.aureus</i> .....	<b>26</b>
<b>Figure (14) :</b>	Proportion des Staphylocoques confirmés dans les deux types de lait.	<b>26</b>
<b>Figure (15) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre <i>E.coli</i> .....	<b>28</b>
<b>Figure (16) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre les <i>staphylococcus aureus</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure (17) :</b>	Résultats de l'activité antimicrobienne contre <i>P.aeruginosa</i> et <i>E.feacalis</i> .....	<b>32</b>

# Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des Algériens. Ils apportent la plus grosse part de protéine d'origine animale en regard de son contenu en énergie métabolisable, le lait présente une forte concentration nutritive. Mais le lait n'a pas seulement un intérêt alimentaire, il occupe une place centrale dans l'imaginaire des Algériens ce n'est d'ailleurs pas par hasard qu'il est offert comme signe de bienvenue. La filière lait connaît une croissance annuelle de 8%. Avec un taux de collecte inférieur à 15 %, cette filière reste, cependant fortement dépendante de l'importation de poudre de lait (**Silait, 2008**).

Seule la production laitière de quelques espèces de mammifères présente un intérêt immédiat en nutrition humaine, même si le lait d'autres espèces animales possède des qualités nutritives supérieures. La vache assure de loin la plus grande part de la production mondiale (90 %) même en pays tropicaux (70 %). Ce lait est de loin le plus connu et les données qui le caractérisent sont sans doute les plus exactes (**Peacock, 2005 ; FAO, 1998**).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments. D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Kehal, 2013**).

Ce travail a pour objectif général d'étudier l'efficacité des huiles essentielles extraites des baies et des feuilles de *Juniperus phoenicea*, provenant de la région de CHAREF sur quelques souches de contamination du lait (Coliformes et staphylocoques).

Notre étude est réalisée en trois chapitres :

Dans le premier chapitre, nous rapportons des généralités sur le lait, sur les bactéries de contamination du lait et sur les huiles essentielles de JP.

Dans le deuxième chapitre nous présentons le matériel et les méthodes employées pour l'extraction des huiles essentielles, l'isolement des souches et l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles contre les souches isolées des laits de vache et de chèvre.

Et dans le troisième chapitre, nous discutons les résultats obtenus lors de cette étude.

Enfin une conclusion assortie de perspectives achève notre travail.

# CHAPITRE I

## Synthèse bibliographique

### I-1-Généralités sur le lait

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant «Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum » (**Pougheon et Goursaud, 2001**).

**Franworth et Mainville (2010)** évoquent que le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un aliment bon pour la santé. Source de calcium et de protéines.

Selon **Mittaine (1980)**, les laits sont les seuls aliments naturels complets qui existent, chacun d'eux étant adapté à une race et d'après **Favier (1985)**, le lait est une source importante de protéines de très bonne qualité.

**Pougheon et Goursaud (2001)** ont classé le lait selon leurs principaux constituants, **Fredot (2006)** rappelle que le lait est constitué de quatre phases.

#### I-1-1-Différents composants chimiques du lait

Le lait de vache est plus qu'une boisson c'est un aliment complet qui contient protéines, lipide, glucide et minéraux (**Cayot et Loriont, 1998**).

La composition du lait varie d'une espèce animale à une autre, le tableau 01 donne la composition chimique des laits crus de vache et chèvre.

**Tableau 01** : Composants de lait selon les espèces animales (vache, chèvre) (**Alais, 1984**)

Animaux	Eau (%)	MG (%)	Protéines (%)	Glucide (%)	Minéraux (%)
Vache	87.5	3.7	3.2	4.6	0.8
Chèvre	87.0	3.8	2.9	4.4	0.9

#### I-1-2-Caractéristiques physiques du lait

Les principales propriétés physico-chimiques (Tableau 02), utilisées dans l'industrie laitière sont la masse volumique et densité, le point de congélation, le point d'ébullition et l'acidité (**Vignola, 2002**).

**Tableau 02:** Caractéristique physico-chimique du lait de chèvre et vache (**Ait amer mezone, 2008**)

Composants	Vache	Chèvre
Energie (Kcal/l)	705	600-750
Densité du lait entier à 20 °C	1.028-1.033	1.027-1.035
Point de congélation (°C)	-0.520-0.550	-0.550-0.583
pH-20 °C	6.60-6.80	6.45-6.60
Acidité titrable (°Dornie)	15-17	14-18
Tension superficielle de lait entier à 15°C (dynes cm)	50	52
Conductivité électrique à 25°C (siemens)	45x10 <sup>-4</sup>	43-56x10 <sup>-4</sup>
Indice de réfraction	1.45-1.46	1.35-1.46
Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises)	2.0-2.2	1.8-1.9

### I-1-3-Conditions légales de collecte et de conservation

Selon le **JORA (1993)**, le lait doit être conservé immédiatement après la traite à une température inférieure ou égale 6 °C. Le lait doit être mis à la disposition des entreprises laitières dans les conditions suivant :

- ❖ le temps entre la traite et la délivrance du lait aux entreprises laitières ne doit pas dépasser 48 h
- ❖ le lait doit être stocké de façon à éviter la contamination et la multiplication des micro-organismes
- ❖ le lait doit être transporté dans des récipients réservés au transport des denrées alimentaires

### I.1 4- Microflore du lait

Le lait contient peu de micro-organismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ ml) (**Larpen, 1997**). En effet, dans des conditions de propreté et d'hygiène normale, le lait cru renferme de nombreux germes constituant la flore originale. Cette microflore est représentée essentiellement par des lactobacilles et des streptocoques lactiques commensaux provenant du pis et des canaux galactophores (**Hermier et al, 1997**).

D'autres parts, le lait peut être contaminé par divers microorganismes de l'environnement : Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, Corynébactéries, *Bacillus*...etc. par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait (**Leyral et Vierling, 2001**). Les laits d'animaux malades peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme (*Staphylococcus aureus*, *Brucella*, *Listeria*). Ceci explique l'importance d'un contrôle sanitaire rigoureux (**Leyral et Vierling, 2001**).

## I-2-Généralités sur les bactéries

### I-2-1-Staphylocoques

Les staphylocoques sont des bactéries sphérique (coque) aérobie-anaérobie facultative à Gram positif, très résistantes dans le milieu extérieur et peut exigeantes en culture. *S.aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est un staphylocoque à coagulase positive. Il a été nommé ainsi par Rosenbach (1884), en raison de sa production de caroténoïdes donnant à la bactérie sa pigmentation de surface caractéristique (**Licitra, 2013**). C'est une bactérie commensale de la peau et de la muqueuse dont la niche principale est la fosse nasale. La colonisation est définie comme le portage asymptotique de la bactérie et concerne 30 à 50 % de la population générale au niveau nasale (**Wertheim et al, 2005**).

#### I-2-1-1-Taxonomie et nomenclature

En 1883, Alexandre Ogsto a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (KoKKos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries (**Avril et al, 1992**). L'espèce pathogène pour l'homme est de loin staphylococcus doré ou *S.aureus*. Selon la 2ème édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les *Staphylococcus aureus* sont classées parmi les bactéries à Gram positif, pauvres en GC %.

Phylum : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* (**Garrity et al, 2007**).

#### I-2-1-2- Caractères bactériologiques

##### a)- *Caractères morphologiques*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5µm de diamètre, ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules), que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale et peuvent devenir à Gram variable



(Couture, 1990 ; Fasquelle, 1974 ; Gram, 1884). Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique sauf pour de très rares souches, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (Le Minon et Veron, 1990).

#### ***b)- Caractères culturels***

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO<sub>2</sub> pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. La température optimale de croissance est de 37 °C et le pH optimal est de 7.5, mais de grandes variations sont tolérées (Couture, 1990 ; Le Minon et Veron, 1990 ; Fasquelle, 1974).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Kloos et Shleifer, 1975).

#### ***c)-Caractères biochimiques***

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Le Minor et Viron, 1990 ; Fasquelle, 1974). De plus, la plupart des souches de *S.aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (Coutor, 1990).

*S.aureus* possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Ferron, 1984). Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylo-coagulase (Fauchere et Avril, 2002). Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Coutor, 1990).

**I-2-1-3-Pouvoir pathogène de *S.aureus***

*S. aureus* est une bactérie opportuniste, commensale de la peau et des muqueuses (fosses nasales, périnée, tractus gastro-intestinal et pharynx) de l'homme et de nombreuses espèces animales (**Van Belkum et al, 2006; Wertheim et al, 2005 ; Kluytmans et al, 1997**). Dans une moindre mesure, elle peut coloniser également le périnée et les muqueuses vaginales (**Guinan et al, 1982**) et les aisselles (**Dancer et Noble, 1991**).

Bien qu'étant commensal, *S.aureus* est également responsable d'un grand nombre d'infections chez l'Homme, notamment des infections cutanées (impétigos, folliculites, furoncles, panaris) et des infections des muqueuses (conjonctivites, otites, salpingites, endométrites, pneumonies) (**Lowy, 1998**). Ces infections peuvent mener à des bactériémies et faire l'objet de métastases septiques à l'origine de foyers infectieux profonds. Dans 10 % des bactériémies, une endocardite survient comme complication (**Pilly, 2008**).

La porte d'entrée principale de *S.aureus* est cutanée, comme peuvent l'être une plaie ou le point de pénétration d'un cathéter. *S.aureus* possède de nombreux facteurs de virulence et de pathogénicité (facteurs d'adhésion, toxines, enzymes) et exerce son pouvoir pathogène par la libération d'une ou de plusieurs toxines. Parmi les toxines, les entérotoxines libérées par la bactérie sont responsables de toxi-infections alimentaires. La production de la toxine à l'origine du syndrome de choc toxique staphylococcique est plus rare. Enfin, la leucocidine de Panton-Valentine est une toxine qui crée des pores dans la membrane des cellules et est associée à des infections cutanées. Son rôle dans les maladies invasives n'est cependant pas encore clairement établi (**Shallcross, 2013**).

**I-2-2-Les coliformes**

Les bactéries coliformes comprennent toutes les bactéries aérobies et facultativement anaérobies à Gram négatif, ne formant pas de spores, en forme bâtonnet, qui fermentent le lactose avec formation de gaz dans un délai de 35 à 48 h. Ces organismes comprennent les bactéries habitent l'intestin des animaux à sang chaud et que l'on trouve dans le sol et dans l'eau ainsi que sur la végétation. Etant donné que les organismes du groupe coliformes tirent leur signification de leur source d'habitat, il import de les différencier en type fécale et non fécale, aux fin de l'évaluation de la qualité de l'eau (**FAO, 1978**). Le groupe des bactéries coliforme comprend deux catégories : coliforme totaux et Coliforme fécaux.

***I-2-2-1-Coliformes totaux***

Les coliformes totaux sont des entérobactéries qui incluent des espèces bactériennes qui vivent dans l'intestin des animaux homéothermes, mais aussi dans l'environnement en général (sols, végétation et eau). Ce groupe bactérien est utilisé comme indicateur de la qualité microbienne de l'eau parce qu'il contient notamment des bactéries d'origine fécale, comme *Escherichia-coli* (CEAEQ, 2015). Ce sont des bactéries en forme de bâtonnets, aérobies ou anaérobies facultatives, possédant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase, qui permet de libérer un agent chromogène utilisé dans des milieux de culture servant à les identifier (CEAEQ, 2015; Santé Canada, 2012 ; Who, 2011 ; Archibald, 2000; Edberg et al, 2000).

Les principaux genres bactériens inclus dans le groupe sont : Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella et Serratia (CEAEQ, 2015a; Santé Canada, 2012; Who, 2011).

***I-2-2-2-Coliformes thermo-tolérants***

Les coliformes thermo-tolérants, (ou coliformes fécaux), sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est *Escherichia coli*, et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres Citrobacter, Enterobacter et Klebsiella (Edberg et al, 2000 ; Elmund et al, 1999; Santé Canada, 1991). La bactérie *E.coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés (Edberg et al, 2000; Barthe et al, 1998). Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt d'eaux enrichies en matière organique, tels les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de la transformation alimentaire (OMS, 2000 ; Barthe et al, 1998).

L'intérêt de la détection de ces coliformes, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (CEAEQ, 2000). Par ailleurs, puisque les coliformes fécaux ne prolifèrent habituellement pas dans un réseau de distribution, ils sont utiles pour vérifier son étanchéité, permettant de détecter une contamination fécale découlant par exemple d'infiltrations d'eau polluée dans les canalisations (AWWA, 1990).

### I-3-Généralités sur le genévrier et les huiles essentielles

#### I-3-1-Présentation du genévrier

Le genévrier (*Juniperus*) appartient à la famille des cupressacées où il avoisine les *cupressus* (Siegue, 1985). Il comprend approximativement 60 espèces réparties dans l'hémisphère Nord (Rezzi et al, 1999). Le genre *Juniperus* est divisé en trois sections : *caryocedrus* (une espèce : *J.drupacea* Lapille), *Juniperus oxycedrus* (neuf espèces) et *sabine* (environ 50 espèces) (Adam, 1998).

C'est un arbre ou arbrisseau qui peut avoir 5 à 10 mètre de hauteur (Huguette, 2008) à feuilles persistantes, étroites, linéaires et épineuses rassemblant à des aiguilles. Ses flores donnent des fruits improprement qualifiés de baies, globuleux et charnus (Bruneton, 2009).

La classification botanique du genévrier est rappelée dans le tableau suivant :

**Tableau 03** : Classification botanique de *Juniperus phoenicea* (Small et Dentsch, 2001)

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Embranchement :	Spermatophytes
Sous Embranchement :	Gymnospermes
Classe :	Pinopsida
Ordre :	Pinales
Famille :	Cupressaceae
Genre :	<i>Juniperus</i> L
Espèce :	<i>Juniperus phoenicea</i>

#### I-3-2-Généralités sur les huiles essentielles

Le terme huiles essentielles, également appelées huiles volatiles ou huiles éthérées, est utilisé pour désigner les extraits de plantes aromatiques. Il s'agit d'un mélange de nombreux composants tels que les terpènes, les amines, le soufre, les composés halogénés (chez les algues marines), les hydrocarbures non terpéniques, et d'autres (les acides, les alcools, les aldéhydes, les phénols, etc.) (Ramawat et Mérillon, 2013).

Ce sont des composés à faible solubilité dans l'eau, mais solubles dans les graisses, l'alcool, les solvants organiques et d'autres substances hydrophobes et sont généralement

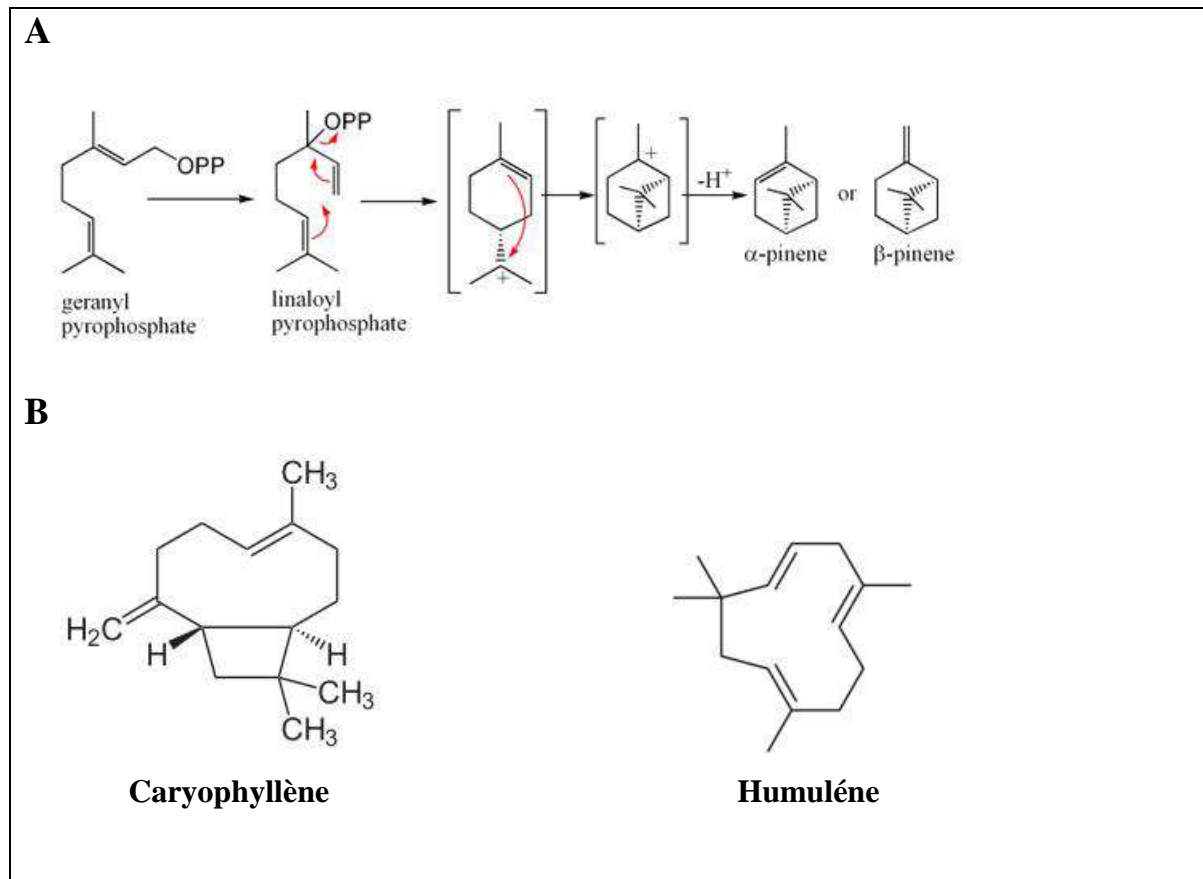
liquides à température ambiante. Ils sont stockés dans des cellules spécialisées des plantes, généralement des cellules sécrétrices ou des conduits (les conduits à résine), des glandes ou trichomes (poils glandulaires) et peuvent être extraites des feuilles, fleurs, bourgeons, graines, fruits, racines, bois ou de l'écorce des plantes par différentes méthodes, y compris l'extraction par solvant et fluide supercritique, expression sous pression, fermentation ou enfleurage, mais aussi à la vapeur basse ou haute pression ou hydrodistillation. Les *H.E.*s sont souvent décrites comme des métabolites secondaires des plantes. Traditionnellement, les métabolites secondaires sont des composés synthétisés par la plante et qui ne semblent pas être essentiels pour la croissance et le développement des plantes; mais semblent ils avoir un rôle dans le système de défense des plantes contre les herbivores animaux et microbiens (**Thormar, 2011**). Ils sont aussi impliqués dans l'attraction des insectes pollinisateurs et le système de communication (allélopathie) au sein du monde végétal (**Buckle, 1997**).

#### **I-3-2-1-Composition chimique**

De nombreux travaux scientifiques ont contribué à mettre en évidence la composition chimique des *H.E.s*. En générale chacune comporte un nombre important de composants (jusqu'à une centaine), tous ne sont pas encore identifiés malgré les progrès de la chimie analytique au cours des dernières années. On trouve généralement de nombreux constituants dans une HE appartenant principalement à deux grands groupes **chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phenyl propane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)**. (**Roquebert, 2002**)

##### ***a)- Composés terpéniques***

On trouve surtout des monoterpènes (C<sub>10</sub>) et des sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) Figure 01, les carbures peuvent être acycliques, monocycliques ou bi-cycliques et porteurs de groupements fonctionnels variés (Alcools Cétones et Esters) (**Ribereau, 1968**).



**Figure 01 :** Structures des Composés terpéniques (A : monoterpènes, B : sesquiterpènes)

(Bruneton, 1999).

**b)-Composés aromatiques dérivés de phénylpropane**

Ils sont moins répandus que les précédents, ce sont souvent des allylphenols, quelques fois des aldéhydes tel que l'Eugéol. La Vanilline est assez fréquente parmi les composés aromatiques (Ribereau, 1968) Figure 02.



**Figure 02 :** Structures des composés aromatiques dérivés de phenyl propane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)

(Roux et Catier, 2007).

**I-3-3-Activité antibactérienne**

Diverses études sur l'activité antimicrobienne, rapportées par **Faouzia (2011)**, ont été menées, sur le pouvoir antimicrobien de *Juniperus phoenicea* Tableau 04.

**Tableau 04 :** Activité antibactérienne de *Juniperus phoenicea*

Région	Souches utilisées	CMI μl /ml	Zones d'inhibition (mm)	Références
Algérie	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	10,3	(Mazari et al, 2010)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	7	15,6	
	<i>Eschirichia coli</i>	–	9,6	
	<i>Bacillus cereuse</i>	–	7,0	
Maroc	<i>Klebsiella pneumonia</i>	0,18	14	(Derwich et al, 2010)
	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	0,22	10	
	<i>Streptococcus mutans</i>	0,40	8	
	<i>Bacillus subtilis</i>	0,32	10	
Egypte	<i>Eschirichia coli</i>	12,34	20	(Elsawi et al, 2007)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	
	<i>Bacillus subtilis</i>	12,34	25	
	<i>Bacilis cereus</i>	–	0	

– : non active

CMI : Concentration minimal d'inhibition

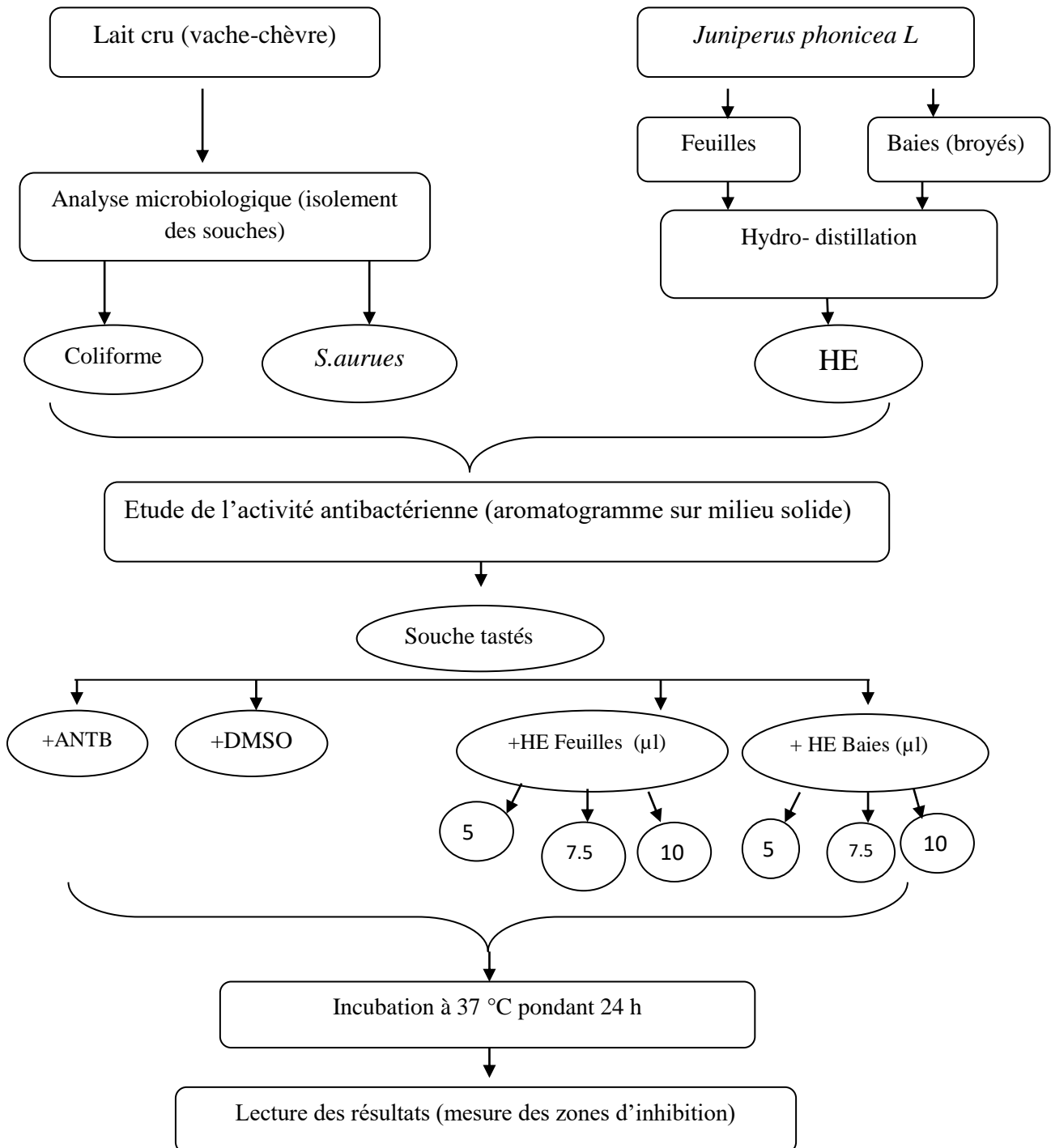
# CHAPITRE II

## Matériel et Méthodes



### II-1-Protocole expérimental

L'objectif scientifique de notre étude consiste à évaluer l'effet des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea L.* (baies et feuilles) sur des bactéries de contamination isolées à partir de lait cru de vache et chèvre. Les principales étapes de notre protocole expérimental sont rassemblées dans l'organigramme suivant (Figure 03).



**Figure 03 :** Organigramme présentant les principales étapes du protocole expérimental.

**II-2-Matériels et produits de laboratoire****II-2-1-Produits de laboratoire et Milieux de culture**

- Ether Di- éthylique(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> O, C<sub>2</sub> H<sub>5</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>
- Eau distillée
- MgSO<sub>4</sub>
- Giolitti contoni
- téllurite de potassium
- BHIB
- Urée
- Indole
- Kovex
- Hektoen
- Chapman
- MH

**II-2-2-Souches ATCC**

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Entérocooccus faecalis* ATCC 29212

**II-2-3-Matériel de laboratoire**

- Ampoule
- Ballons 1L
- Balance de précision (MXX-10) 1L.
- Broyeur électrique
- Chauffe-ballon(HORST).
- Papier Aluminium.
- Réfrigérant eau.
- Rotavapor (laborota 4000 efficient, HBdigital).
- Support élévateur.
- Support statif + anneau.
- Tête de colonne.
- Tubes de verre avec bouchons.

## II-3-Extraction des huiles essentielles

### II-3-1-Matériel végétal

L'échantillonnage a été réalisé au niveau la forêt de Charef durant les mois de Mai et Juin 2018. Suivant un échantillonnage aléatoire, dont les parties aériennes (feuilles et baies) de *JP* ont été récoltés et utilisés pour l'extraction des HE.

### II-3-2-Hydro distillation

Versez 600 ml d'eau distillée dans un ballon à col court de 1L avec 60 g de matériel végétal (feuilles) puis homogénéiser le mélange par agitation pendant quelque secondes. Ce mélange est Chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon jusqu'à ébullition pendant (2 à 3 h). La chaleur permet l'éclatement et la libération de molécules organiques volatiles (huile essentielle).

Ces composés et la vapeur eau passent dans le réfrigérant ou ils se condensent et se transforme en liquide recueillie dans un ballon (hydrolat = distillation) (**Bruneton, 2009**).

On va répéter plusieurs fois jusqu'a l'obtenir le volume suffisante de l'huile essentielle.

Nous suivons les mêmes étapes pour obtenir des huiles essentielles des baies qui sont déjà broyés, le montage d'hydro-distillation est rapporté dans la figure suivante :

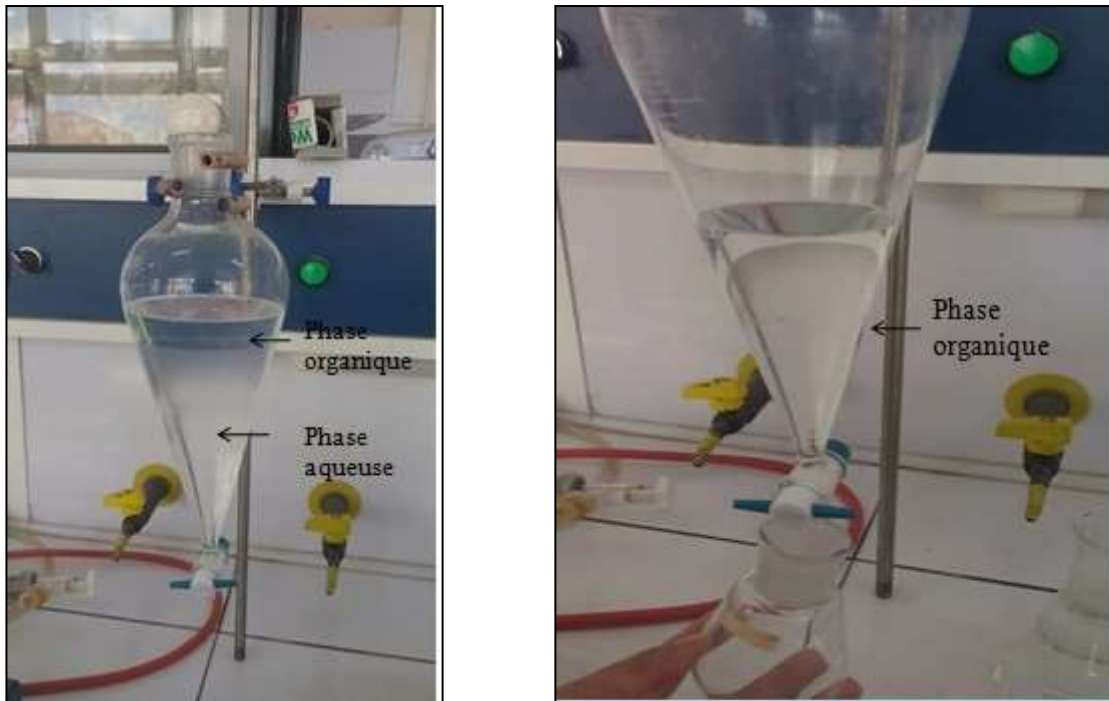


**Figure 04:** Montage d'hydrodistillation (photo originale, 2018)

### II-3-3-Décantation

Dans une ampoule à décanter on dépose le distilla puis on ajoute l'éther Di-éthylique, et après agitation, quelques secondes, on ouvre temps au temps le robinet de l'ampoule à décanter pour dégazer.

On laisse le contenu de l'ampoule se décanter pour récupérer la phase organique dans un bécher. Figure 05.



**Figure 05** : La décantation (extraction liquide-liquide) (photo originale, 2018)

### II-3-4-Evaporation rotative

La phase organique obtenue est évaporé au rotavapor pour éliminer l'éther Di-éthylique et récupérer l'HE qui conserve à base température (4°C) sous l'abri de la lumière dans un tube en verre avec bouchon bien fermé. La figure 06 montre le montage de l'évaporateur rotatif.



**Figure 06** : Evaporation rotative (rotavapor) (photo originale, 2018)

### II-3-5-Calcul du rendement

Calcul du rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matière végétale à traiter (Belyagoubi, 2006).

$$R_{HE} = (M_{HE}/M_S).100$$

**R** : Rendement en extrait fixe en g/100g

**M<sub>HE</sub>** : Quantité d'extrait récupéré en g

**M<sub>S</sub>** : Quantité de matière sèche végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g

## II-4-Recherche des staphylocoques et des coliformes du lait

### II-4-1-Échantillonnage

Les échantillons de lait de vache et de chèvre utilisés proviennent de deux élevages situés, respectivement dans les régions d'El Idrissia et Hassi Bahbah. Les échantillons sont récoltés directement des mamelles des animaux dans des flacons plastiques stériles durant les mois de Juin et Juillet 2018, puis ont été transportées vers le laboratoire. Le tableau 05 résume les sites et les nombre de prélèvements.

**Tableau 05 : Sites et nombre du prélèvement des échantillons de lait**

Lait	Localisation	Nombre de prélèvement	Dates de prélèvement
Vache	IDA	20	19-26/06/2018-12/07/2018
Chèvre	HBB	11	19-26/06/2018-12/07/2018

HBB : Hassi Bahbah    IDA : El Idrissia

### II-4-2-Recherche des coliformes

Les différentes étapes de recherche des coliformes sont respectivement les suivantes

#### II-4-2-1-Enrichissement

Un volume de 1 ml de lait cru a été introduit dans 5 ml de bouillon cœur-cerveau BHIB (Annexe Ia), incubée à 37 °C pendant 24 h.

#### II-4-2-2-Isolement et purification des coliformes

A l'aide d'une anse de platine on prélève une goutte de milieu d'enrichissement qui seraensemencée sur le milieu Hektoen (Annexe Ib) par la technique des stries d'épuisement. Puis les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 h.

Pour la purification des souches, des repiquages successifs sur le même milieu permettent d'obtenir des colonies pures après incubation à 37 °C pendant 24 h.

#### II-4-2-3-Identification biochimique (Test urée-indole)

Le milieu urée-indole (orange) (Annexe Ic) a été utilisé pour l'identification. La technique consiste à ensemencer le milieu avec quelques colonies bactériennes pures et incubé les tubes à 37 °C pendant 24 h.

La présence d'uréase est indiquée par le virage de milieu au rose. Si le milieu reste orange on dit uréase négative.

Pour la mise en évidence de la production d'indole, on ajouté quelque gouttes du réactif de Kovacs dans le milieu urée-indole

La dégradation de l'indole apparait immédiatement se forme d'un anneau rouge.

### **II-4-3-Recherche des *staphylocoques***

Les différentes étapes de recherche des staphylocoques sont respectivement les suivantes :

#### **II-4-3-1-Enrichissement**

Un volume de 1 ml de lait a été introduit dans 5ml de Giolitti Contoni (Annexe Id) additionnée quelques gouttes de tellurite de potassium puis l'incubation à 37 °C durant 24 h.

Les résultats positifs se traduisent par le noircissement des tubes qui sont dues à la réduction de tellurite en tellure noir qui révèle donc la croissance des staphylocoques.

#### **II-4-3-2-Isolement et purification de *S.aureus***

Après l'étape de l'enrichissement les tubes présentant un noircissement au fond ont été ensemencés sur gélose Chapman (Annexe Ie), incubés 18 à 24 h à 37 °C. Sur le milieu de Chapman, les colonies sont souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, la plupart des souches de *S. aureus* fermentent le mannitol et font virer le milieu du rouge au jaune orangé (**Kloos et Bannerman, 1999**). Après une lecture morphologique, les différentes colonies suspectées sont ré-isolées sur le milieu Chapman afin d'obtenir des cultures pures.

#### **II-4-3-3-Identification de *S.aureus* (Test de la coagulase)**

La sécrétion de la coagulase est le caractère taxonomique essentiel de l'espèce (**Ferron, 1984**). C'est une enzyme extracellulaire thermorésistante. Elle est capable de coaguler le plasma humain (ou de lapin) en quelques heures, prélevé sur héparine, Oxalate ou EDTA (**Jarraud et al, 2002**). À partir d'une culture pure de 18 heures de la souche à étudier, nous avons prélevé quelques colonies, ces colonies ont été introduites dans un tube à hémolyse contenant 0.5 ml de plasma humain. Le mélange est placé à l'étuve à 37 °C et est incubé pendant 24 h. Les souches de *S. aureus* provoquant la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures. Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum.

### **II-5-Etude de l'activité antibactérienne (aromatogramme)**

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur le technique antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Le contact se fait par l'intermédiaire des disques de papier sur laquelle on dispose une quantité donnée des extraits de plante.

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grand souplesse dans le choix des antibiotiques testées, de s'appliquer a un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (**Fauchère et Avril, 2002**).

Le protocole suivi est celui décrit par **Mazari et al (2010)** :

- Préparer la suspension bactérienne
- ensemencer la gélose Mueller-Hinton (annexe If) avec la suspension par la méthode d'écouvillonnage. Laisser sécher.
- Les disques de papier Whatman (6 mm de diamètre) stériles imprégnés dans l'huile essentielle à raison de 5  $\mu$ l (7.5  $\mu$ l et 10  $\mu$ l) par disque, sont déposés stérilement sur la surface de la gélose ensemencée.
- Le solvant DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.
- Témoin positif : Des antibiotiques sélectifs pour les souches testées tels que
  - Levofloxacin « LEV » (5  $\mu$ g / disque),
  - Ticacilline + acide clavulanique « TIM » (85  $\mu$ g / disque)
  - Chloramphenicol « C » (30  $\mu$ g / disque) peuvent être utilisés comme témoins positifs.
- Chaque test doit être effectué en triple.
- Après diffusion de l'extrait durant 1 heure, étuver les boîtes à 37°C° durant 18 à 24 heures.

#### **II-5-1-Préparation des disques**

Les disques sont préparés à partir du papier wattman numéro 3 de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisées au four Pasteur pendant 15 minutes à 120 °C, puis stockées à une température ambiante.

#### **II-5-2-Ré-isolement des souches**

Avant la réalisation des tests antibactériens, deux repiquages consécutifs sont effectués pour chaque souche, en premier lieu, elles ont été inoculées dans le BHIB liquide et incubées pendant 24 h à 37 °C. Le deuxième repiquage est effectué sur milieu solide (MH) la veille de la réalisation du test antibactérien. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 18 h pour avoir des cellules bactériennes à leur phase exponentielle de croissance. À partir de cette culture bactérienne fraîche, on prélève quelques colonies que l'on mélange avec de l'eau physiologique.

#### **II-5-3-Préparation des concentrations cellulaires de l'inoculum**

Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) sur un spectromètre. Une Do de 0,01-0,13 correspond à 10<sup>8</sup> UFC/ ml (**Haddouchi et Benmansour, 2008**).



**II-6-Traitements Statistiques**

Afin de mieux exploiter les résultats d'analyse nous avons effectuée une analyse descriptive, par le logiciel « Statistica version 6 », qui consiste en la description des paramètres analyse les uns séparément des autre (moyenne, écart type) d'un part, et une analyse de la variance (ANOVA), par le test de Fischer (Seuil de 25 %) à plusieurs facteurs, pour tester les effets de la variation des facteurs les groupe homogène d'autre part.

# CHAPITRE III

## Résultats et discussion

### III-1-Rendement de l'extraction des huiles

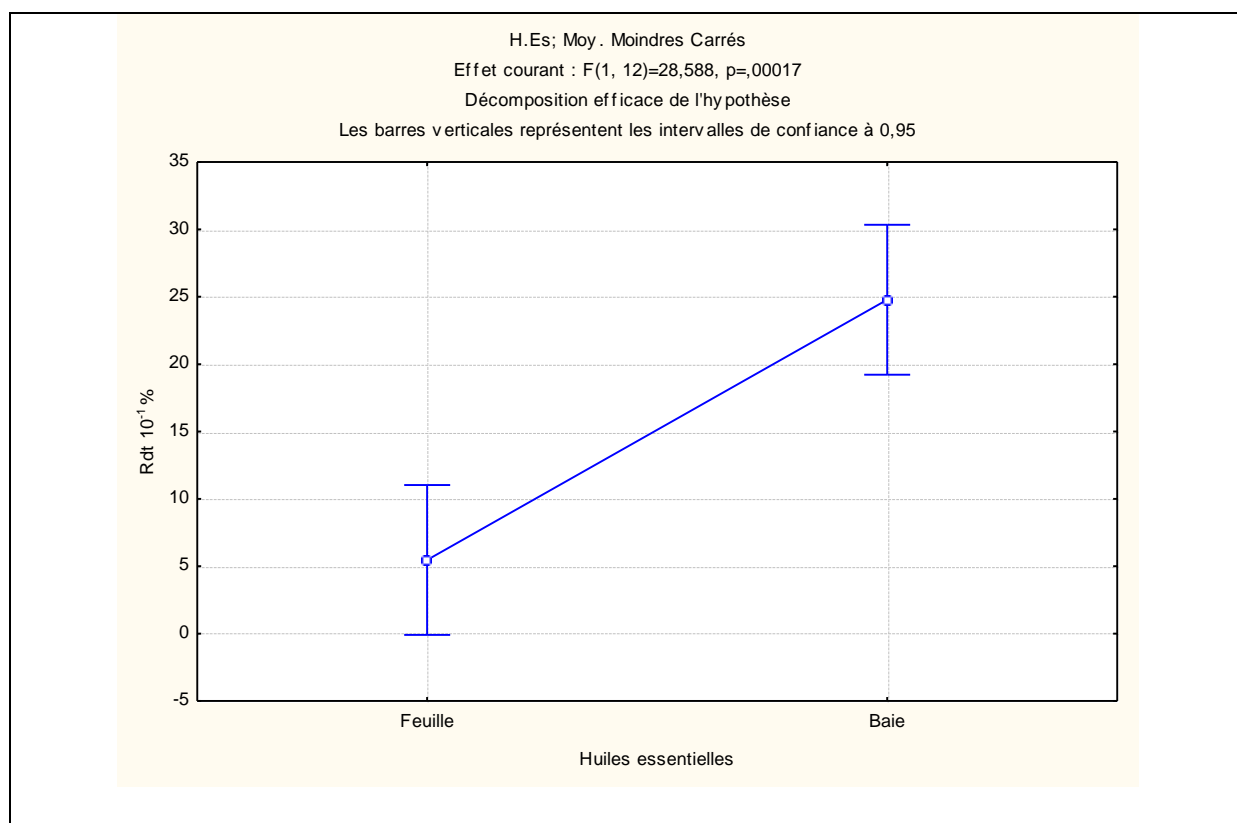
L'extraction des huiles essentielles est réalisée par hydro distillation (**European Pharmacopoeia, 2011**), l'huile est un liquide visqueux, limpide d'une coloration jaunâtre et à odeur forte caractéristique du genévrier.

Le pourcentage du rapport poids de l'huile sur le poids de la matière végétale sèche nous a permis de calculer le rendement des échantillons de JP en huile essentielle. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant :

**Tableau 06** : Rendement en huiles essentielles des feuille et des baies de *Juniperus phonicea* ( $10^{-1}$  %)

	Feuille	Baie
Moyenne.	5,47143	24,78571
Ecart Type	2,61005	9,19410
	a*	b

**NB/(\*)** les lettres alphabétiques expriment les résultats de l'ANOVA. Sur la même ligne les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p \leq 0.05$ )



**Figure 07** : Rendement en huiles essentielles des feuille et des baies de *Juniperus phonicea* ( $10^{-1}$  %)

Dans ce tableau, nous constatons que le rendement en huiles essentielles, extraites des baies de JP, avec une moyenne de 2,47 %, est donc supérieur à celui des feuilles, avec une moyenne de seulement 0.54 %.

Comparativement à d'autres travaux, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par (Adams *et al*, 1996), 0.58 % pour les rameaux, de la sous-espèce *Turbinata* d'Espagne. Pour les huiles extraites des baies notre rendement est supérieure à celui rapporté par El- Sawi *et al*, (2007).avec 0.96 % pour les fruits de JP d' Egypte.

La variabilité des résultats du rendement peut largement être attribuée à la période de récolte ainsi qu'aux différentes variétés de la plante. Selon Kelen *et Tepe* (2008), le choix de la période de récolte ainsi que la partie de la plante utilisé sont primordiaux eu termes de rendement et de qualité des huiles essentielles.

Nos résultats confirment également ceux trouvés par plusieurs auteurs, sur des variétés locales de JP en différentes régions d'Algérie Tableau 07.

**Tableau 07 :** Rendement en huiles essentielles de *Juniperus phonicea* selon les auteurs

Fraction de la plante	Rendement	Région	Auteurs	Année
Feuille	0.8 %	Djelfa	Dob <i>et al</i>	2008
Feuille	1.11%	Batna	Bouzbata et Hafed	2009
Feuille	1.27 %	Souk Ahras	Bouzbata et Hafed	2009
Feuille	0.9%	Naâma	Bouyahaoui	2017
Baie	2.5% /	Naâma	Bouyahaoui	2017

### III-2-Isolement et identification des germes de contamination

#### III-2-1-Coliformes :

##### III-2-1-1-Aspect de colonies

Sur le milieu Hektoen les colonies apparaissent jaune saumon figure 08 correspondants à *E.coli*. Ce milieu permet d'isoler 14 souches à partir lait de vache et 7 souches à partir lait de chèvre.



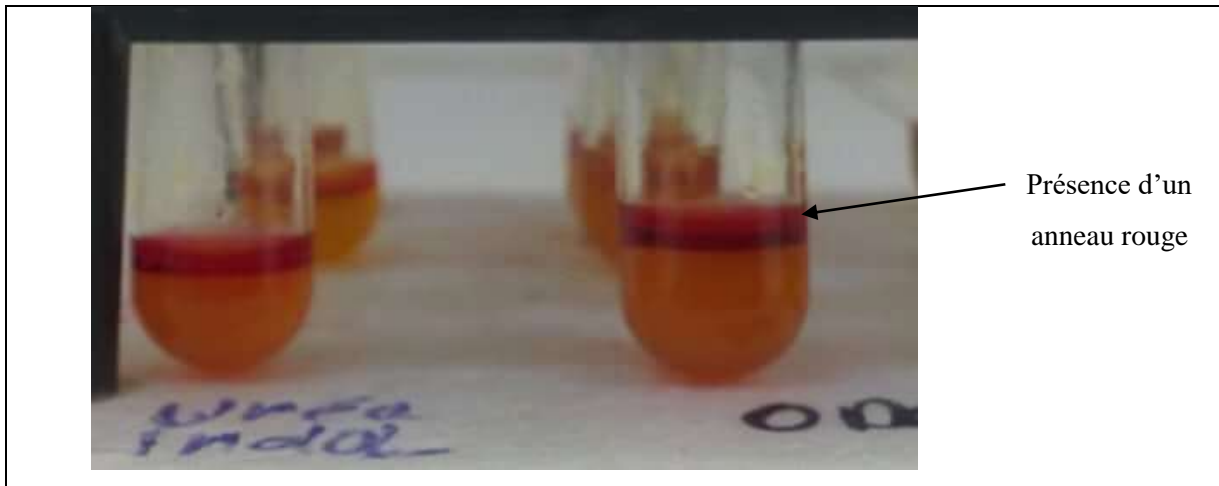
**Figure 08** : L'aspect d'*E.coli* cultivée sur milieu Hektoen (photo originale, 2018)

##### III-2-1-2-Teste Urée-indole

Les tests biochimiques (urée-indole) figure 09 et 10 permettent de confirmer la présence *E.coli* (urée - / indole +) au niveau des laits échantillonnés.



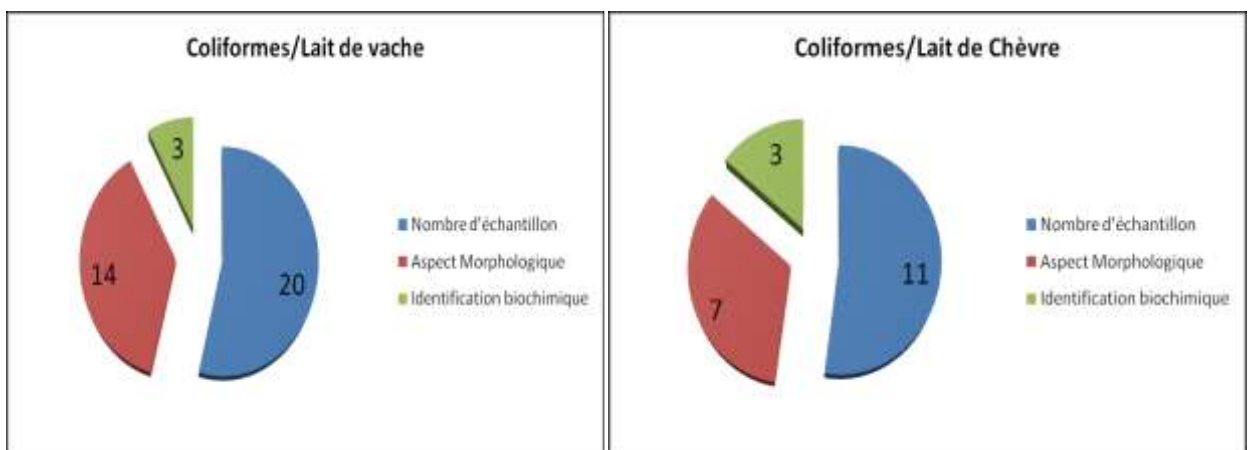
**Figure 09** : Résultats de test uréase (photo originale, 2018)



**Figure 10** : Résultats de test indole positive (photo originale, 2018)

Pour le lait vache on a confirmé la présence de 3 souches *E.coli*, ce qui représente un taux de 21,42 % sur la totalité des souches isolées par rapport à leur aspect morphologique (colonie jaune saumon dans 14 boîtes de pétrie) et de 15 % par rapport à la totalité des prélèvements examinés (20 échantillons).

Pour le lait chèvre on a confirmé la présence de 3 souches *E.coli*, ce qui représente un taux de 42,85 % sur la totalité des souches isolées par rapport à leur aspect morphologique (7 boîtes de pétrie) et de 27,27 % par rapport à la totalité des prélèvements examinés (11 échantillons) Figure 11.



**Figure 11** : Nombre des coliformes confirmés dans les deux types de lait

Ces résultats montrent que les deux types de lait sont contaminés par *E.coli*. Selon **Guiraud et Rosec (2004)** la présence des coliformes fécaux est considérée comme un indice

de contamination fécale, il s'agit donc plutôt de marqueurs de mauvaise maîtrise d'hygiène ainsi qu'à la mauvaise manipulation.

### **III-2-2-Staphylocoques**

15 souches de *S.aureus* ont été isolées à partir 20 échantillons de lait cru de vache, et 4 souches isolée à partir lait cru de chèvre.

#### **III-2-2-1-Aspect de colonies**

Sur le milieu Chapman les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique de *S.aureus*.

Les souches forment des colonies pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol figure 12.



**Figure 12** : Aspect des colonies de *S.aureus* sur milieu Chapman (photo originale, 2018)

#### **III-2-2-2-Test coagulase**

Les tests biochimiques (coagulase) figure 13 permettent de confirmer la présence de *S.aureus* au niveau des laits échantillonnés.

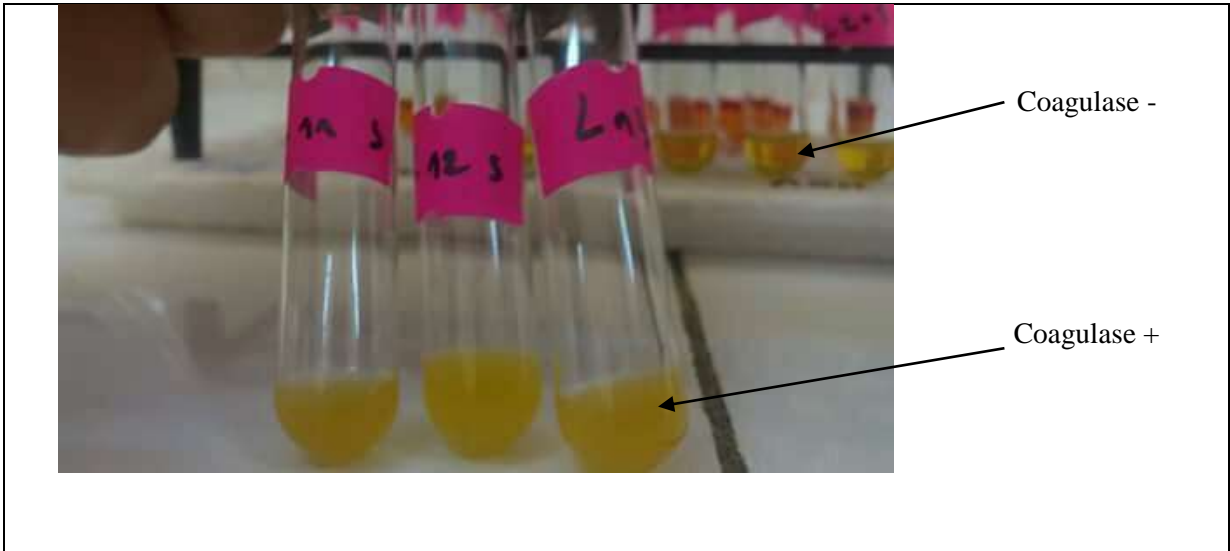


Figure 13 : Résultats de test coagulase positif de *S.aureus* (photo originale, 2018)

Pour le lait vache on a confirmé la présence de 5 souches *S.aureus*, ce qui représente un taux de 33.33 % sur la totalité des souches isolées par rapport à leur aspect morphologique (colonie pigmentées entouré d’un halo jaune doré 15 boîtes de pétrie) et de 25 % par rapport à la totalité des prélèvements examinés (20 échantillons). Ces résultats ne sont pas approuvés les normes du **JORA (N°35, 1998)** qui préconise l’absence de ces germes dans le lait cru.

Par contre pour le lait chèvre, les 4 souches isolées par rapport à leur aspect morphologique ont présenté une coagulase négative ce qui montre la non contamination de ce lait par les staphylocoques. Ces résultats sont en accord avec les normes du **JORA (N°35, 1998)**. Le Figure 14 présentée la répartition des souches :

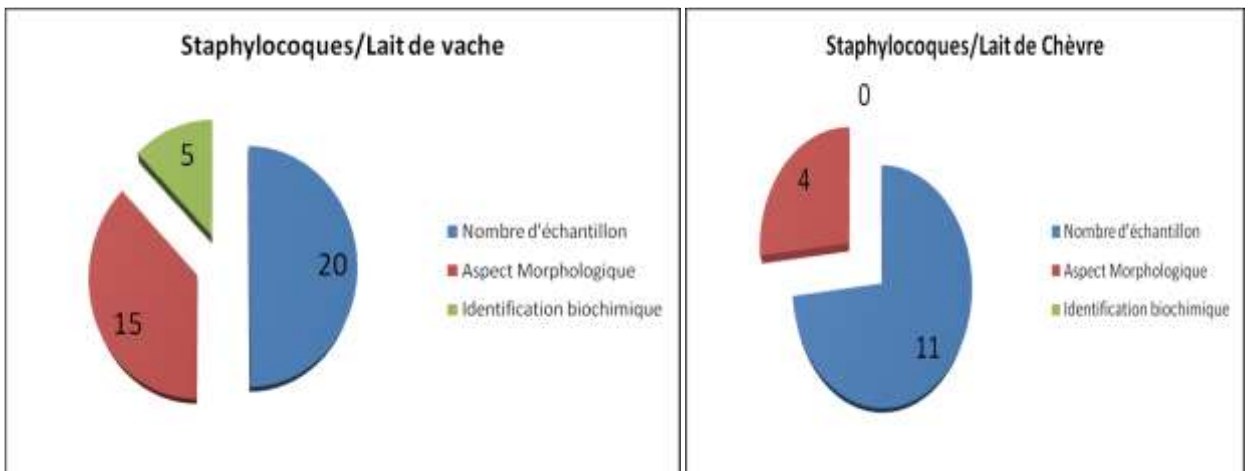


Figure 14 : Nombre des *S.aureus* confirmés dans les deux types de lait



### III-3-Résultats de L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donné par **Mutai et al (2009)** ; ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice :  $D > 30$  mm
- Fortement inhibitrice :  $21 \text{ mm} < D < 29$  mm
- Modérément inhibitrice :  $16 \text{ mm} < D < 20$  mm
- Légèrement inhibitrice :  $11 \text{ mm} < D < 16$  mm
- Non inhibitrice :  $D < 10$  mm

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* se traduit par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Nous avons observées que les huiles essentielles de *juniperus phoenicea* ont une activité antibactérienne contre les souches examinées (annexe II). Le résultat de DMSO a été négatif avec toutes les souches

#### III-3-1-Activité antimicrobienne contre les coliformes

##### III-3-1-1-Résultats

Les résultats de l'activité antibactérienne des HE de Jp, exprimée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition, contre les différentes souches d'*E.coli* isolées à partir des laits de chèvre et de vache est présentée dans le tableau 08. L'illustration graphique de ces résultats est rapportée dans la Figure 15.

**Tableau 08** : Résultats de l'activité antimicrobienne contre les coliformes ( $\emptyset$  mm)

HE	baies				feuilles			
Souches	Témoin	D5	D7,5	D10	Témoin	D5	D7,5	D10
E.c9	23,547	2,333	2,333	8,000	23,547	9,327	11,300	16,743
	1,218	4,041	4,041	0,000	1,218	1,623	2,600	3,090
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
E.c12	29,797	4,667	5,000	8,000	29,797	9,667	11,437	12,800
	0,595	4,041	4,359	1,000	0,595	2,026	0,257	1,054
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
E.c15	27,910	2,333	4,667	7,333	27,910	9,667	11,497	16,757
	0,121	4,041	4,041	0,577	0,121	0,862	0,684	6,341
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>cb</b>	<b>c</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
E.c9C	25,450	2,333	7,000	8,333	25,450	9,787	11,480	12,673
	0,000	4,041	0,000	0,577	0,000	0,347	0,519	0,628
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
E.c10C	28,310	4,667	7,667	8,000	28,310	8,773	10,707	13,650
	5,058	4,041	1,155	1,000	5,058	0,636	2,709	2,302
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>cb</b>	<b>c</b>
E.c11C	25,370	5,000	7,667	8,333	25,370	8,520	9,187	12,903
	0,797	4,359	0,577	0,577	0,797	0,491	0,737	1,879
	<b>A</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>cb</b>	<b>c</b>

**NB/(\*)** les lettres alphabétiques expriment les résultats de l'ANOVA. Sur la même ligne les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p \leq 0.05$ )

III-3-1-2-Discussion

L’observation à montré que les différentes doses d’HE de Jp, ont induit des ZI variables. Les HE des baies, avec une ZI, dont le diamètre varie entre 2.33 et 8.66 mm, sont pratiquement non inhibitrice ( $D < 10$  mm) contre les souches *E. coli* (9, 12,15, 9c, 10 c, 11 c).

Pour les HE des feuilles, les dose D<sub>5</sub> et D<sub>7,5</sub>, avec une ZI dont le diamètre est inférieur à 10 mm, sont globalement non efficace (non inhibitrice) contre les coliformes.

Alors que la forte dose D<sub>10</sub> des HE des Feuilles est soit légèrement ( $11 \text{ mm} < D < 16$  mm) soit modérément inhibitrice ( $16 \text{ mm} < D < 20$  mm) vis-à-vis des souches de coliformes. Sur le plan statistique, l’analyse de variance (ANOVA) par le test de Fisher, révèle que les différences ne sont pas significative ( $p \geq 0.05$ ) entre les dose D<sub>5</sub>, D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub>.

Par ailleurs, le diamètre de la zone obtenu pour les différentes souches d’*E.coli*, avec des résultats allant de 23,54 jusqu’à 29,79mm, montre une forte activité inhibitrice du témoin utilisé.

L’analyse de variance, par le même test, montre une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre le témoin et les différentes doses d’HE.

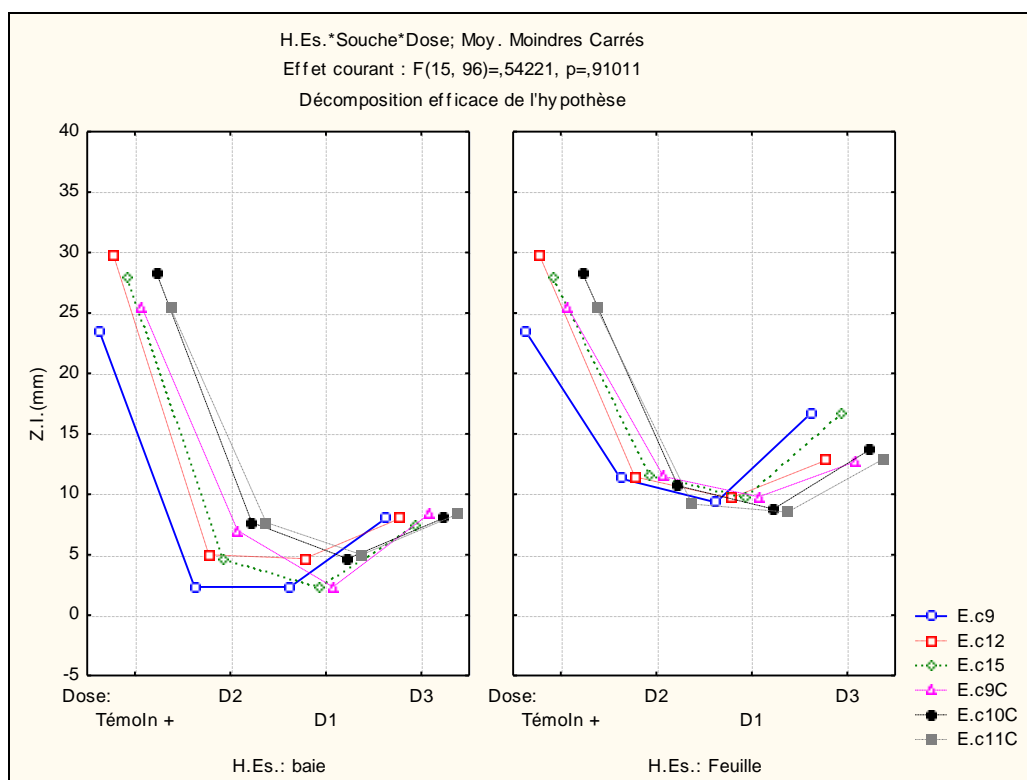


Figure 15 : Résultats de l’activité antimicrobienne contre les coliformes

**III-3-2-Activité antimicrobienne contre les staphylocoques****III-3-2-1-Résultats**

Les résultats de l'activité antibactérienne des HE de Jp, exprimée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition, contre les différentes souches de *S.aureus* isolées à partir des laits de chèvre et de vache est présentée dans le tableau 09. L'illustration graphique de ces résultats est rapportée dans la Figure 16.

**Tableau 09** : Résultats de l'activité antimicrobienne contre les staphylocoques (Ø mm)

HE	Baies				Feuilles			
Souches	Témoin	D5	D7,5	D10	Témoin	D5	D7,5	D10
s.a2	24,303	9,667	13,333	17,000	24,303	7,150	8,800	10,547
	5,693 <b>a</b>	1,155 <b>b</b>	1,528 <b>cb</b>	4,359 <b>c</b>	5,693 <b>a</b>	0,423 <b>b</b>	0,173 <b>b</b>	1,013 <b>b</b>
s.a10	23,230	7,667	9,667	10,333	23,230	18,667	23,183	43,367
	0,953 <b>a</b>	0,577 <b>b</b>	1,155 <b>b</b>	0,577 <b>b</b>	0,953 <b>a</b>	1,650 <b>a</b>	1,049 <b>a</b>	5,358 <b>b</b>
s.a11	23,230	7,667	8,667	10,333	23,230	16,797	29,140	37,200
	0,953 <b>a</b>	0,577 <b>b</b>	0,577 <b>b</b>	0,577 <b>b</b>	0,953 <b>a</b>	5,376 <b>b</b>	9,100 <b>a</b>	5,903 <b>c</b>
s.a12	23,223	3,667	10,333	11,333	23,223	17,533	20,223	30,197
	2,558 <b>a</b>	6,351 <b>b</b>	1,155 <b>c</b>	1,528 <b>c</b>	2,558 <b>a</b>	3,431 <b>a</b>	2,754 <b>a</b>	2,800 <b>b</b>
s.a13	28,073	9,000	10,000	14,000	28,073	16,367	18,300	24,400
	0,410 <b>a</b>	1,000 <b>b</b>	1,000 <b>b</b>	1,000 <b>b</b>	0,410 <b>a</b>	5,659 <b>b</b>	5,256 <b>b</b>	5,991 <b>a</b>
s.aTTC	33,103	2,667	9,667	14,333	33,103	8,633	10,043	11,843
	8,291 <b>a</b>	4,619 <b>b</b>	1,528 <b>c</b>	4,726 <b>c</b>	8,291 <b>a</b>	0,874 <b>b</b>	0,386 <b>b</b>	0,919 <b>b</b>

NB/(\*) les lettres alphabétiques expriment les résultats de l'ANOVA. Sur la même ligne les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p \leq 0.05$ )

**III-3-2-2-Discussion**

L'observation à montré que les différentes doses d'HE de Jp, ont induit des ZI variables.

Pour les HE des baies, les dose D<sub>5</sub> et D<sub>7,5</sub>, avec une ZI dont le diamètre est inférieur ou sensiblement égal à 10 mm., n'évoquent aucune activité antibactérienne contre les staphylocoques. Ces HE, avec une ZI dont le diamètre varie entre 2.66 et 10,33 mm, sont pratiquement non inhibitrice contre les souches *S.aureus* (10, 11, 12 et 13).

La forte dose (D<sub>10</sub>) des HE des baies, avec une ZI dont le diamètre est de 17 mm, montre une action modérément inhibitrice vis à vis de la souche *S.aureus* 2.

Par ailleurs, le diamètre de la zone obtenu pour les différentes souches de staphylocoques, avec des résultats allant de 23,22 jusqu'à 33,10 mm, montre une forte activité inhibitrice du témoin utilisé.

L'analyse de variance, par test Fisher montrer une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ente les doses  $D_5/D_{7,5}$  et  $D_{10}$  d'une part ; et entre  $D_{10}$  et  $T^+$  d'autre part chez les souches *S.aureus*

Pour les HE des Feuilles, la dose  $D_5$  est soit légèrement ( $11 \text{ mm} < D < 16 \text{ mm}$ ) soit modérément inhibitrice ( $16 \text{ mm} < D < 20 \text{ mm}$ ) vis-à-vis des souches *S.aureus* (10, 11, 12 et 13). La dose  $D_{7,5}$  est , quant à elle, soit modérément inhibitrice ( $16 \text{ mm} < D < 20 \text{ mm}$ ) soit fortement inhibitrice ( $21 \text{ mm} < D < 29 \text{ mm}$ ). Alors que la dose  $D_{10}$  est fortement inhibitrice ( $21 \text{ mm} < D < 29 \text{ mm}$ ) vis-à-vis des mêmes souches précitées (10, 11, 12 et 13)

Par ailleurs, l'action des différentes doses des HE, vis-à-vis des souches *S.aureus* 2 et ATCC, n'a montré aucune activité inhibitrice, révélant ainsi une certaine résistance de ces deux souches. L'analyse de variance (ANOVA), par test Fisher montrer une absence de différence significative ente  $D_5$   $D_{7,5}$  et  $D_{10}$  ( $p \geq 0,05$ ) pour les *S.aureus* 2 et ATCC.

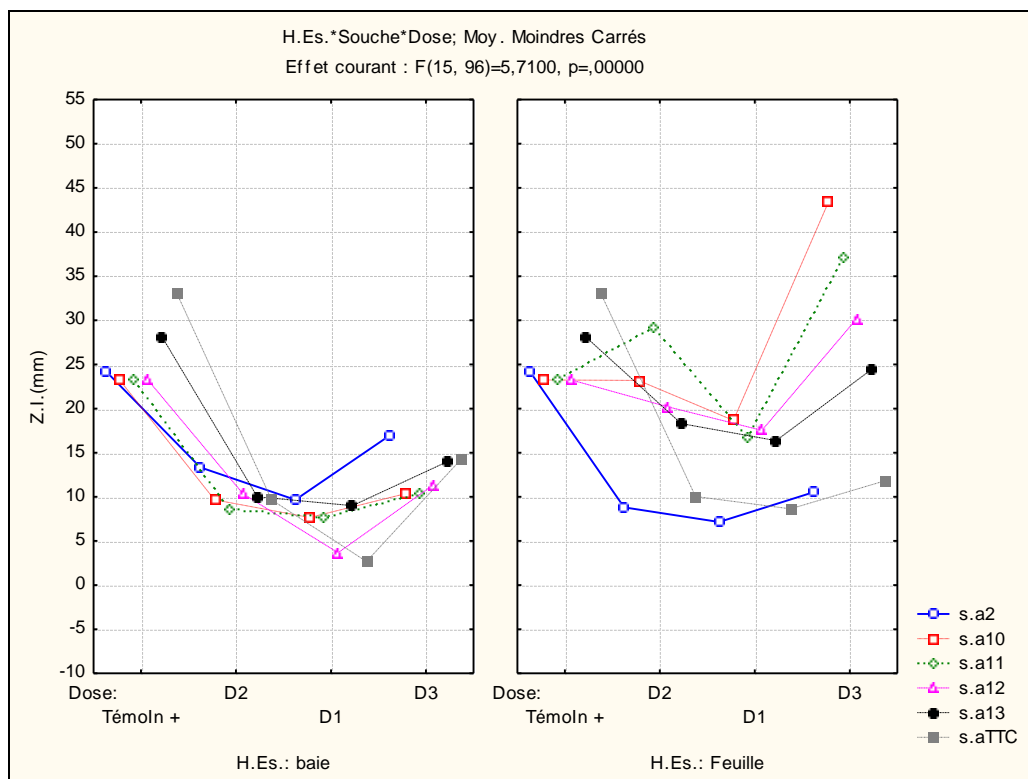


Figure 16 : Résultats de l'activité antimicrobienne contre les staphylocoques

La forte dose D<sub>10</sub> des HE de feuilles, avec une ZI de 43,36 mm pour *S.aureus* **10** et 37,20 mm pour *S.aureus* **11**, a été très fortement inhibitrice (D > 30 mm) vis-à-vis de ces souches (**10** et **11**). L'activité inhibitrice de cette dose est significativement supérieure à celle du témoin + avec une ZI de 23,23 mm

L'analyse de variance (ANOVA), par test Fisher montre une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) entre D<sub>10</sub> et les trois autres doses (D<sub>5</sub>/D<sub>7,5</sub> et T<sup>+</sup>).

### III-3-3-Activité antimicrobienne contre Pseudomonas et Enterococcus

#### III-3-3-1-Résultats

Les résultats de l'activité antibactérienne d'HE vis-à-vis des souches Pseudomonas et Enterococcus sont présentés dans le tableau 10, et leur illustration graphique est rapportée dans la figure 17.

**Tableau 10** : Résultats de l'activité antimicrobienne contre Pseudomonas et enterococcus

HE	Baies				Feuilles			
Souches	Témoin	D5	D7,5	D10	Témoin	D5	D7,5	D10
P.a.TCC	25,910	4,667	5,333	6,333	25,910	17,000	22,800	27,040
	0,069	4,041	4,619	5,686	0,069	0,000	0,000	0,000
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>ac</b>	<b>d</b>
E.f.TCC	25,920	2,333	7,000	8,667	25,920	8,667	11,567	15,023
	1,628	4,041	0,000	0,577	1,628	0,833	3,035	4,811
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>c</b>	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>cb</b>	<b>c</b>

NB/(\*) les lettres alphabétiques expriment les résultats de l'ANOVA. Sur la même ligne les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p \leq 0,05$ )

#### III-3-3-2-Discussion

- Activité antimicrobienne contre *Pseudomonas Aruginasa*

Pour les HE des baies, les trois doses D<sub>5</sub>, D<sub>7,5</sub>, et D<sub>10</sub>, avec une ZI dont le diamètre varie entre 4,66 et 6,33 mm, n'évoquent aucune activité antibactérienne contre *Pseudomonas Aruginasa*

L'analyse de variance, par test Fisher ne montre aucune différence significative ( $p \geq 0,05$ ) entre les doses D<sub>5</sub>/D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub>. Alors que la comparaison des trois doses avec le témoin positif (T<sup>+</sup>) révèle des différences significatives ( $p \leq 0,05$ ).

Pour les HE des feuilles, on note globalement que les trois doses sont assez efficaces. La dose D<sub>5</sub> est modérément inhibitrice (16 mm < D < 20 mm) alors que les doses D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub>,

avec une ZI.dont le diamètre varie entre 22,8 et 27,04 mm, ce sont révélées fortement inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

L’analyse de variance, par test Fisher montrer une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ente les doses D<sub>5</sub>/D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub> d’une part ; et entre (D<sub>5</sub> et D<sub>10</sub>) et T<sup>+</sup> d’autre part, chez les souches *Pseudomonas aeruginosa*

- Activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis*

Pour les HE des baies, les trois dose D<sub>5</sub>, D<sub>7,5</sub>, et D<sub>10</sub>, avec une ZI.dont le diamètre varie entre 2,33 et 8,66 mm, n’évoquent aucune activité antibactérienne contre *Enterococcus faecalis*

L’analyse de variance, par test Fisher ne montrer aucune différence significative ( $p \geq 0,05$ ) ente les doses D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub>. Alors que la comparaison des trois doses avec le témoin positif (T<sup>+</sup>) révèle des différences significatives ( $p \leq 0,05$ ).

Pour les HE des feuilles, On Note globalement que les doses D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub>, avec une ZI.dont le diamètre varie entre 11,56 et 15,02 mm, ce sont révélées légèrement inhibitrice (11 mm < D < 16 mm) vis-à-vis de *Enterococcus faecalis*

L’analyse de variance, par test Fisher montrer une différence significative ( $p \leq 0,05$ ) ente le témoin et les 3 doses D<sub>5</sub>/ D<sub>7,5</sub> et D<sub>10</sub> d’une part ; et entre D<sub>5</sub> et D<sub>10</sub> d’autre part, chez les souches *Enterococcus faecalis*

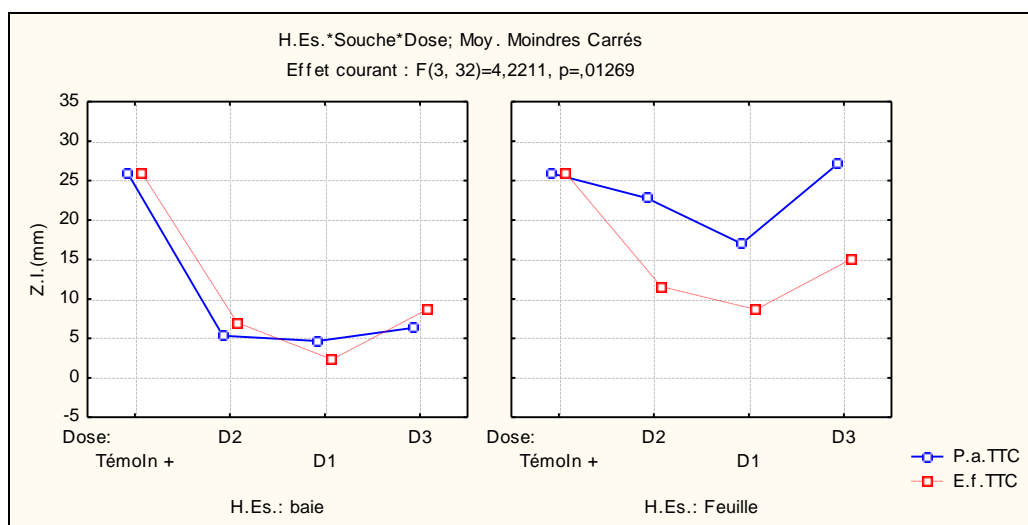


Figure 17 : Résultats de l’activité antimicrobienne contre *Pseudomonas* et *enterococcus*

A partir de ces résultats, on peut conclure que les HE de feuilles sont plus efficaces que celles de baies contre les bactéries testés, nos résultats sont en accord avec ceux de **Mansouri et al (2010)**.

En effet, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *J. oxycedrus* D'Algérie pourrait être associée à la quantité des terpènes et de leurs composés majoritaires (par exemple  $\alpha$ -pinène, myrcène,  $\beta$ -pinène, linalol, myrcène,  $\beta$ -phellandrene et germacrene D).

Ces composés possèdent une forte activité antimicrobienne (**Ramdani et al, 2013 ; Devendra et al, 2011 ; Derwich et al, 2010 ; Mansouri et al, 2010 ; Mazari et al, 2010 ; Deba et al, 2008**), en attaquant à la membrane plasmique, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et la perte de constituants cellulaires (**Sikkema et al, 1994 ; Denyer et Hugo, 1991; Knobloch et al, 1989 ; Jacob et al, 1979**).

# Conclusion



*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont des bactéries qui font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés, on les retrouve souvent dans les aliments couramment consommés comme le lait cru. Puisque ces souches sont multirésistantes, plusieurs études ont été réalisées pour trouver des solutions alternatives en utilisant les huiles essentielles des plantes aromatiques. La contamination du lait devient un problème majeur de la santé publique.

L'objectif de notre étude étant d'apprécier l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* L vis-à-vis de ces germes de contamination du lait cru

Cette étude montre que le lait est contaminé, 25% des échantillons de lait de vache sont contaminés par *S.aureus* et 15 % par *E.coli*. Et 27,27 % des échantillons de lait de chèvre ont contaminés par *E.coli*,

L'évaluation de l'activité antibactérienne a confirmé que les huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* L, ont une capacité antibactérienne très importante contre toutes les souches examinées indépendamment de leur Gram et de leur morphologie.

Notons que les HE<sub>s</sub> de feuilles se sont montrées plus actives que celles des baies. De même que, ce pouvoir est plus important vis-à-vis *S.aureus* et *P.aeruginosa*. Par contre *E.coli* et *E.feacalis* ont été moins sensibles.

Enfin, les résultats ont montré l'utilité des plantes médicinales et la possibilité d'utiliser les huiles essentielles dans la lutte contre les bactéries intractables, d'autant plus qu'à ce jour le développement de bactéries n'a pas fait la preuve de sa résistance vis-à-vis des huiles essentielles, surtout le genévrier qui est très largement présent dans les milieux steppiques et ses huiles sont assez efficaces en faibles doses.

Par ailleurs, en perspectives de recherche, les résultats dégagés par cette étude méritent d'être approfondies par d'autres travaux visant à analyser les effets des huiles essentielles du genévrier sur les:

- caractéristiques microbiologiques du lait cru de différentes espèces
- propriétés sensorielles du lait cru de vache et même d'autres espèces
- caractéristiques physicochimiques et microbiologiques des produits laitiers transformés.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

**Adams RP. (1998).** *The leaf essential oils and chemotaxonomy of juniperus sect. Juniperus.* Biochemical systematics and ecology. **26** : 637-645.

**Adams RP ; Barrero AF ; Lara A. (1996).** *Comparisons of the leaf essential oils of Juniperus phoenicea, J. phoenicea subsp. eu-mediterranea Lebr. et Thiv. and J. phoenicea var. turbinata (Guss) Parl. J. Essent. Oil Res. 8: 367-371.*

**Ait amer Meziane L. (2008).** *Aptitude des laits de chèvres et de brebis à la coagulation par des protéases d'origine avicole.* Thèse de Magister en Science Agronomique. 10- 14.

**Alais C. (1984).** *Science de lait : principes des techniques laitières.* 4<sup>ème</sup> édition, SEPAIC, PARIS, 814.

**Archibald F. (2000).** *The presence of coliforme bacteria in Canadian pulp and paper mill water systems - a cause for concern?* Water qual Res J. Canada. **35** : 1-22.

**Avril JL ; Dabernat H ; Denis F et Monteil H. (1992).** *Bactériologie clinique.* 2<sup>ème</sup> Edition, Ellipses, Paris. Pp 11-28.

**AWWA. (1990).** *Water quality and treatment.* American Water Works Association, 4<sup>e</sup> édition, 1194.

**Barthe C ; Perron J et J.M.R. (1998).** *Guide d'interprétation des paramètres microbiologique d'intérêt dans le domaine de l'eau potable .* Document de travail (version préliminaire), ministère de l'Environnement du Québec .155 .

**Belyagoubi LM. (2006).** *Effet de quelque essence végétale sur la croissance des moisissures de détérioration de céréales .* Thèse magistère .Université de Tlemcen.

**Bouzabata A; Hadeif, Y. (2009) .***Variability of the Yield and the Chemical Composition of Essential Oils of Juniperus Phoenicea L. coming from two regions of Algeria. TJMPNP. 2: 1-9.*

**Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* 3<sup>e</sup> Ed : Lavoisier. Paris, 1120.

**Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* 4<sup>ème</sup> ED : lavoisies. Paris, 1269 .

**Bruneton J. (2009).** *Pharmacognosie –Phytochimie, plantes médicinales ,* 4<sup>ème</sup> édition, revue et augmentée. Tec et Doc. Edition médicales internationales. Paris, 1288.

**Buckle J. (1997).** *Clinical aromatherapy Essential oil in practice.* 2nd Ed. United States of America, 424 .

**Cayot P ; et Loriont D. (1998).** *structures et techno fonction des protéines du lait,* Edition .TEC et DOC Lavoisier , Paris, 363.

## Références bibliographiques

**CEAEQ. (2015).** *Recherche et dénombrement simultané des coliformes fécaux et d'Escherichia coli dans l'eau potable avec méthode par filtration sur membrane.* Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.

**Couture B. (1990).** *Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical».* Vigot, Paris. 15-32.

**Dancer SJ and Noble WC. (1991).** *Nasal, axillary, and perineal carriage of Staphylococcus aureus among women: identification of strains producing epidermolytic toxin.* *J. Clin. Pathol.* **44**: 681-684.

**Deba F; Xuan TD; Yasuda M and Tawatu S. (2008).** *Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from Bidens pilosa Linn. var. radiata.* *Journal of Food Control.* **19**: 346-352.

**Denyer SP and Hugo WB. (1991).** *Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In Mechanisms of Action of Chemical Biocides. Edited by Denyer SP, Hugo WB. Oxford, the Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication: 171–188.*

**Derwich E; Benziane Z and Boukir A. (2010).** *Chemical composition of leaf essential oil of Juniperus phoenicea and evaluation of its antibacterial activity.* *International Journal of Agriculture and Biology.* **12**: 199–204.

**Devendra M; Shivani J; Sangeeta PS; Abhimanyu D and Ganga B. (2011).** *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of Senecio rufinervis DC, (Asteraceae).* *Indian Journal of Natural Products and Resources.* **2(1)**: 44.

**Djenadi F. (2011).** *Mémoire online, contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (juniperus phoenicea): essai des huiles essentielles etncomposés phénoliques.* Université a mira de bejaia algérie. Master en biologie option biochimie appliquée.

**Dob T; Dahmane D ; Chelghoum C. (2008).** *Chemical Composition of the Essential Oil of Juniperus phoenicea L. from Algeria.* *Journal of essential oil.* **20 (1)**: 15-20.

**Edberg SC; Rice EW ; karlin RJ et Allen MJ. (2000).** *Escherichia coli : the best biological drinking water indicator for public health protection .* *Journal of applied microbiology.* **88**: 106 -116.

**Elmund GK ; Allen MJ et Rice EW . (1999).** *Comparison of Escherichia coli, total coliform and fecal coliform populations as indicators of wastewater treatment efficiency .* *Water Environ.* **71**: 332-339.

**El-Sawi ; Hemaia M ; Motawae and Amal M. Ali . (2007).** *chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of Juniperus phoenicea l. grown in egypt.* *Afr. J. Traditional, Complementary and Alternative Medicines.* **4**: 417 – 426.

## Références bibliographiques

**European Pharmacopoeia, (2011).** 7th edition, Council of Europe, Strasbourg, 1160-1161.

**FAO. (1998).** *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.* Edition FAO. Rome, Italie. N° 28.

**FAO. (1978).** *L'eau dans les usines de traitement du poisson.* Département des pêches et de l'environnement. Ottawa, Canada. N° 174.

**Fasquelle R. (1974).** *Eléments de bactériologie médicale.* 9ème édition. Flammarion, Paris. 27-36.

**Fauchere JL et Avril JL. (2002).** *Bactériologie générale et médicale.* Ellipses, Paris. 213-217.

**Ferron A. (1984).** *Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine.* 12ème édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.

**Franworth E et Mainville I. (2010).** Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe. <http://www.dos.transf.edwa.pdf>

**Fredot. (2006).** *Connaissance des aliments-Bases alimentaire et nutritionnelles de la diététique.* Tec et Doc, Lavoisier. 397.

**Garrity GM; Johnson KL; Bell J and Searles DB. (2007).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2ème Edition. New York.

**Gram H. (1884).** *Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten.* Fortschritte der Medizin 2: 185-189.

**Guinan ME; B.B. Dan RJ; Guidotti AL; Reingold GP; Schmid EJ; Bettoli JG; Lossick KN; Shands MA; Kramer NT; Hargrett RL; Anderson and Broome CV. (1982).** *Vaginal colonization with Staphylococcus aureus in healthy women: a review of four studies.* Ann. Intern. Med. 96: 944-947.

**Guiraud JP et Rosec JP. (2004).** *Pratique des normes en microbiologie alimentaire.* Edition AFNOR, 95.

**Haddouchi F et Benmansour A. (2008).** *Les huiles essentielles, utilisation et activité biologique, application de deux plantes aromatiques.* Les technologies de laboratoire. 8: 20-27.

**Hermier J., Lenoir, J., Weber, F. 1997.** *Rôle des bactéries lactiques dans la production des facteurs anti microbien, les groupes microbiens d'intérêt laitier.* Edition Cepil. Paris. : 9-60.

## Références bibliographiques

**Huguette M. (2008).** *La route des épices, aromate, condiments et mélange d'épices.* ED : sang de la terre. Paris, 190.

**Jarraud S; Mougel C; Thioulouse J; Lina G; Meugnier H; Forey F Nesme X; Etienne J and Vandenesch F. (2002).** *Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease.* Infect Immun. **70**: 631-641.

**JORA. (1993).** Journal officiel de la Republique Algérienne.Démocratique et populaire Arrêté interministériel du 29safir 1414 correspondant au 18aout 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation.

**JORA. (1998).** Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 Janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 Juillet 1994 relatif aux sp2cifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires. JORA, N° 35.

**Keahal F. (2013).** *Utilisation des huiles essentielles de Citus limon comme agent de conservateur et aromatique dans la crème fraiche.* Université Constantine. 47.

**Kelen M and Tepe B. (2008).** *Chemical composition, antioxydant and antimicrobial proprieties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora.* Bioresource Technology. **99**: 4096-4104.

**Kloos WE. and Bannerman TL. (1999).** *Staphylococcus and Micrococcus.* In: Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC. et Yalken RH, editors. Manual of Clinical Microbiolog. 7th edition Washington. 271-276.

**Kloos WE.and Shleifer KH. (1975).** «Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species». Journal of clinical Microbiology. **1**: 82-88.

**Kluytmans J; Van Belkum A and Verbrugh H. (1997).** *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks.* Clin Microbiol. Rev.**10**: 505-520.

**Larpen J.P.(1997).** *Memento technique de microbiologie.* 3<sup>eme</sup> Ed. Technique et documentation Lavoisier. Paris. 910.

**Le Loir YL et M. Gautier. (2010).** *Staphylococcus aureus. Monographies de microbiologie.* Éditions Tec&Doc Lavoisier.

**Le Minor L et Veron M. (1990).** *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus» J.Fleurette 2ème édition.* Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.

**Leyral, G., Vierling, E. 2001.** *Microbiologie et toxicologie des aliments.* 3<sup>eme</sup> Edition Doin. France. 87-114.

## Références bibliographiques

**Licitra G. (2013).** *Etymologia : Staphylococcus [staff''a-lo kok's]. Emerging infection didesses.* www.cdc.gov/eid.19, N° 9.

**Lowey FD. (1998).** *Staphylococcus aureus infections.* N Engl J Med. **339** :520-32.

**Mansouri N ; Statrani B ; Ghanmi M ; El ghadraoui L et Aafi A. (2010).** *Étude chimique et biologique des huiles essentielles de Juniperus phoenicea ssp. lycia et Juniperus phoenicea ssp. turbinata du Maroc.* Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **15** (3) : 415-424.

**Mansouri N ; Statrani B ; Ghanmi M ; El ghadraoui L ; Aafi A et Farah A. (2010).** *Valorisation des huiles essentielles de Juniperus thurifera et de Juniperus oxycedrus du Maroc.* Phytothérapie **8**: 166-70.

**Mazari K; Bendinerad N; Benkhechi Ch and Fernandez X. (2010).** *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian Juniperus phoenicea L and Cupressus sempervirens .* Medicinal Plants Research. **4(10)** : 959-964.

**Mittaine. (1980).** Les laits autres que le lait de vache, [http:// whqlibdoc .who int /mono graph /who mono](http://whqlibdoc.who.int/monograph/who mono).

**Mutai C; Bii C; Rukunga G; Ondicho J; Mwitari P; Abatis D; Vagias C; V Roussis bV and Kirui J.( 2009).** *Antimicrobial Activity of Pentacyclic Triterpenes Isolated from Acacia Mellifera.* Afr J Tradit Complement Altern Med. **6(1)** : 42-48.

**OMS. (1994).** *Directives de qualité pour l'eau de boisson ; volume 1-recommandations* .Organisation mondiale de la santé, 2 e édition : 202.

**OMS. (2000).** *Directives de qualité pour l'eau de boisson ; volume 2-critère d'hygiène et documentation à l'appui* .Organisation mondiale de la Santé, 2e édition. 1050.

**Peacock C. (2005).** *Goats -A pathway out of poverty.* Small Rum., Res. **60** : 179-186.

**Pilly E. (2008).** *Maladies infectieuse et tropicales.* 21 Ed.

**Pougheon S .et Goursaud J. (2001).** *Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé.* Tec et Doc, Paris : **6** : 566.

**Ramawat KG and Merillon JM. (2013).** *Natural products, phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes.* Springer reference, 4135.

**Ramdani M ; Lograda T ; Silini H ; Zeraib A ; Chalard P ; Figueredo G ; Bouchaala M and Zerrar S. (2013).** *Antibacterial activity of essential oils of Juniperus phoenicea from eastern Algeria.* Journal of Applied Pharmaceutical Science. **3** : 022-028.

## Références bibliographiques

**Rezzi S; Cavaleiro C; Salgueiro L; Bighelli A; Casanova J and Proença da cuncha A. (2001).** *Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of Juniperus phoenicea subsp. Turbinata from Corsica.* Biochemical systematic and ecology. **29** : 179-188.

**Ribereau G. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux.* Paris : Dunod, 254.

**Robertson W. (1995).** *Utilités et limités des indicateurs microbiologiques de la qualité de l'eau potable.* Dans : *Air intérieur et Eau potable, sous la direction de Pierre Lajoie et Patrick Levallois.* Presses de l'université Laval.

**Roquebert MF. (2002).** *Les contaminants biologiques des biens culturels.* Edition Elsevier. Paris, 419.

**Roux D et Catier O. (2007).** *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie.* France, 141.

**Santé Canada. (1991).** *La qualité bactériologique .Document de support aux « recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada ».* accessible à : [www. Hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/dpc-eau-qualité/eauguide .htm](http://www.Hc-sc.gc.ca/ehp/dhm/dpc-eau-qualite/eauguide .htm).

**Santé Canada. (2012).** *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada; document technique les coliformes totaux.* Repéré à [http : //www .hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt-formats /hecs-sesc/pdf/pubs/water –eau](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/alt-formats/hecs-sesc/pdf/pubs/water-eau).

**Seigue A. (1985).** *Le foret circumméditerranéenne et ses problèmes.* ED : G.P maisonneuve et Larose, 216.

**Shallcross LJ ; Fragaszy E ; Jhonson AM and Hayward AC. (2013).** *The role of the panton-valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease : a systematic review and meta-analysis.* Lancet Infect Dis. **13** : 43-54.

**Sikkema J; De Bont JAM and Poolman B. (1994).** *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes.* Journal of Biological Chemistry, **269** : 8022-8028.

**Silait. (2008).** *Salon international du lait. Acte du 1er salon international du lait et de ses dérivés du 27 au 29 mai 2008 Alger.* <http://www.agroligne.com/contenu/silait-2008-1ersalon-international-lait>.

**Small E and Dentsch G. (2001).** *Nos jardins de pays froids.* ED: CNRC, 90.

**Thormar H, (2011).** *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.* John Wiley & Sons, Ltd. United Kingdom, 334.

**Van Belkum A; Melles DC; Snijders SV ; Van WB ;Leeuwen HF; Wertheim JL; Nouwen HA; Verbrugh and Etienne J. (2006).** *Clonal distribution and differential occurrence of the enterotoxin gene cluster, egc, in carriage- versus bacteremia-associated isolates of Staphylococcus aureus.* J. Clin. Microbiol. **44**: 1555-1557.



## *Références bibliographiques*

**Vignola C. (2000).** *Science et Technologie du lait Transformation du lait.* Edition presses internationales Polytechnique. Canada, 3-75.

**Von Eiff C; Becker K; Machka K; Stammer H and Peter G. (2001).** *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia.* Study Group. N Engl J. Med. **344**: 11-16.

**Wertheim G ; Melles DC ; Vos MC ; Van Leeuwen W ; Van Belkum A ; Verbrugh HA and Nouwen JL. (2005).** *The role of nasale carriage in staphulococcus aureus infections.* Lancet infect dis. **5**: 751-62.

**Who. (2011).** *Guidelines for drinking –water quality,* third edition incorporating the first and second addenda , voume 1,Recommendations.

# Annexes

## Annexe I: Composition milieux de la culture

Milieux	composition	Quantité par litre
(a) BHIB pH = 7,4	Infusion de cervelle de veau	12,5g
	Infusion de coeur de boeuf	5,0g
	Peptone	10,0g
	Glucose	2,0g
	Chlorure de sodium	2,0g
	Phosphatase di sodique	5,0g
(b) Hektoen pH = 7,6	Peptone pepsique de viande	12,0g
	Extrait autolytique de levure	3,0g
	Lactose	12,0g
	Saccharose	12,0g
	Salicine	2,0g
	Sels biliars	9,0g
	Chlorure de sodium	5,0g
	Thiosulfate de sodium	5,0g
	Citrate ferrique amoniacal	1,5g
	Bleu de promothymole	65mg
	Fuchsine acide	40mg
	Agar agar bactériologique	13,5g
(c) Urée-Indole pH = 8,1	Peptone	20,0g
	Nitrate de K	1,0g
	Mannitol	2,0g
	Agar	4,0g
	Rouge de phénol à 1%	4,0ml
(d) Giolitti contoni pH = 6,9	Tryptone	10,0g
	Extrait de viande de boeuf	5,0g
	Extrait de levure	5,0g
	Chlorure de lithium	5,0g
	Mannitol	20,0g
	Chlorure de sodium	5,0g
	glyocolle	1,2g
	Pyruvate de sodium	3,0g
	Polysorbate 80	1,0g
(e) Chapman pH = 7,6	Extrait de viande (bovin ou porcin)	1,0g
	Peptone de caséine et de viande (bovine et porcine)	10,0g
	Chlorure de sodium	75,0g
	Mannitol	10,0g
	Agar	15,0g
	Rouge de phénol	0,025g
(f) Mueller-Hinton pH = 7,4	Infusion de viande de boeuf	300,0ml
	Peptone de caséine	17,5g
	Amidon de maïs	1,5g
	Agar	10,0g

## Annexe II: L'effet des huiles essentielles sur les souches

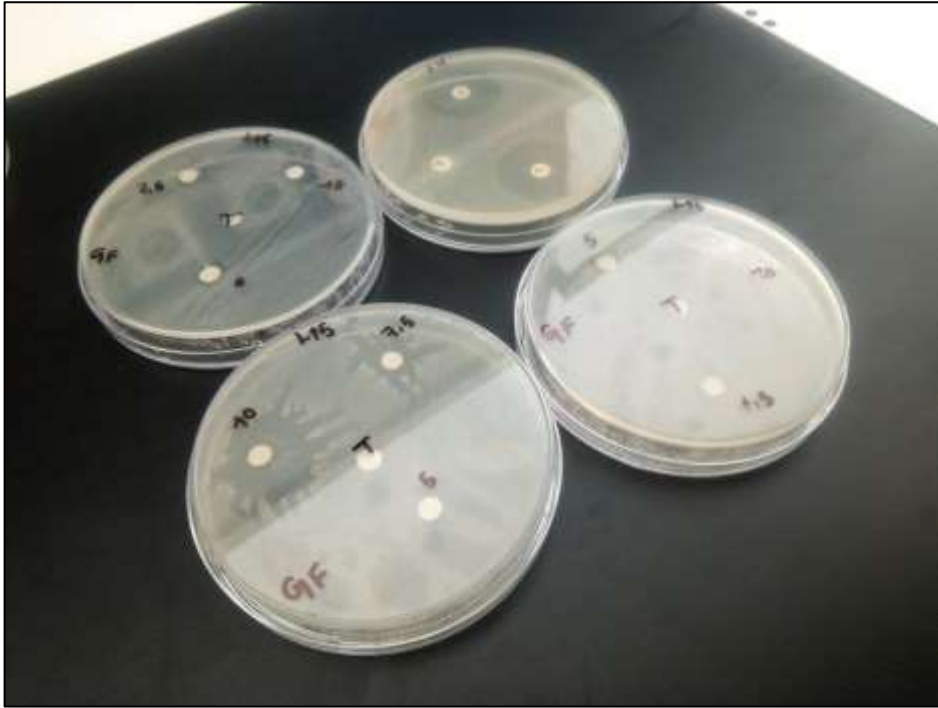


Figure 01 : Zones d'inhibition d'HE de feuilles de genévrier sur *E.coli*

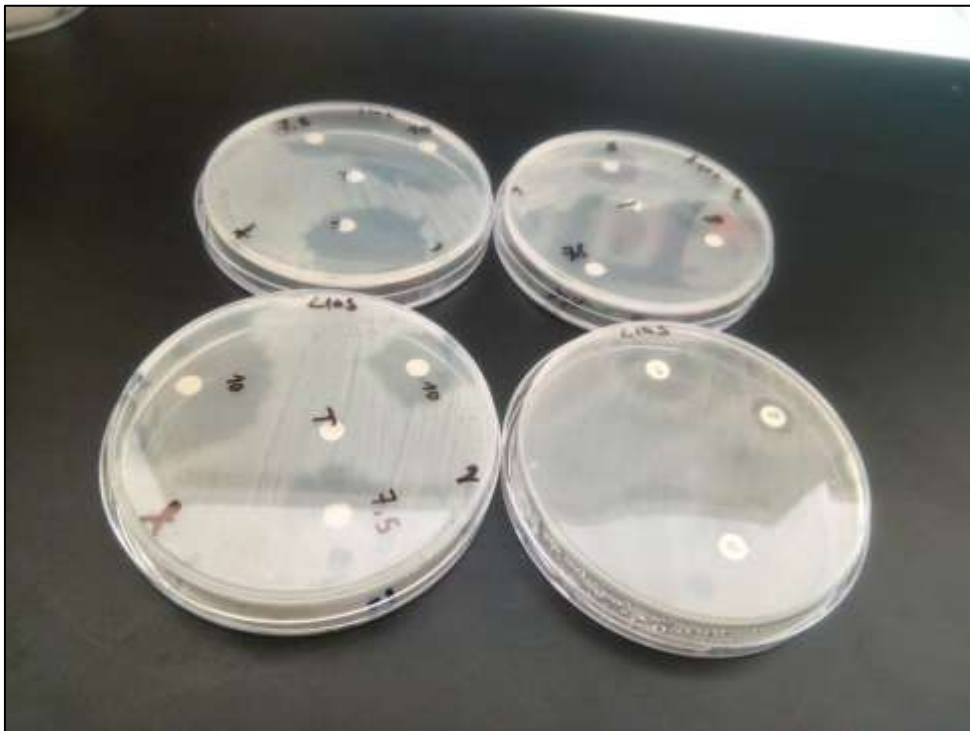


Figure 02 : Zones d'inhibition d'HEs de feuilles de genévrier sur *S. aureus*

## Annexe II : L'effet des huiles essentielles sur les souches

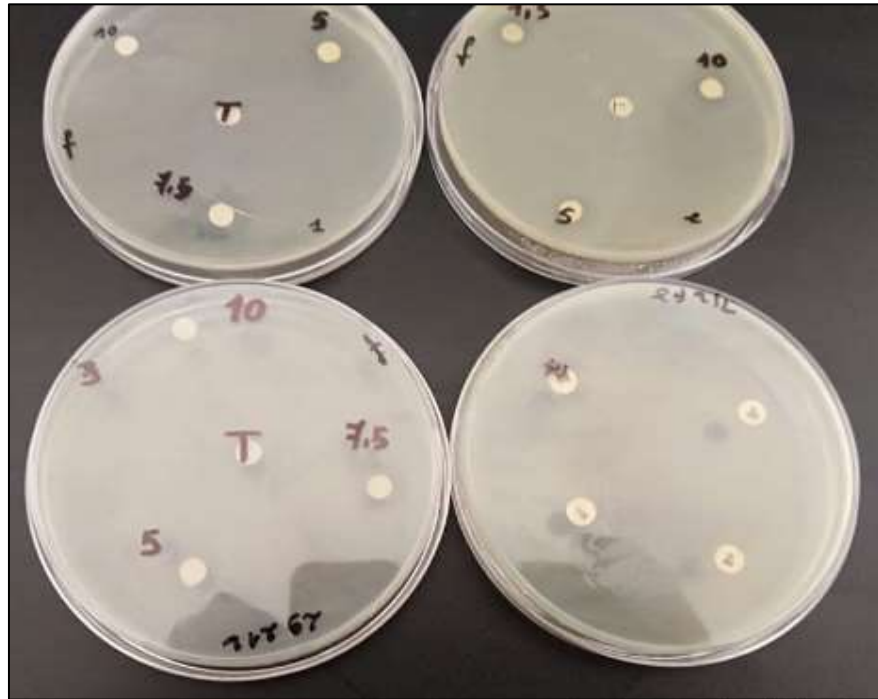


Figure 03: Zones d'inhibition d'HEs de feuilles de genévrier sur *E.faecalis*

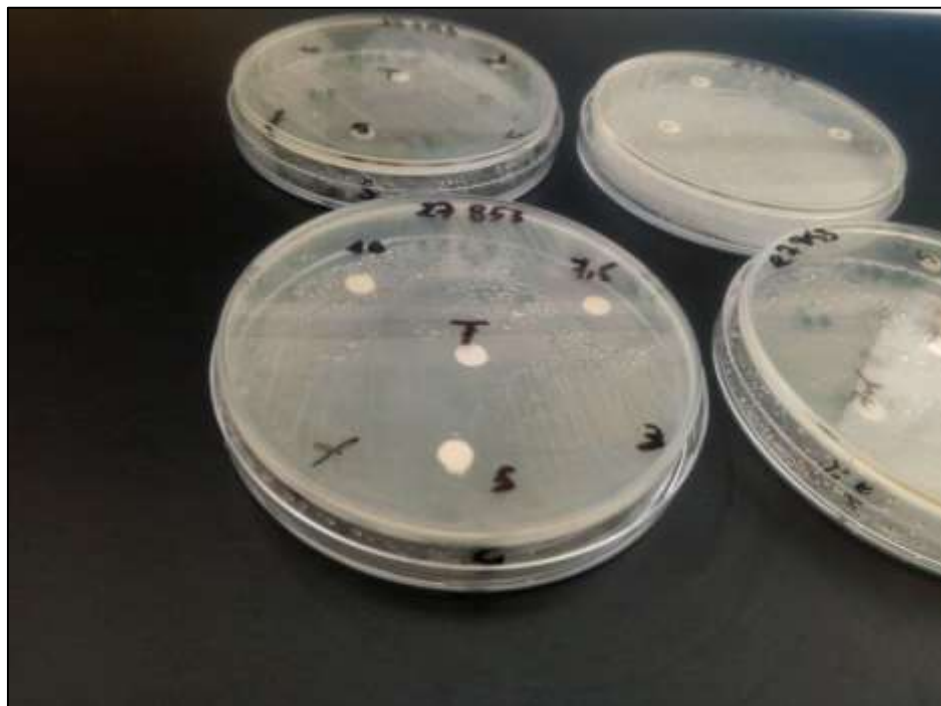


Figure 04: Zones d'inhibition d'HEs de feuilles de genévrier sur *P.aeruginosa*



**Annexe III: Diamètres des zones d'inhibition (mm) selon les différentes souches testées**

Répétitions	H.Es	Dose MI	souches													
			s2	s10	s11	s12	s13	Sttc	E9	E12	E15	E9c	E10c	E11c	paTTC	efTTC
R.1	baie	5	11.00	7.00	8.00	0.00	9.00	8.00	0.00	7.00	0.00	0.00	7.00	0.00	7.00	0.00
R.2	baie	5	9.00	8.00	7.00	0.00	10.00	0.00	7.00	0.00	7.00	7.00	7.00	8.00	0.00	7.00
R.3	baie	5	9.00	8.00	8.00	11.00	8.00	0.00	0.00	7.00	0.00	0.00	0.00	7.00	7.00	0.00
R.1	Feuille	5	7.60	18.70	13.90	17.00	22.20	8.40	7.55	11.30	8.90	9.89	9.50	9.06	17.00	9.60
R.2	Feuille	5	7.09	17.00	23.00	21.20	16.00	9.60	10.73	10.30	10.60	10.07	8.50	8.10	17.00	8.00
R.3	Feuille	5	6.76	20.30	13.49	14.40	10.90	7.90	9.70	7.40	9.50	9.40	8.32	8.40	17.00	8.40
R.1	baie	7.5	12.00	9.00	9.00	9.00	9.00	11.00	0.00	7.00	0.00	7.00	7.00	7.00	8.00	7.00
R.2	baie	7.5	13.00	9.00	8.00	11.00	11.00	10.00	7.00	0.00	7.00	7.00	7.00	8.00	0.00	7.00
R.3	baie	7.5	15.00	11.00	9.00	11.00	10.00	8.00	0.00	8.00	7.00	7.00	9.00	8.00	8.00	7.00
R.1	Feuille	7.5	8.90	23.55	22.44	18.77	23.70	10.30	8.30	11.71	11.19	11.90	10.53	8.40	22.80	12.10
R.2	Feuille	7.5	8.90	22.00	39.50	23.40	18.00	10.23	12.90	11.20	11.02	11.64	8.09	9.86	22.80	8.30
R.3	Feuille	7.5	8.60	24.00	25.48	18.50	13.20	9.60	12.70	11.40	12.28	10.90	13.50	9.30	22.80	14.30
R.1	baie	10	12.00	10.00	10.00	11.00	13.00	16.00	8.00	8.00	7.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
R.2	baie	10	20.00	10.00	10.00	13.00	14.00	9.00	8.00	7.00	8.00	9.00	9.00	9.00	11.00	9.00
R.3	baie	10	19.00	11.00	11.00	10.00	15.00	18.00	8.00	9.00	7.00	8.00	7.00	8.00	0.00	9.00
R.1	Feuille	10	10.14	58.00	30.40	30.00	25.60	11.40	13.25	13.90	13.40	12.15	15.30	11.40	27.04	17.27
R.2	Feuille	10	11.70	44.60	41.00	27.50	29.70	12.90	19.12	12.70	12.80	13.37	11.02	12.30	27.04	9.50
R.3	Feuille	10	9.80	37.50	40.20	33.09	17.90	11.23	17.86	11.80	24.07	12.50	14.63	15.01	27.04	18.30

## Résumé

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles, extraites des baies et des feuilles de *Juniperus phoenicea* L sur les coliformes et les staphylocoques de contamination des laits crus de vache et de chèvre a été analysé.

- L'isolement des souches bactériennes, réalisé à partir 31 échantillon de lait cru, a permis de constater la contamination du lait de vache (25 % *S.aureus* / 15 % *E.coli*) et de chèvre (27,27 % *E.coli*).
- Les rendements en huiles essentielles des feuilles et des baies, réalisés par hydro-distillation, sont de 0,54 % et 2,47 % respectivement.
- L'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Juniperus phoenicea* L s'est montrée plus active que celles des baies.
- Une efficacité très importante a été remarquée surtout contre *S.aureus* et *P.aeruginosa*.

**Mots clés :** huiles essentielles, genévrier, activité antibactérienne, *S.aureus*, coliformes, lait cru.

## Abstract

In this study, the antibacterial activity of essential oils extracted from the fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L on coliforms and staphylococci from contamination of raw cow and goat milks was analyzed.

- The isolation of the bacterial strains, made from 31 sample of raw milk, revealed the contamination of cow's milk (25% *S.aureus* / 15% *E.coli*) and goat's milk (27.27% *E.coli*)
- The yields of essential oils from leaves and fruits, made by hydro-distillation, are 0.54% and 2.47% respectively.
- The antibacterial activity of the essential oils of the leaves of *Juniperus phoenicea* L has been more active than those of fruits.
- A very important efficiency was noticed especially against *S.aureus* and *P.aeruginosa*.

**Key words:** essential oils, juniper, antibacterial activity, *S.aureus*, coliforms, raw milk.

## ملخص

في هذه الدراسة ، تم تحليل النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية المستخرجة من فواكه وأوراق *Juniperus phoenicea* L على القولونيات والعنقوديات الملوثة لحليب البقر و الماعز الخام. • كشف عزل السلالات البكتيرية، المأخوذة من 31 عينة من الحليب الخام، عن تلوث حليب الأبقار (25% من المكورات العنقودية / 15% *E.coli*) وحليب الماعز (27.27% *E.coli*). • بلغت إنتاجية الزيوت العطرية من الأوراق والفواكه، التي تم إنتاجها بواسطة التقطير المائي، 0,54 % و 2,47% على التوالي. • كان النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية لأوراق *Juniperus phoenicea* L أكثر نشاطاً من زيت الفواكه. • لوحظت فعالية جيدة، خاصة ضد *S.aureus* و *P.aeruginosa*.

**الكلمات الرئيسية:** الزيوت الأساسية ، العرعر ، النشاط المضاد للبكتيريا ، المكورات العنقودية الذهبية ، القولونيات ، الحليب الخام.