

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1



Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires

I.N.A.T.A.A.

Département de Technologies Alimentaires

N° d'ordre : 047/Mag /2013

Série : 003/INAT/2013

Mémoire présenté en vue de l'obtention de diplôme de Magister en sciences
alimentaires, option : Biochimie et Technologie Alimentaire

par **KEHAL Farida**

Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche

Soutenu le : 27/06/2013

Devant le jury :

Président :	NAMOUNE H.	Professeur	I.N.A.T.A.A., U.C.1.
Encadreur :	BARKAT M.	Professeur	I.N.A.T.A.A., U.C.1.
Examineurs :	KACEM CHAOUCHE N.	Professeur	Fac. S.N.V., U.C.1.
	BENACHOUR K.	Maître de conférences	I.N.A.T.A.A., U.C.1.

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur BARKAT M., la promotrice de ce mémoire, pour avoir encadrée ce travail. Je tiens à vous remercier pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils, votre objectivité, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Il m'est aussi d'un agréable devoir de vous adresser un grand merci pour la sympathie, la confiance et la liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de ce mémoire. Soyez assuré de ma sincère estime.

Je tiens à exprimer ma respectueuse reconnaissance au Professeur NAMOUNE H., à l'I.N.A.T.A.A. Université Constantine 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant la présidence de jury de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes profonds remerciements.

Mes reconnaissances vont également au professeur KACEM CHAOUICHE N. à la faculté de sciences de la nature et de la vie, Université Constantine 1, qui m'a fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Mes remerciements les plus respectueux vont également au Dr. BENACHOUR K., Maître de conférences à l'I.N.A.T.A.A., Université Constantine 1, qui m'a fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en participer au jury en tant qu'examinatrice.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes du laboratoire de physicochimie, de microbiologie et de l'atelier de la crème fraîche de la laiterie Safilait de constantine, pour leur accueil au sein de leur unité et pour le bon déroulement du travail.

Une autre fois, un grand merci au professeur KACEM CHAOUICHE N., directeur de Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LamyBAM) et son équipe surtout Sara et Insaf, pour m'avoir accueillie dans leurs unités de recherche. Merci à eux pour leur encouragement, leur dynamisme et bonne humeur communicative.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du service de microbiologie de l'établissement public hospitalier d'El-Milia, Jijel.

Le mot « merci » est bien court pour exprimer ma profonde reconnaissance à CHEMACHE Loucif, tout d'abord en tant qu'enseignant, puis et surtout en tant que fiancé, que j'estime énormément. Donc, considérable merci pour ta disponibilité, ton écoute, ta gentillesse, ton soutien, tes réponses, tes questions et tes conseils avisés.

Je voudrais adresser mes remerciements au personnel des laboratoires pédagogiques de l'I.N.A.T.A.A. Que les participants des séances sensorielles soient remerciés pour leur disponibilité et leur application. Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicace

A la mémoire de ma mère qui a béni mon désir d'apprendre et m'a toujours encouragé, avec tout mon amour et ma reconnaissance pour être devenue ce qui je suis

A mon très cher père qui m'a tout appris, pour toutes les peines et les sacrifices qu'il s'est donné pour me voir réussir dans la vie.

A mes frères et sœurs, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse

*A la personne que j'ai trouvée aux moments difficiles de ma vie
« mon future mari », Loucif*

A mes nièces Aziza, Marwa et Safaa

A mon neveu Ahsan et Sid Ali

Farida

Liste de tableaux

Tableau 1.	Composition biochimique moyenne du citron	4
Tableau 2.	Production mondiale des huiles essentielles en 2008.....	8
Tableau 3.	Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius...	17
Tableau 4.	Norme générale Codex pour les conservateurs et les antioxydants utilisés dans les produits laitiers.....	20
Tableau 5.	Composition moyenne de la crème fraîche à 30% de matière grasse.....	23
Tableau 6.	Conservation des différents types de la crème.....	29
Tableau 7.	Diamètre des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du <i>Citrus limon</i> (diffusion par disque).....	58
Tableau 8.	Concentrations minimales inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de citron...	59
Tableau 9.	Qualité hygiénique de lait cru et de la crème avant pasteurisation.....	67
Tableau 10.	Evolution de qualité hygiénique des crèmes fraîches pendant quatre jours après l'ouverture.....	69
Tableau 11.	Résultats du test de comparaison par paire.....	71
Tableau 12.	Résultats du test de classement par rang des crèmes fraîches élaborées.....	71
Tableau 13.	Signification de classement par paires.....	72

Liste des figures

Figure 1.	Poches sécrétrices des huiles essentielles des <i>Citrus</i> : (A) dans feuilles, (B) dans les flavédo, (C) dans les pétales.....	6
Figure 2.	Principe d'une écrémeuse à débouillage automatique.....	26
Figure 3.	Diagramme de fabrication de la crème fraîche.....	28
Figure 4.	Organigramme de la méthodologie de l'étude.....	33
Figure 5.	Principales étapes de fabrication des crèmes fraîches.....	42
Figure 6.	Cinétique d'extraction de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	51
Figure 7.	Cinétique de blanchiment du β -carotène pour l'huile essentielle de citron, la vitamine E et le contrôle négatif.....	53
Figure 8.	Activité antioxydante de l'huile essentielle de citron et de la vitamine E à une concentration de 4000 μ g/ml.....	53
Figure 9.	Concentration efficace 50 moyenne (CE ₅₀) de l'huile essentielle de citron et de la vitamine E.....	54
Figure 10.	Caractéristiques macroscopiques des souches isolées dans le milieu OGA après 48 heures d'incubation.....	55
Figure 11.	Aspect des cellules des souches (S1, S3, S4, S7) (Gx 40).....	56
Figure 12.	Aspect des cellules des souches (S1, S3, S4, S7) à l'état frais (G x 100).....	56
Figure 13.	Effet de l'huile essentielle de citron sur <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Zygosaccharomyces sp1</i> , <i>Debaryomyces sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> et <i>Zygosaccharomyces sp2</i> , (méthode de diffusion sur gélose).....	58
Figure 14.	Evaluation des CMI de l'huile essentielle de citron vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> (P) et <i>E. coli</i> (E) (méthode de dilution après 24 heures d'incubation).....	59
Figure 15.	Evaluation des CMI de l'huile essentielle du citron vis-à-vis de <i>Zygosaccharomyces sp1</i> , <i>Debaryomyces sp.</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> et <i>Zygosaccharomyces sp2</i> (par la méthode de dilution après 48heures d'incubation).....	60
Figure 16.	Taux d'extrait sec dans le lait cru, la crème avant pasteurisation et les crèmes fraîches élaborées.....	64
Figure 17.	Taux de matière grasse dans le lait cru, la crème avant pasteurisation et les crèmes fraîches élaborées	65
Figure 18.	Evolution de pH au cours de la fabrication des crèmes fraîches et après ouverture de l'emballage.....	66

Figure 19.	Evolution de l'acidité titrable au cours de la fabrication des crèmes fraîches et après ouverture de l'emballage.....	67
Figure 20.	Variation de la teneur en MDA des crèmes fraîches élaborées en fonction du temps de stockage à une température de 63°C.....	70
Figure 21.	Profils sensoriels des quatre crèmes fraîches préparées à différentes concentrations en huile essentielle du citron (A : témoin 0%, B : 0,125%, C : 0,25%, D : 0,5%).....	73
Figure 22.	Analyse en composantes principales (ACP) des principales caractéristiques sensorielles et physicochimiques (au seuil de signification 0,05).....	74

Liste des annexes

Annexe 1.	Filtre 0,22 µm (MILLIPORE MILLEX GS).....	i
Annexe 2.	Bulletin du test de comparaison par paire.....	i
Annexe 3.	Table de Roessler, Baker et Amerine pour les tests de comparaison par paire.....	ii
Annexe 4.	Bulletin du test de classement par rang.....	ii
Annexe 5.	Différences des sommes de classement par rang absolu critiques pour les comparaisons de «tous les traitements» à un seuil de signification de 1 %.....	iii
Annexe 6.	Bulletin pour le test hédonique avec un barème de notation allant de 1 à 9.....	iv
Annexe 7.	Les fruits du <i>Citrus limon</i> « Eurêka ».....	v
Annexe 8.	Observation microscopique de filamentisation des souches S1, S3, S4 et S7 après 48 heures d'incubation (GX40).....	v
Annexe 9.	Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre le taux d'incorporation en huiles essentielles et les paramètres physicochimiques et Les caractéristiques sensoriels.....	vi
Annexe 10.	Huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	vi
Annexe 11.	Pouvoir réducteur d'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>	vii
Annexe 12.	Pouvoir réducteur d'huile essentielle de la vitamine E.....	vii

Liste des abréviations

AA	Activité antioxydante
ACP	Analyse en composantes principales
AFNOR	Association française de normalisation
ANOVA	Analyse de la variance
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Le butylhydroxytoluène
CE₅₀	Concentration efficace
CEE	Communauté économique européenne
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMi	Concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographique en phase gazeuse
DPPH°	2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl
FAO	Food and agriculture organization
FTAM	Flore totale aérobie mésophile
GFAAS	Spectrométrie par absorption atomique de four de graphite
GRET	Groupe de recherche et d'échanges technologiques
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ISO	International Organization for Standardization
MDA	Malondialdéhyde
NPD	Chromatographie en phase gazeuse avec détecteur de phosphore d'azote
OFSP	Office fédéral de la santé publique
OGA	Oxytétracycline glucose agar
PCB	Polychlorobiphenyl
PCDD	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	Polychlorodibenzo- <i>p</i> -furane
PDA	Potato dextrose agar
RCN	Groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition
SM	Spectroscopie de masse
SS	<i>Salmonelle- Schigella</i>
TBA	L'acide thiobarbiturique
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TBHQ	Le tert-butylhydroquinone
TCA	Acide trichloroacétique
UHT	Ultra haute température
YPG	Yeast broth glucose

Table des matières

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Revue bibliographique

1. Huiles essentielles de *Citrus limon*..... 3

1.1 Généralités sur le citron 3

1.1.1. Description de l'arbre..... 3

1.1.2. Classification botanique..... 3

1.1.3. Composition du fruit..... 3

1.2. Huile essentielle de *Citrus limon*..... 4

1.2.1. Généralités sur les huiles essentielles..... 4

1.2.1.1. Définition..... 4

1.2.1.2. Rôle physiologique..... 5

1.2.1.3. Localisation et lieu de biosynthèse..... 5

1.2.1.4. Composition chimique..... 7

1.2.1.5. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles..... 7

1.2.1.6. Production mondiale des huiles essentielles..... 7

1.2.2. Extraction des huiles essentielles..... 8

1.2.2.1. Pression à froid..... 9

1.2.2.2. Hydrodistillation..... 9

1.2.2.3. Entraînement à la vapeur d'eau..... 9

1.2.2.4. Autres techniques..... 10

1.2.3. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles..... 10

1.2.4. Toxicité des huiles essentielles..... 11

1.2.5. Domaine d'application des huiles essentielles..... 11

1.2.6. Contamination des huiles essentielles..... 13

1.3. Activités biologiques des huiles essentielles..... 12

1.3.1. Activité antioxydante des huiles essentielles..... 12

1.3.1.1. Activité antioxydante des huiles essentielles dans les aliments.....	12
1.3.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	13
1.3.2. Activité antimicrobienne.....	13
1.3.2.1. Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles.....	13
1.3.2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	13
1.3.2.2.1. Méthode de diffusion dans l'agar ou aromatogramme.....	14
1.3.2.2.2. Méthode de dilution.....	14
1.3.2.3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	14
1.3.2.4. Essai de l'activité antimicrobienne.....	15
2. Additifs alimentaires.....	16
2.1. Définition.....	16
2.2. Classification des additifs alimentaires.....	17
2.3. Conservateurs.....	18
2.3.1. Agents conservateurs.....	18
2.3.2. Agents antioxydants.....	18
2.3.3. Normes des conservateurs et des antioxydants utilisés dans les produits laitiers.....	20
2.4. Arômes.....	20
2.4.1. Définition de l'arôme.....	20
2.4.2. Définition des agents d'aromatisation.....	21
2.4.2.1. Préparations aromatisantes.....	21
2.4.2.2. Substances aromatisantes naturelles.....	21
2.4.2.3. Substances aromatisantes identiques aux naturelles.....	21
2.4.2.4. Substances aromatisantes artificielles.....	21
2.4.2.5. Arômes de transformation.....	21
2.4.2.6. Arômes de fumée.....	22
2.4.3. Normes des arômes utilisés dans les produits laitiers.....	22
3. Crème fraîche.....	22
3.1. Définition.....	22
3.2. Catégories des crèmes lactiques.....	23
3.2.1. Crèmes de consommation.....	23
3.2.1.1. Selon la teneur en matière grasse.....	23
3.2.1.1.1. Crème à 12% au moins de matière grasse ou crème légère.....	23
3.2.1.1.2. Crème à 30% de matière grasse.....	23
3.2.1.2. Selon le traitement thermique appliqué.....	24
3.2.1.2.1. Crème crue.....	24
3.2.1.2.2. Crème pasteurisée.....	24

3.2.1.2.3. Crème stérilisée et crème Ultra Haute Température (UHT).....	24
3.2.1.3. Selon les traitements spécifiques liés à leurs utilisations.....	25
3.2.1.3.1. Crème fouettée.....	25
3.2.1.3.2. Crème chantilly.....	25
3.2.1.3.3. Crème sous pression.....	25
3.2.2. Crème de transformation.....	25
3.3. Technologie de la crème laitière.....	25
3.3.1. Ecrémage centrifuge.....	25
3.3.2. Pasteurisation.....	27
3.2.3. Maturation.....	27
3.2.4. Refroidissement et conditionnement.....	28
3.4. Conservation des différents types de crèmes.....	29
3.5. Altération de la crème fraîche.....	29
3.5.1. Altération microbienne.....	29
3.5.2. Altération enzymatique.....	30
3.5.2.1. Protéolyse.....	30
3.5.2.2. Lipolyse.....	31
3.5.3. Oxydation lipidique.....	32

Matériel et méthodes

1. Extraction de l'huile essentielle.....	34
1.1. Matériel végétal.....	34
1.2. Extraction de l'huile essentielle.....	34
1.3. Suivi de la cinétique d'extraction.....	34
1.4. Calcul du rendement d'extraction.....	35
2. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i>.....	35
2.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	35
2.1.1. Test du blanchissement du β -carotène.....	35
2.1.2. Test au DPPH°.....	36
2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	37
2.2.1. Micro-organismes testés.....	37
2.2.2. Isolement et identification des levures à partir de la crème fraîche contaminée.....	37
2.2.3. Préparation des suspensions microbiennes et des disques.....	39
2.2.3.1. Suspension bactérienne.....	39
2.2.3.2. Suspension levurienne.....	39

2.2.3.3. Disques.....	39
2.3. Méthode de diffusion ou des aromagrammes.....	40
2.4. Méthode de dilution d'agar.....	40
3. Incorporation de l'huile essentielle dans la crème fraîche.....	41
3.1. Fabrication des crèmes fraîches incorporées de l'huile essentielles de <i>Citrus limon</i> ...	41
3.2. Prélèvement d'échantillon.....	42
3.3. Analyses physicochimiques.....	43
3.3.1. Teneur en eau et en matières volatiles.....	43
3.3.2. Densité du lait.....	43
3.3.3. pH.....	43
3.3.4. Acidité titrable.....	43
3.3.5. Teneur en matière grasse.....	44
3.4. Analyses statistiques.....	45
3.5. Analyses microbiologiques.....	45
3.5.1. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales.....	45
3.5.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile.....	45
3.5.3. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux.....	45
3.5.4. Dénombrement des levures et des moisissures.....	46
3.5.5. Recherche des staphylocoques.....	46
3.5.6. Recherche des salmonelles.....	47
3.6. Evaluation de la stabilité oxydative des crèmes fraîches élaborées par le test de schaal.....	47
3.7. Analyses sensorielles.....	48
3.7.1. Test de comparaison par paire.....	49
3.7.2. Test de classement par rang.....	49
3.7.3. Test hédonique.....	50
Résultats et discussion	
1. Extraction des huiles essentielles du <i>Citrus limon</i>.....	51
1.1. Caractéristiques du fruit de <i>Citrus limon</i> utilisé.....	51
1.2. Cinétique d'extraction.....	51
1.3. Rendement d'extraction.....	51
2. Evaluation des activités biologiques de l'huile essentielle du <i>Citrus limon</i>.....	52
2.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	52
2.1.1. Test du blanchissement du β -carotène.....	52

2.1.2. Test au DPPH°	53
2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	55
2.2.1. Identification des levures isolées.....	55
2.2.2. Méthode de diffusion ou d'aromatogrammes.....	57
2.2.3. Méthode de dilution d'agar.....	58
3. Elaboration et analyses des crèmes fraîches.....	62
3.1. Choix des doses d'incorporation en huile essentielle.....	62
3.2. Analyses physicochimiques.....	63
3.2.1. Densité du lait.....	63
3.2.2. Extrait sec.....	63
3.2.3. Matière grasse.....	64
3.2.4. pH et acidité titrable.....	65
3.3. Analyses microbiologiques.....	67
3.4. Stabilité oxydative des crèmes fraîches élaborées.....	69
3.5. Analyses sensorielles.....	70
3.5.1. Test de comparaison par paire.....	70
3.5.2. Test de classement par rang.....	71
3.5.3. Test hédonique.....	72
3.6. Test de corrélation.....	73
Conclusion générale et perspectives.....	75
Références bibliographiques.....	77
Annexes	
Résumés	

Introduction

Introduction

La crème fraîche est un produit alimentaire qui renferme, en plus de sa teneur élevée en eau, plusieurs autres nutriments tels que les protéines, les glucides, les vitamines liposolubles et surtout la matière grasse, ce qui la rend sujette à différents types d'altérations microbienne et physicochimique.

Une altération de la qualité hygiénique de la crème fraîche met en cause la santé du consommateur, cette altération est généralement invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogènes responsables d'intoxications alimentaires de gravités diverses. Une autre altération de la qualité marchande de la crème fraîche modifie ses caractéristiques plastiques et organoleptiques (rancissement, altération du goût), cette altération bien que non dangereuse pour le consommateur, rend ce produit non commercialisable (Bouix et Leveau, 1984).

L'oxydation de la matière grasse est probablement la transformation chimique causant le problème majeur en technologie laitière surtout dans la crème fraîche en raison de sa teneur élevée en matière grasse (Collomb et Spahni, 1996). La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables qui conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (Prior, 2003).

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

Plusieurs études ont été menées sur les activités biologiques des huiles essentielles de *Citrus limon*, telles que l'activité antioxydante (Himed, 2011 et Hellal 2011) et l'activité antimicrobienne (Hammer *et al.*, 1999; Caccioni *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2005). Ces dernières sont avérées un moyen très prometteur pour pallier les risques d'altérations causés par les microorganismes ou par l'oxydation des lipides.

C'est dans cette optique que s'articule la présente étude, dont les principaux objectifs visent la possibilité d'utilisation de leur huile essentielle comme agent naturel conservateur et aromatique dans la crème fraîche.

Hormis l'introduction et la conclusion, le manuscrit est donc structuré en trois grandes parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois principaux

volets qui sont l'huile essentielle de *Citrus limon*, les additifs alimentaires et la crème fraîche. Dans la deuxième partie, nous avons tout d'abord décrit le matériel végétal utilisé ainsi que la méthode d'extraction et d'évaluation des activités biologiques (antioxydante et antimicrobienne) de l'huile essentielle du *C. limon*. Enfin, nous avons appliqué l'huile essentielle (avec ses différentes concentrations) à la crème fraîche, en effectuant quelques analyses physicochimiques et microbiologiques et une caractérisation sensorielle des nouveaux produits obtenus. La troisième partie a été consacrée aux résultats obtenus, elle a été agencée en trois étapes. La première étape a concerné tout d'abord les caractéristiques du fruit utilisé, la cinétique et le rendement d'extraction. La deuxième étape a été focalisée sur les activités biologiques de l'huile essentielle du citron (activités antioxydante et antimicrobienne). Les résultats physicochimiques, microbiologiques et sensoriels des crèmes élaborées ont été présentés et discutés dans la troisième étape, suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

Revue bibliographique

1. Huile essentielle de *Citrus limon*

1.1. Généralités sur le citron

1.1.1. Description de l'arbre

Le citronnier est un petit arbre épineux à feuilles persistantes, atteignant 3 à 6 m de hauteur, à cime étalée et peu dense, au feuillage vert claire. Les feuilles composées, unifoliolées, alternées, de formes variables, lancéolées et elliptiques, à bord denticulé, de taille très variable de 5 à 10 cm. Les fleurs sont blanches et odorantes (Clement, 1981). Le fruit est de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leur extrémité. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit ; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (Blancke, 2001).

1.1.2. Classification botanique

Selon Padrini et Lucheroni (1996), la classification de citron est la suivante :

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermaphytes*

Classe : *Eudicotylédones*

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*

1.1.3. Composition du fruit

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit du a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (naringosides et hésperidosides). La teneur de ce fruit en glucides est faible mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron à une concentration de 0,5g/100g dont le potassium est le minéral le plus abondant (tableau 1) (Valnet, 2001).

L'arôme du citron résulte de ses huiles essentielles (HE) abondantes dans les vacuoles de l'écorce; il s'agit d'un mélange de limonène, du citral, du citronnellal et des coumarines (Leclerc, 1984).

Tableau 1. Composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais)(Souci *et al.*, 1996).

Composition	Teneur
Eau	90,20 g
Glucides	3,16 g
Protéines	0,70 g
Lipides	0,60 g
Acides organiques	4,88 g
Fibres alimentaires	0,50 g
Les vitamines	51,26 mg
Les minéraux	211,95 mg
Apports énergétiques	36,48 K Calories

1.2. Huile essentielle de *Citrus limon*

1.2.1. Généralités sur les huiles essentielles

1.2.1.1. Définitions

Les HE sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux HE obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères (Bousbia, 2004).

Selon Bernard *et al.* (1988), le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

L'association française de normalisation (AFNOR, 2000) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec à partir de l'épicarpe des *Citrus*. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

L'office fédéral de la santé publique (OFSP, 2009) a défini l'huile essentielle comme l'extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques. Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes (fleur, feuille, tige, écorce, racine, fruit, graine). L'huile essentielle ne se compose que de substances aromatiques volatiles, elle est soluble dans l'huile et dans l'alcool mais pas dans l'eau. Il existe plusieurs techniques pour obtenir des huiles essentielles dont la principale et la plus ancienne est la distillation à la vapeur d'eau.

1.2.1.2. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Ces derniers ne sont pas essentiels pour la croissance des plantes (Croteau *et al.*, 2000).

Dernièrement, des études ont montré que dans les plantes, les huiles essentielles ont pour fonction d'attirer les insectes pollinisateurs ou repousser les insectes hostiles. Un certain nombre d'entre elles ont également des propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides (Carson et Hammer, 2011).

1.2.1.3. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus limon*

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (Goris, 1967). Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme. Le fruit du *citron* se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure 1) (Ferhat *et al.*, 2010).

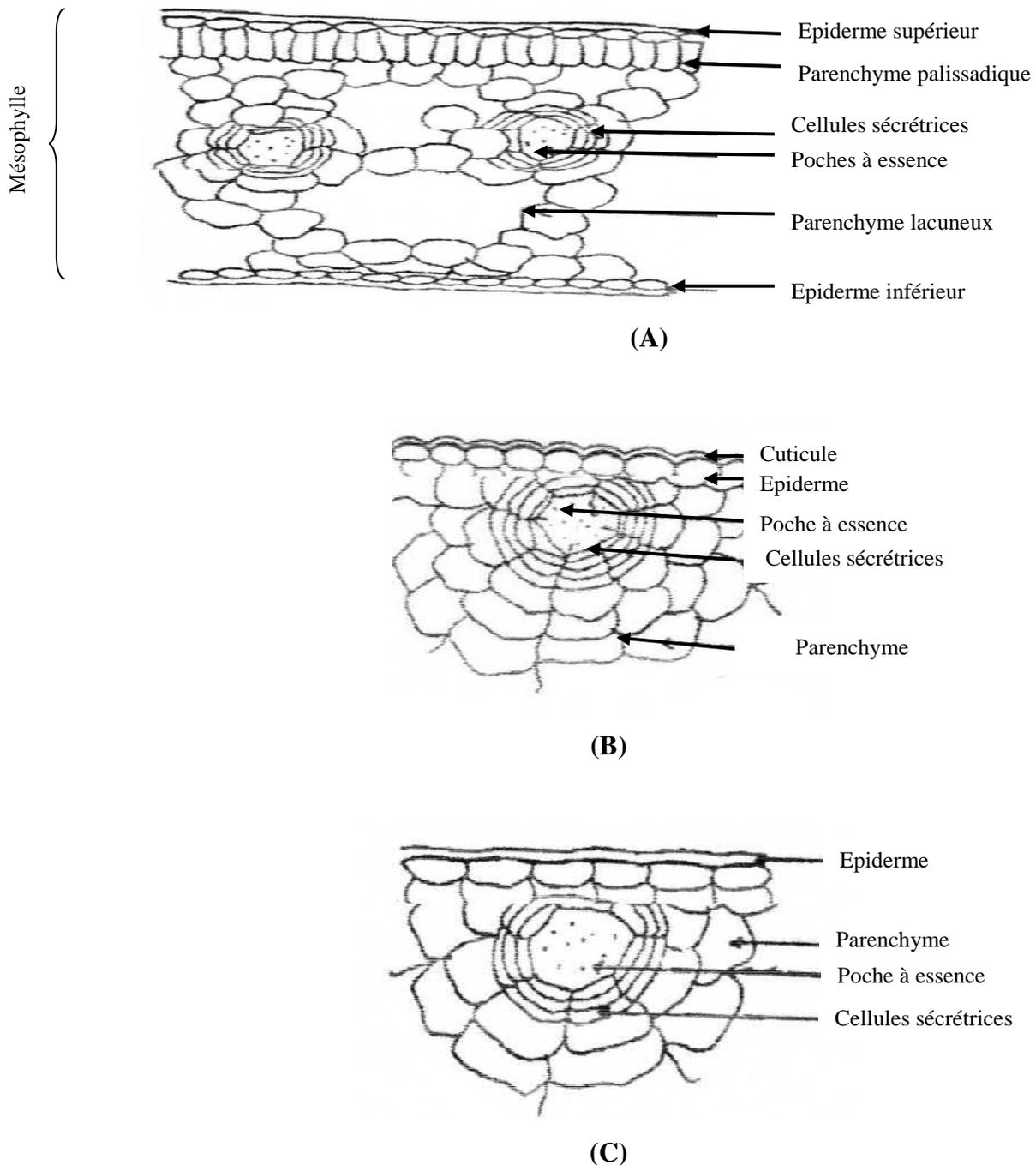


Figure 1. Poches sécrétrices des huiles essentielles des *Citrus* : (A) dans feuilles, (B) dans les flavedo, (C) dans les pétales (Ferhat *et al.*, 2010).

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle. Les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes.

1.2.1.4. Composition chimique

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont : les terpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers. Ces molécules peuvent agir en synergie, ce explique à la fois leur efficacité, mais aussi la polyvalence, dans la mesure où elles y sont le plus souvent, certes à des concentrations différentes, toutes présentes dans les huiles essentielles. L'ensemble de leurs constituants se caractérise par un faible poids moléculaire (Girard, 2010).

D'après Mondello *et al.* (2005), les huiles essentielles d'agrumes sont des mélanges comportant plus de 200 composés qui peuvent être regroupés en fractions non volatile (1-15 %) et volatile (85-99 %). Cette dernière fraction contient principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes ainsi qu'une petite quantité de monoterpènes oxygénés (fonctions aldéhydes, cétones, alcools et esters). Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 (2-méthylbutadiène) et ont pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$. Les monoterpènes ont pour formule $C_{10}H_{16}$ et les sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$. La partie non volatile contient des acides gras, des stérols, des caroténoïdes, des cires, des coumarines, des psoralènes et des flavonoïdes (Mondello *et al.*, 2003).

L'essence de *Citrus limon* est composée de 92% à 93% de terpènes dont le *d*-limonène est le plus abondant (Iserin *et al.*, 2001 ; Ferhat *et al.*, 2010), de sesquiterpènes, d'aldéhydes (dont le citral est le plus dominant) et d'esters (Iserin *et al.*, 2001).

1.2.1.5. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (Besombas, 2008). Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (Olle et Bender, 2010). Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

1.2.1.6. Production mondiale des huiles essentielles

La production mondiale en huiles essentielles est en nette évolution. Elle atteint plus de 35000 tonnes ces dernières années. La production mondiale en huiles essentielles du citron occupe une

place non négligeable ; elle vient en 3^{ème} rang après celles de l'orange et de la menthe japonaise avec 9200 tonnes. Les principaux producteurs sont l'Argentine, l'Italie et l'Espagne (tableau 2) (Perfumer et Flavorist, 2009).

Les principaux pays producteurs des huiles essentielles se retrouvent à travers tous les continents, notamment certains pays méditerranéens tels que l'Italie, l'Espagne, le Portugal, la France, la Croatie, l'Albanie et la Grèce. Le continent asiatique, avec sa diversité de climats, semble être le producteur le plus important d'huiles essentielles dont la Chine et l'Inde jouent un rôle important dans la production mondiale suivies de l'Indonésie, du Sri Lanka et du Vietnam. Tandis que certains pays producteurs des huiles essentielles en Afrique, incluant le Maroc, la Tunisie, l'Égypte et l'Algérie avec la Côte d'Ivoire, l'Afrique du Sud, le Ghana, le Kenya, la Tanzanie et l'Ouganda, ont des productions mineures. Le continent américain est également l'un des plus grands producteurs des huiles essentielles, on note que les États-Unis, le Canada, et le Mexique possèdent une richesse très importante en matière végétale aromatique. Du côté de l'Amérique du Sud, les huiles essentielles sont principalement produites par le Brésil, l'Argentine, le Paraguay, l'Uruguay, le Guatemala, et île du Haïti (Perfumer et Flavorist, 2009).

Tableau 2. Production mondiale des huiles essentielles en 2008 (Perfumer et Flavorist, 2009).

Huiles essentielles	Production (t)	Principaux pays producteurs
Huiles d'orange	51000	USA, Brésil, Argentine.
Huile de menthe japonaise	32000	Inde, Chine, Argentine.
Huiles du citron	9200	Argentine, Italie, Espagne
Huiles de l'eucalyptus	4000	Chine, Inde, Australie, Afrique de sud
Huile de la menthe poivrée	3300	Inde, USA, Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie, Madagascar
Huile de la citronnelle	1800	Chine, Sri Lanka
Huiles de la menthe verte	1800	USA, Chine
Huiles du bois de cèdre	1650	USA, Chine
Huile <i>Litsea cubeba</i>	1200	Chine
huile du patchouli	1200	Indonésie, Inde
Huile de la lavande	1100	France
Huile de <i>Corymbia citriodora</i>	1000	Chine, Brésil, Inde, Vietnam

1.2.2. Extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins,

etc.), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hellal, 2011).

1.2.2.1. Pression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (Lesley, 1996 ; Roux, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Fillatre, 2011). Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (Basil *et al.*, 1998 ; Roux, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010). Diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées (Ferhat *et al.*, 2010). Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008). Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de micro-organismes (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

1.2.2.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (Bruneton, 1993 ; Ferhat *et al.*, 2010). Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993 ; Lucchesi, 2005 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Ferhat *et al.*, 2010). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

1.2.2.3. Entraînement à la vapeur d'eau

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).

1.2.2.4. 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 (Kaufmann et Christen, 2002 ; Piochon, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Dupuy, 2010), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente (Ferhat *et al.*, 2010).

1.2.3. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques imposées par les lois des pays producteurs et exportateurs et par les pays importateurs. Ces critères sont définis dans des normes internationales ISO (International Organization for Standardization) ou françaises AFNOR (Association Française de Normalisation) (NF ISO 855). Ainsi, les propriétés organoleptiques et physiques sont contrôlées telles que la coloration, l'odeur, la réfraction, la solubilité, le point éclair mais également les propriétés chimiques telles que les indices d'acides et d'esters (Fillatre, 2011).

Les huiles essentielles de *Citrus* extraites à partir de zeste de fruit sont largement utilisées dans les industries alimentaires et de parfumerie. Du point de vue commercial, elles présentent une importance économique considérable. Malheureusement, la production et l'introduction des huiles essentielles de mauvaise qualité et/ou altérées dans le marché est une occurrence courante. Par conséquence, les analystes des huiles essentielles des agrumes exigent le développement et la disponibilité des méthodes d'analyses de haute résolution, rapides, sensibles et sélectives (Tranchida *et al.*, 2011).

La plupart des méthodes appliquées dans l'analyse d'huiles essentielles reposent sur des procédures chromatographiques. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile ; elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979). La CPG couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM), permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres

de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG (Zellner *et al.*, 2010)

1.2.4. Toxicité des huiles essentielles

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non-toxiques. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (Hammer et Carson, 2011). Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (Bernadet, 1983).

Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein, 2005).

1.2.5. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (Grysole, 2005). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (Pingot, 1998; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoiaie *et al.*, 2010). Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Conner, 1993 ; Hammer *et al.*, 1999). L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (Grysole, 2005).

Les huiles essentielles de *Citrus limon* servent à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Choi *et al.*, 2000 ; Robert et Lobstein, 2005 ; Bisignano *et al.*, 2011). Récemment, certaines études ont montré la possibilité d'intégrer les huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent antioxydant (Himed, 2011 et Hellal, 2011).

1.2.6. Contamination des huiles essentielles

La contamination des huiles essentielles de *Citrus* est un problème qui a été connue depuis 1960. La détermination des résidus de pesticides et de plastifiants dans les HE de *Citrus* était parfaitement documentée. Toutefois, jusqu'en 2000, la présence des autres types de contaminants n'a été pas étudiée. Dans la dernière décennie, des travaux ont été menés pour évaluer la présence des contaminants organiques et inorganiques dans les HE par l'utilisation des techniques innovatrices (spectrométrie par absorption atomique de four de graphite (GFAAS), chromatographie en phase gazeuse avec détecteur de phosphore d'azote (NPD), chromatographie avec la spectrométrie de masse à haute résolution, chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)), dans le but de contrôler le niveau de contamination (Dugo *et al.*, 2011). Ces études s'intéressaient à l'analyse des pesticides et des plastifiants phospho-organiques et chloro-organiques (Dugo et Di Bella, 2002), ainsi qu'à la présence de polychlorodibenzo-*p*-dioxine (PCDD), polychlorodibenzo-*p*-furane (PCDF), polychlorobiphenyl (PCB) (Cautela *et al.*, 2007), métaux lourds (Bruno *et al.*, 1978 ; Kumar *et al.*, 1994), chlorohydrine (Weiss *et al.*, 2003a,b) et spinosad (West et Turner, 2000). Les investigations sur la contamination des huiles essentielles de *Citrus* ont démontré des problèmes évidents sur la qualité et non pas sur la quantité (Dugo *et al.*, 2011).

1.3. Activités biologiques des huiles essentielles

1.3.1. Activité antioxydante des huiles essentielles

1.3.1.1. Activité antioxydante des huiles essentielles dans les aliments

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles où l'application par vaporisation en surface des aliments, contribue à les préserver des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007). Parmi ces huiles, les huiles essentielles des *Citrus*. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes dont le *d*-limonene est le constituant majeur, jouant un rôle principal dans l'activité antioxydante (Girenavar *et al.*, 2007; Ao *et al.*, 2008 ; Buchbauer, 2010).

Choi *et al.* (2000), Misharina et Samusenko (2008), Himed (2011) et Hellal (2011) ont démontré que les HE de *Citrus limon* ont un pouvoir antioxydant très important. A cet effet, Himed (2011) a substitué l'antioxydant synthétique (Tocoblend) par l'HE du *Citrus limon* à une concentration de 100 ppm dans la margarine. Hellal (2011) a démontré que des concentrations des huiles essentielles allant de 500 à 3000 ppm de l'HE de *Citrus aurantium* comparativement à l'HE de *C. limonum* ont réduit de manière significative l'oxydation des lipides de la sardine.

1.3.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs tests pour la mesure de l'activité antioxydante d'un composé (Portes, 2008). Selon la littérature, les deux méthodes les plus utilisées dans l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles sont celle de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH°) et celle de blanchissement du β -carotène dans l'acide linoléique (Gachkar *et al.*, 2007 ; Ferreira *et al.*, 2006 ; Eyob *et al.*, 2008 ; Alavi *et al.*, 2008 ; Athamena *et al.*, 2010 ; Jazet Dongmo *et al.*, 2010).

1.3.2. Activité antimicrobienne

1.3.2.1. Mécanismes de l'action antimicrobienne des huiles essentielles

Les mécanismes par lesquels les huiles essentielles exercent leur activité antibactérienne sont incomplètement compris, mais il y a un certain nombre de mécanismes proposés (Holley et Patel, 2005). L'action des huiles essentielles sur le développement des micro-organismes peut être expliquée par l'altération de la perméabilité membranaire des germes en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie (Sikkema *et al.*, 1995 ; Chami, 2005 ; Oussalah *et al.*, 2006 ; Souza *et al.*, 2006).

Smith-Palmer *et al.* (2001) ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'effet des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif qui se caractérisent par une membrane externe imperméable. Selon Cristiani *et al.* (2007), cette imperméabilité est due à la richesse de cette membrane en lipo-polysaccharides la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer.

D'autres études ont été effectuées sur la relation entre la présence de citral (mélange des isomères néral et gèranial) dans le zeste des fruits des agrumes et l'inhibition de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum* qui sont les principales moisissures responsables de la contamination des *Citrus* (Wuryatmo *et al.*, 2003). Cette inhibition est due à la présence d'un groupement carbonyle adjacent aux carbones α et β dans les aldéhydes insaturés α et β ; néral et gèranial ; ceci polarise positivement le carbone β et l'aldéhyde peut agir en tant qu'agent d'alkylation direct capable de lier les groupes nucléophiles cellulaires (Cosentino *et al.*, 1999).

1.3.2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE les plus couramment utilisées sont : la méthode de diffusion dans l'agar et la méthode de dilution d'agar et de bouillon (Malecky, 2007 ; Pauli et Schilcher, 2010). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (Wilkinson, 2006) du fait de la faible solubilité des huiles essentielles dans l'eau, d'où la nécessité

d'ajouter des solvants (diméthylsulfoxyde et l'éthanol) ou des détergents (tween 20) au milieu de culture (Remmal *et al.*, 1993; Hammer *et al.*, 1999), et de la volatilité des huiles essentielles pendant l'incubation.

1.3.2.2.1. Méthode de diffusion dans l'agar ou 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 (Jacob, 1979 ; Abdesselam, 2006 ; Razakarivony *et al.*, 2009). Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée durant 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère et Avril, 2002). Elle permet également de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles et autres agents antimicrobiens (Wilkinson, 2006).

La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante (Conner et Beuchat, 1984).

1.3.2.2.2. Méthode de dilution

Les méthodes de dilution d'agar ou de bouillon permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices des agents antimicrobiens. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. Les microorganismes restent cependant viables (Hammer *et al.*, 1999 ; Oussou *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2009).

Dans le test de dilution, l'huile essentielle à tester est incorporée dans un milieu de gélose semi-solide ou liquide avec différentes concentrations en huiles essentielles. Après incubation, l'absence de la croissance microbienne dans les boîtes de pétri ou dans les tubes à essai, est déterminée à l'œil nu (Pauli et Schilcher, 2010).

1.3.2.3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HE ou de leurs composants actifs tels que la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la

matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée et le type des microorganismes ciblés (Malecky, 2007).

Une des difficultés pour les chercheurs est l'absence d'une méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne normalisée pour examiner les activités biologiques des huiles essentielles (Wilkinson, 2006). L'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux utilisés en microbiologie, explique la variété des techniques employées (Bouguerra, 2011).

Les propriétés antimicrobiennes des HE diffèrent en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HE (Tassou *et al.*, 1995). Ainsi les huiles essentielles diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur des bactéries de la phase aqueuse (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Une réaction chimique entre les protéines et les groupes fonctionnels des HE réduit la disponibilité des molécules actives (Malecky, 2007), ceci a été observé pour le carvacrol, conduisant à une protection relative de *Bacillus cereus* contre les HE dans le lait (Pol *et al.*, 2001)

Selon Malecky (2007), le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HE est le type et la structure moléculaire de ces composants actifs. Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HE dans lesquelles ils se trouvent. Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HE est le type de microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des HE. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Candida albicans* et *Aspergillus niger* ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries dont celles à Gram- apparaissent plus résistantes que celles à Gram + vis-à-vis l'HE (Hammer *et al.*, 1999 ; Cox *et al.*, 2000 ; Smith-Palmer *et al.*, 2001).

1.3.2.4. Essais de l'activité antimicrobienne

Plusieurs études ont démontré que les huiles essentielles de *Citrus limon* ont des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries, les levures et les moisissures (Fisher et Phillips, 2008). Piacentini (1949) était le premier qui a montré que les essences d'agrumes en solution aqueuse ont des propriétés de désinfectants plus puissants que le phénol.

Subba *et al.* (1967) ont signalé que les HE de *Citrus limon*, à une concentration de 2000 ppm, inhibent le développement de spores des *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus plantarum*. Par ailleurs, Moreira *et al.* (2005) ont révélé que les huiles essentielles de *Citrus limon* sont efficaces contre quatre souches de *E. coli* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 2,5 ml/100 ml et une concentration minimale bactéricide (CMB) de 2,8 ml/100 ml.

L'étude de Fisher et Phillips (2006) a montré que le linalol et le citral (composants des huiles essentielles de *Citrus limon*) ont des propriétés antimicrobiennes sous forme de vapeur contre *Campylobacter jejuni*, *E. coli O157*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

Caccioni *et al.* (1998) ont indiqué que l'huile essentielle de *Citrus limon* possède une activité antifongique à une concentration de 1056,4 ppm contre *Penicillium digitatum*. De même, Belletti *et al.* (2004) ont démontré que les huiles essentielles à des fortes concentrations de terpènes comme le citral, sont plus efficaces contre *Saccharomyces cerevisiae*.

Selon Fisher et Phillips (2008), plusieurs études sont centrées sur l'application des huiles essentielles de *Citrus limon* comme agents antimicrobiens dans les aliments tels que les poissons (Kim *et al.*, 1995 ; Mahmoud *et al.*, 2004), les viandes (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005), les poulets (Fisher et Phillips, 2006), les produits laitiers (Dabbah *et al.*, 1970; Holley et Patel, 2005), les légumes et les fruits (Fisher et Phillips, 2006 ; Fisher *et al.*, 2007; Parish *et al.*, 2003; Rojas-Grau *et al.*, 2007) dans la confiserie (Kotzekidou *et al.*, 2007).

Burt (2004), Holley et Patel (2005) et Fisher et Phillips (2006) ont démontré que pour obtenir la même efficacité antimicrobienne des huiles essentielles *in vitro*, la matrice alimentaire exige des concentrations plus élevées, mais ces dernières peuvent altérer les propriétés organoleptiques des produits alimentaires.

2. Additifs alimentaires

2.1. Définition

Un additif alimentaire est défini comme toute substance qui n'est pas habituellement consommée en tant que denrée alimentaire en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique de l'aliment, qu'elle ait ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à la denrée alimentaire dans un but technologique ou organoleptique, à une quelconque étape de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de la dite denrée, entraîne ou peut entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée ou peut affecter d'une autre façon les caractéristiques de la dite denrée. L'expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires dans le but d'en maintenir ou améliorer les propriétés nutritives, ou au chlorure de sodium. Quand un additif alimentaire est autorisé au niveau européen, celui-ci bénéficie d'un code qui se compose de la lettre "E" suivie d'un numéro permettant d'identifier la catégorie (CODEX STAN 107-1981).

2.2. Classification des additifs alimentaires

Les additifs alimentaires sont classés dans des catégories fonctionnelles en considérant les propriétés principales d'utilisation. Ce type de classement a été choisi en France, à la Communauté économique européenne CEE et au Codex alimentarius (Souverain, 1992).

Les additifs alimentaires sont classés selon la directive n°89/107 du 21.12.1988 de la CEE en 24 catégories (tableau 3). La numérotation de chaque substance sera précédée d'un numéro (E..., la lettre E suivi de 3 ou 4 chiffres) si un tel numéro lui a été attribué. La commission de Codex alimentarius (CL 1988/52-FAC Novembre 1988) établit la liste des additifs dans un ordre numérique, avec le numéro attribué à chaque substance et l'indication de la fonction technologique de celle-ci. Environ 450 substances. Elle propose un classement fonctionnel des additifs en 21 catégories (tableau 3).

Tableau 3. Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius

Classement des additifs selon le cadre de la CEE	Classement des additifs selon le cadre du Codex alimentarius
1. Colorant	1. Correcteur d'acidité et du pH (tamponnant),
2. Conservateur	2. Antiagglomérant (desséchant, antiadhérant),
3. Antioxygène	3. Antimoussant,
4. Emulsifiant	4. Antioxygène (et synergiste d'antioxydation),
5. Sel de fonte	5. Agent de charge,
6. Epaississant	6. Edulcorant,
7. Gélifiant	7. Colorant (et adjuvants de coloration),
8. Stabilisant	8. Stabilisateur de couleur,
9. Exhausteur de goût	9. Emulsifiant (plastifiant, dispersant, surfactif),
10. Acidifiant	10. Sel de fonte (émulsifiant pour fromage seulement),
11. Correcteur d'acidité (et de pH)	11. Exhausteur de goût,
12. Antiagglomérant	12. Agent de traitement de farine (conditionneur de pâte),
13. Amidon modifié	13. Gélifiant,
14. Edulcorant	14. Agent de glisse (d'enrobage, lustrage, vernissage),
15. Poudre à lever	15. Conservateur (antimicrobien),
16. Antimoussant	16. Gaz propulseur (et gaz pour le stockage, emballage),
17. Agent d'enrobage (et de glisse)	17. Stabilisant (liant, séquestrant, ajusteur de densité),
18. Agent de traitement de la farine	18. Epaississant (agent de texture, gonflant),
19. Affermissant	19. Poudre à lever,
20. Humectant	20. Agent moussant
21. Séquestrant	21. Humectant (mouillant, rétenteur d'humidité)
22. Enzyme	
23. Agent de charge	
24. Gaz propulseur et gaz d'emballage	

2.3. Conservateurs

L'industrie alimentaire dispose d'une vaste gamme de procédés chimiques de conservation. Il s'agit en principe, de substances capables de retarder ou d'arrêter la fermentation, l'acidification des aliments en inhibant la prolifération de micro-organismes (conservateurs proprement dites) ou d'empêcher des réactions chimiques dues à la présence d'oxygène (antioxydants) (SPE, 1987).

2.3.1. Agents conservateurs (antibactériens et antifongiques)

La multiplication des micro-organismes dans les produits alimentaires entraîne des modifications indésirables de ces produits et les rend impropres à la consommation par altération du goût, de l'aspect et de l'odeur, sans forcément de risque sanitaire (Oudot, 1999). Certains micro-organismes sont très dangereux (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*) de point de vue sanitaire et peuvent causer des troubles graves chez le consommateur, qualifiées habituellement d'intoxications. Ces germes strictement pathogènes sont dangereux même en faible quantité et en l'absence de développement ou de dégradation induite dans l'aliment (Bousbia, 2004).

Les principaux traitements appliqués aux produits alimentaires pour les conserver de ces germes sont classés en traitements d'élimination, de destruction et de stabilisation (Guiraud, 2003). Ces traitements ne doivent pas rendre le produit toxique et ne doivent pas avoir de conséquences néfastes au point de vue organoleptique et nutritif (Bousbia, 2004). Parmi ces traitements figure l'ajout des conservateurs aux produits non toxiques pour le consommateur aux doses utilisées (Guiraud, 2003).

Un additif conservateur est défini comme étant une substance non consommée normalement en tant que denrée alimentaire, que l'on incorpore à un aliment en vue d'accroître sa sécurité et sa stabilité microbiologique. Il faut signaler que le terme additif ne s'applique qu'à des substances utilisées à dose faibles, en principe moins de 1% (Bourgeois, 1992)

Il existe deux types de conservateurs, minéraux et organiques. Parmi les agents conservateurs minéraux figurent les chlorures et les phosphates, les nitrates, les nitrites, les anhydres sulfureux et les sulfites, les anhydres carboniques et les bicarbonates et le peroxyde d'hydrogène. Les agents conservateurs organiques (acides organiques) ont un effet conservateur primaire (acide acétique, propionique, formique, sorbique, benzoïque, etc.) et un effet secondaire (acide citrique, tartrique, lactique, ascorbique, etc.) (Odiot, 1992).

2.3.2. Agents antioxydants

L'oxydation des lipides pose un problème majeur dans le stockage des aliments et plus particulièrement pour ceux contenant des acides gras polyinsaturés (Alais *et al.*, 2003; Nessrien et

Mohamed, 2007 ; Chanforan, 2010). L'oxydation peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs, soit par l'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques et les radicaux libres, soit par la photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs, soit par l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxigénase (Eymard, 2003). La lutte contre l'oxydation des lipides représente un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant (Moll, 1998).

Il y a deux options pour retarder la réaction d'oxydation, soit intercepter les radicaux libres responsables de propagation en chaîne, soit éviter la décomposition des hydroperoxydes dans les radicaux libres, ces deux modes d'action fournissent la base de classification des antioxydants sous forme primaire ou secondaire (Kouame, 2004). La nature chimique des antioxydants est la base d'une autre classification des antioxydants sous formes synthétique ou naturel. Les antioxydants de synthèse sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires, les antioxydants naturels leur étant préférés (Eymard, 2003).

Parmi les antioxydants synthétiques, figurent l'anhydride sulfureux et ses combinaisons minérales. Ils ont été utilisés comme premiers antioxydants des vins et des bières, malgré leur caractère fortement allergisant (Just *et al.*, 2005). On trouve également d'autres composés comme le gallate de propyle, le gallate d'octyle, le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT) et le tert-butylhydroquinone (TBHQ) (Bondet *et al.*, 1997 ; Portes, 2008), ce dernier est autorisé aux Etats -Unies à la dose de 0,05 mg/Kg mais il est interdit par CEE car il es suspecté de génotoxicité (Chevolleau *et al.*, 1992). L'utilisation de BHA ou de BHT est remise en cause actuellement en raison des risques toxicologiques (Morelle, 1988 ; Martel et Pescal, 1992 ; Portes, 2008).

Les industries consommatrices des antioxydants ainsi que les scientifiques tendent vers l'utilisation de composés naturels (El Kalamouni, 2010). Parmi lesquels, figurent l'acide L-ascorbique (vitamine C) et son dérivé le palmitate d'ascorbyle qui sont utilisés en synergie (Pratt, 1980 ; Perez-Bonilla *et al.*, 2006 ; Portes, 2008). Les tocophérols contenus dans les lipides végétaux (Portes, 2008), les composés phénoliques (Marinova *et al.*, 1992 ; Portes, 2008) et les extraits végétaux ne sont pas reconnus comme additifs du fait qu'ils sont étiquetés comme des « épices » tout en possédant des propriétés antioxydantes (Portes, 2008).

2.3.3. Normes des conservateurs et des antioxydants utilisés dans les produits laitiers

Les agents conservateurs, antioxydants et leurs doses maximales utilisés dans le lait et les produits laitiers sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4. Norme générale Codex pour les conservateurs et les antioxydants utilisés dans les produits laitiers (**Codex alimentarius, 2010**)

	Additifs	Produits laitiers	Limite maximale (mg/kg)
Agents conservateurs	E200 : Acide sorbique	Laits fermentés aux fruits, fromage frais aux fruits, Matériaux d'emballage mis en contact aux denrées alimentaires laitières	300-1000
	E 202 : Sorbate de Potassium	Laits fermentés aux fruits, fromage frais aux fruits,	3000
	E 203 : Sorbate de Calcium	Matériaux d'emballage mis en contact aux denrées alimentaires laitières	3000
	E 234 : Nisine	Produits similaires au fromage	12.5
Antioxydants	E 300 : Acide ascorbique	Lait concentré et en poudre	0,5
	E 310 : Gallate de propyle	Beurre	0,1
	E 320 : Butyltertiaire hydroxyl anisol	Beurre	0,1

2.4. Arômes

Le règlement CE n°178/2002 englobe les arômes dans le concept de « denrées alimentaires ». La Directive « Arômes » 88/388/CEE se caractérise par le fait qu'elle fixe les définitions de l'arôme et des agents d'aromatization (Blaquiere *et al.*, 2006).

2.4.1. Définition de l'arôme

La Directive 88/388/CEE définit l'arôme comme étant tout produit ou substance qui, étant destiné à être ajouté à des denrées alimentaires pour leur donner une odeur, un goût ou une odeur et

un goût, entre dans l'une des catégories d'aromatisants, à l'exception des substances ayant exclusivement un goût sucré, acide ou salé.

2.4.2. Définition des agents d'aromatisation

2.4.2.1. Préparations aromatisantes

Ces produits sont obtenus par des procédés physiques appropriés ou par des procédés enzymatiques ou microbiologiques, à partir d'une matière première d'origine végétale ou animale, soit en l'état, soit transformée pour la consommation humaine par des procédés traditionnels de préparation des denrées alimentaires (y compris le séchage, la torréfaction et la fermentation) (Directive 88/388/CEE).

2.4.2.2. Substances aromatisantes naturelles

Les substances aromatisantes naturelles sont obtenues par des procédés physiques appropriés (y compris la distillation et l'extraction au solvant) ou par des procédés enzymatiques ou microbiologiques à partir des mêmes matières premières que les préparations aromatisantes (Directive 88/388/CEE).

2.4.2.3. Substances aromatisantes identiques aux naturelles

Ces substances sont obtenues par synthèse chimique et sont identiques chimiquement à une substance présente naturellement dans une matière première d'origine végétale ou animale (Directive 88/388/CEE).

2.4.2.4. Substances aromatisantes artificielles

La synthèse chimique a permis d'élaborer des structures n'existant pas dans la nature, ou non encore identifiées et pourtant dotées de caractéristiques organoleptiques: le cas le plus typique est celui de l'éthylvanilline. Ces substances sont obtenues par synthèse chimique et ne sont pas identiques chimiquement à une substance présente naturellement dans une matière première d'origine végétale ou animale (Directive 88/388/CEE).

2.4.2.5. Arômes de transformation

Ces produits sont obtenus, dans le respect des bonnes pratiques de fabrication, par chauffage à une température inférieure à 180°C, pendant un temps inférieur à 15 minutes d'un mélange d'ingrédients n'ayant pas obligatoirement des propriétés aromatisantes et dont au moins un contient de l'azote et un autre un sucre réducteur. Parmi le grand nombre de composés produits beaucoup sont volatils et dotés de notes rappelant les produits alimentaires chauffés ou grillés : viande grillée, poulet rôti, caramel, etc. (Directive 88/388/CEE).

2.4.2.6. Arômes de fumée

La combustion de bois tel que le chêne, le hêtre et le noyer donne une fumée, qui peut soit être directement mise au contact des aliments, soit être recueillie sous forme de condensat de fumée d'où sont tirés des mélanges aromatisants : les arômes de fumée (Directive 88/388/CEE).

2.4.3. Normes des arômes utilisés dans les produits laitiers

Seules les substances aromatiques naturelles sont autorisées. Toutes fois, l'utilisation de matières aromatiques renforcées aux arômes d'abricot, ananas, banane, fraise, framboise, poire, prune et cerise est admise (circulaire du 21.12.1971). La limite de renforcement est au maximum de 2 g de substance artificielle par Kg de matière aromatique naturelle de base concentrée au minimum 4 fois.

Ces arômes sont utilisés dans les laits aromatisés ; les laits de conserve, les laits concentrés sucrés, les laits secs aromatisés, les fromages frais, les laits fermentés et les crèmes (Gouget *et al.* 1992).

3. Crème fraîche

3.1. Définition

La crème est le produit laitier fluide plus ou moins riche en matière grasse qui se présente sous la forme d'une émulsion de type graisse-dans-lait écrémé et qui a été obtenue en la séparant physiquement du lait (Codex Alimentarius Commission, 2003).

Selon Vierling (1999), GRET (Groupe de recherche et d'échanges technologiques) (2002), (Jeantet *et al.*, 2008) et GEM RCN (Groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition) (2009), la dénomination crème est réservée au lait contenant au moins 30 g de matière grasse provenant exclusivement du lait pour 100 g de poids total. La dénomination crème légère est réservée au lait contenant entre 12g inclus et 30g non inclus de matière grasse provenant exclusivement du lait pour 100 g de poids total.

Les apports essentiels de la crème fraîche sont constitués par les lipides et la vitamine A. Elle fournit également une quantité intéressante de calcium et de vitamine D (Jeantet *et al.*, 2008) (tableau 5).

La valeur nutritionnelle de la crème dépend de la teneur lipidique : plus la crème contient de graisses, moins elle contient de lactose, de minéraux et de protéines et plus elle contient de la vitamine A et des carotènes. La crème contient environ deux fois plus de vitamines liposolubles que le lait, mais à peine moins de vitamines hydrosolubles. La crème épaisse (surie) contient des

aldéhydes et des cétones à l'origine de son goût particulier, ainsi que de l'acide lactique (8 g/litre environ) (FAO, 2010).

Tableau 5. Composition moyenne de la crème fraîche à 30% de matière grasse
(Jeantet *et al.*, 2008)

Composition	Teneur
Matière grasse	30 %
Lactose	3,1%
Protéine	2,3%
Minéraux	0,5%
Calcium	90mg.100 g ⁻¹
Eau	59%

3.2. Catégories des crèmes laitières

Selon Lupien (1998), il existe généralement deux catégories de crèmes : les crèmes de consommation utilisées directement en cuisine, en pâtisserie et dans la préparation de crèmes glacées et les crèmes de transformation destinées à la fabrication du beurre et d'autres produits.

3.2.1. Crèmes de consommation

Les crèmes de consommation se distinguent par leur richesse en matière grasse, selon le traitement thermique qui leur est appliqué et selon les traitements spécifiques liés à leurs utilisations (Mahaut *et al.*, 2000 ; Jeantet *et al.*, 2008) :

3.2.1.1. Selon la teneur en matière grasse

3.2.1.1.1. Crème à 12 % au moins de matière grasse ou Crème légère

Une crème légère peut être liquide ou épaisse, elle doit être obligatoirement pasteurisée ou stérilisée (Boutonnier et Dunand, 1985). Elle convient bien pour le thé, le café et les fruits frais ou en compote (Sina, 1992).

3.2.1.1.2. Crème à 30 % au moins de matière grasse

Elle est le plus souvent pasteurisée et maturée après un ensemencement par les *streptocoques* lactiques. L'acidité développée apporte une protection contre d'autres germes qui pourraient être dangereux. L'acidité de ces crèmes, exprimée en acide lactique pour 1000 de la partie non grasse, se

situé entre 8 et 10 contre 1,5 dans les crèmes non mûrées. En degré Dornic cela fait, d'une part entre 80° et 100° D et d'autre part, 15° D dans le non gras. Elle convient plus particulièrement à la cuisine et à la pâtisserie (Alais, 1984 *In* Sina, 1992).

3.2.1.2. Selon le traitement thermique appliqué

3.2.1.2.1. Crème crue

C'est une crème qui n'a subi aucun traitement de pasteurisation ou de stérilisation. Fruit direct de l'écémage, elle est refroidie et stockée à +6°C (GEM RCN, 2009). De texture liquide et de saveur douce pendant les premiers jours, sa teneur en matière grasse est généralement supérieure à celle des autres crèmes. La mention « crue » est obligatoire sur l'étiquetage (Boutonnier et Dunand, 1985 ; GEM RCN, 2009). Elle est souvent chargée en germes douteux ou dangereux (Sina, 1992).

3.2.1.2.2. Crème pasteurisée

La crème fraîche désigne une crème n'ayant subi que le traitement de pasteurisation et conditionnée sur le lieu de production dans un délai de 24 heures (Vierling, 1999 et GEM RCN, 2009).

3.2.1.2.3. Crème stérilisée et crème Ultra Haute Température (UHT)

- **Crème stérilisée fluide**

Une fois conditionnée, la crème crue est stérilisée à 115°C durant 15 à 20 minutes, puis refroidie. Ce procédé développant un goût de cuit ou de caramel, d'où la préférence de la crème UHT (GEM RCN, 2009).

- **Crème UHT**

La crème UHT est stérilisée par un traitement thermique de 140 à 150°C durant quelques secondes, puis rapidement refroidie et scellée en conditionnement aseptique, étanche et stable jusqu'à la date limite de consommation (GEM RCN, 2009). Ce type de crème présente le plus souvent un goût doux (pH 6,5 à 7) (Vierling, 1999).

Selon les travaux de Vierling (1999), les dates limites de consommation (DLC) des crèmes stérilisées et des crèmes UHT sont respectivement de 4 et 8 mois.

3.2.1.3. Selon les traitements spécifiques liés à leurs utilisations

3.2.1.3.1. Crème fouettée

La crème fouettée ou à fouetter est une émulsion foisonnée (Sina, 1992 ; Jeantet *et al.*, 2006 b ; Jeantet *et al.*, 2008) dans la quelle les bulles d'air sont intégrées dans un réseau de globules gras partiellement coalescés. Les émulsifiants (mono et diglycérides) et les stabilisants (gélatines et carraghénanes), assurent la rigidité et la stabilité de la mousse (Jeantet *et al.*, 2006 b). Le foisonnement ne doit pas être supérieur à 35 par apport au volume minimal (Vierling, 1999). Les crèmes fouettées légères ou non, contiennent au minimum 75% de crème ou de crème légère, qui peuvent être additionnées de saccharose (15% maximum), de ferments lactiques, de matières aromatiques naturelles, de stabilisateurs ou de protéines du lait (Vierling, 1999 ; GEM RCN, 2009).

3.2.1.3.2. Crème Chantilly

La crème Chantilly est une crème fouettée contenant au moins 30 % de matière grasse et n'ayant fait l'objet d'aucune autre addition que de saccharose (sucre mi-blanc, sucre blanc ou sucre blanc raffiné) et éventuellement de matières aromatisantes naturelles (Vierling, 1999 ; GEM RCN, 2009).

3.2.1.3.3. Crème sous pression

La crème sous pression est pasteurisée ou stérilisée (Vierling, 1999), elle est conditionnée avec le protoxyde d'azote pur qui assure le foisonnement et la conservation (Sina, 1992 ; Vierling, 1999 et GEM RCN, 2009).

Sina (1992) et GEM RCN (2009) ont signalé que 0,1% de gélatine peut être ajouté comme agent stabilisateur. Par ailleurs, Sina (1992) a rapporté que 15% de sucre ordinaire et des matières aromatiques naturelles peuvent être y ajoutées.

3.2.2. Crèmes de transformation

Les crèmes destinées à la transformation, notamment à la fabrication du beurre, subissent divers traitements de préparation (normalisation, désacidification) destinés à améliorer les conditions technologiques et la qualité des produits fabriqués (Lupien, 1998).

3.3. Technologie de la crème laitière

3.3.1. Ecrémage centrifuge

L'écrémage du lait est réalisé dans les écrémeuses centrifuges et hermétiques. Ces dernières sont constituées de plusieurs compartiments (figure 2) (Jeantet *et al.*, 2008) :

- D'un bol cylindroconique dans lequel est introduit, sous pression, le lait à écrémer ;

- D'un ensemble de plateaux ou assiettes distants de 2 cm et inclinés à 45° qui séparent le lait en couche mince. Ces plateaux présentent des trous qui forment des conduits verticaux dans lesquels chemine le lait. Le lait écrémé et la crème sont évacués séparément en haut du bol.

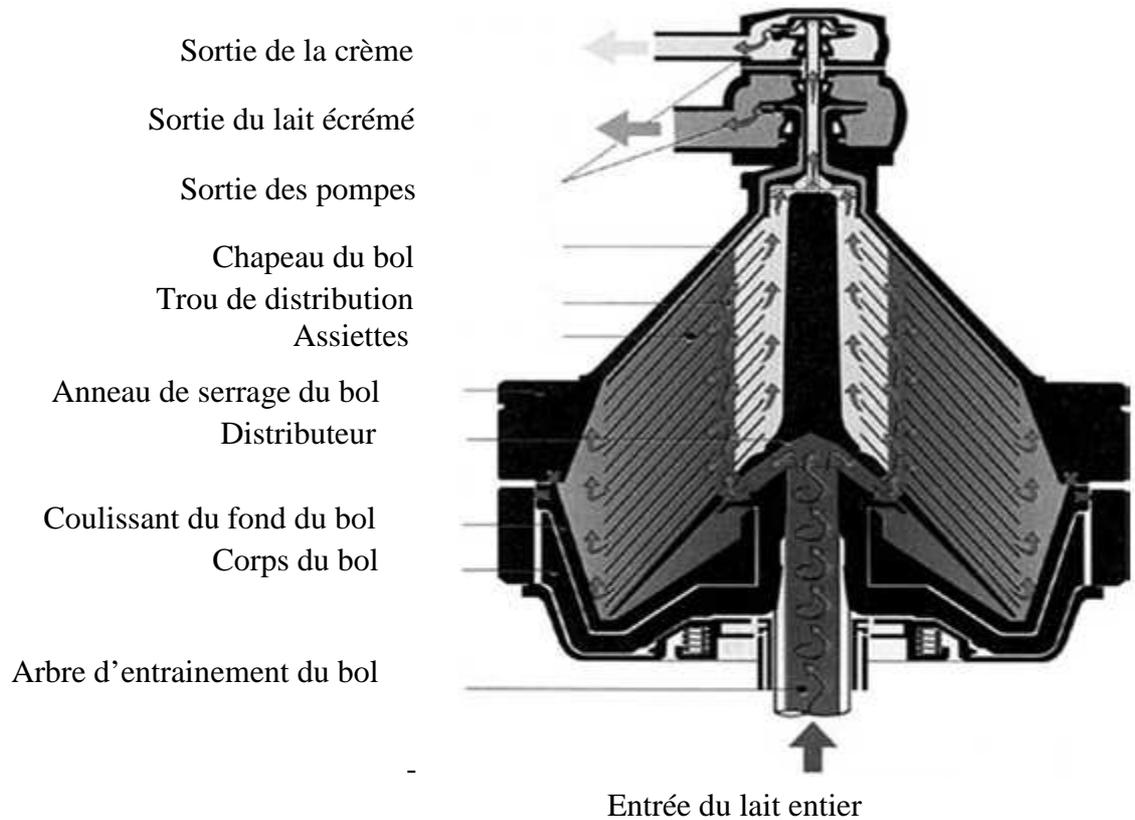


Figure 2. Principe d'une écrémeuse à débouillage automatique (Everett, 2007)

L'écémage centrifuge provoque en même temps une épuration; les impuretés telles que les poils, les poussières et la terre, ainsi que les grosses micelles de caséines et les microorganismes se rassemblent sur les parois du bol où elles forment une boue (Sina, 1992 ; Jeantet *et al.*, 2008). Dans le cas des écrémeuses débouyeuses automatiques, des débouillages en continu permettent d'éliminer ces éléments. Par contre, il est nécessaire de faire des nettoyages fréquents dans le cas des appareils non débouilleurs (Jeantet *et al.*, 2008).

Selon Sina (1992), les conditions de bon écémage sont :

- La température doit être supérieure à 30° C, on peut écémager à la température de pasteurisation. L'écémage est gêné par une température très haute ou trop basse (Alais, 1984) ;
- La vitesse du régime indiquée par le constructeur doit être maintenue rigoureusement constante. Si la vitesse est insuffisante, l'écémage est incomplet ;

- La qualité du lait a une grande influence. Avec un lait sale et de forte acidité, la formation des boues est importante dès le début de l'écémage. L'évacuation peut devenir difficile et l'écémage très imparfait ;
- Un excès de gaz, provenant de brassages exagérés, de prises d'air accidentelles, est une cause de perturbation ;
- Le bol et les tuyauteries doivent être démontés après chaque service et nettoyés parfaitement. Une écémuseuse sale est une cause de contamination importante du lait et de la crème.

La crème ainsi obtenue est liquide et douce puisque sa teneur en acide lactique est encore faible, mais selon qu'on la prélève plus ou moins au centre de l'axe de rotation, elle sera plus ou moins riche en matières grasses (Fredot, 2005).

3.3.2. Pasteurisation

La crème contient plus de bactéries par millimètre que le lait dont elle provient, ces bactéries étant entraînées en grand nombre avec les globules gras lors de l'écémage. De plus, l'efficacité de la pasteurisation diminue avec la richesse en matière grasse (Vignola, 2002).

Mise à part pour les crèmes crues, la pasteurisation consiste en un traitement thermique à haute température qui se fait entre 80 et 90°C pendant 15 à 20 secondes tout en préservant les qualités organoleptiques de la crème (Fredot, 2005). Selon Wilbey (2002) et Fredot (2005), elle provoque ainsi:

- Une destruction des germes pathogènes et de la plupart des germes saprophytes ;
- Une destruction des lipases qui sont des facteurs de rancissement ;
- La formation de composés sulfurés réducteurs qui s'opposent à l'oxydation des lipides ;
- La maîtrise ultérieure de la maturation lactique de la crème.

3.3.3. Maturation

Les crèmes pasteurisées peuvent être maturées en présence de bactéries lactiques mésophiles à savoir *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. Cremoris* et *Lactobacillus acidophilus* (Jeantet *et al.*, 2006 b; Jeantet *et al.*, 2008 ; Hoffmann, 2011), acidifiantes, aromatiques et parfois épaississantes utilisées à 0,5 % (Fredot, 2005 ; Jeantet *et al.*, 2008). La maturation rend la crème, plus aromatique par la transformation du citrate en diacétyle par les *Leuconostoc*, et lui confère une meilleure protection par production d'acide lactique et de bacteriocines (nisine, diplococcine) (Jeantet *et al.*, 2008) .

La phase de maturation se déroule pendant une durée de 12 à 18 heures à une température comprise entre 12 et 22°C (Fredot, 2005 ; Jeantet *et al.*, 2006 b). L'acidification entraîne la déstabilisation progressive des micelles de caséines qui, en association avec les globules gras homogénéisés, conduisent à un épaissement de la crème. Les modifications les plus significatives, dont l'accroissement de la viscosité, apparaissent pour des pH inférieurs à 5 (Jeantet *et al.*, 2006 b).

3.3.4. Refroidissement et conditionnement

Après maturation, la crème est refroidie et conditionnée, puis elle est stockée en chambre froide (6°C) et commercialisée (figure 3) (Fredot, 2005).

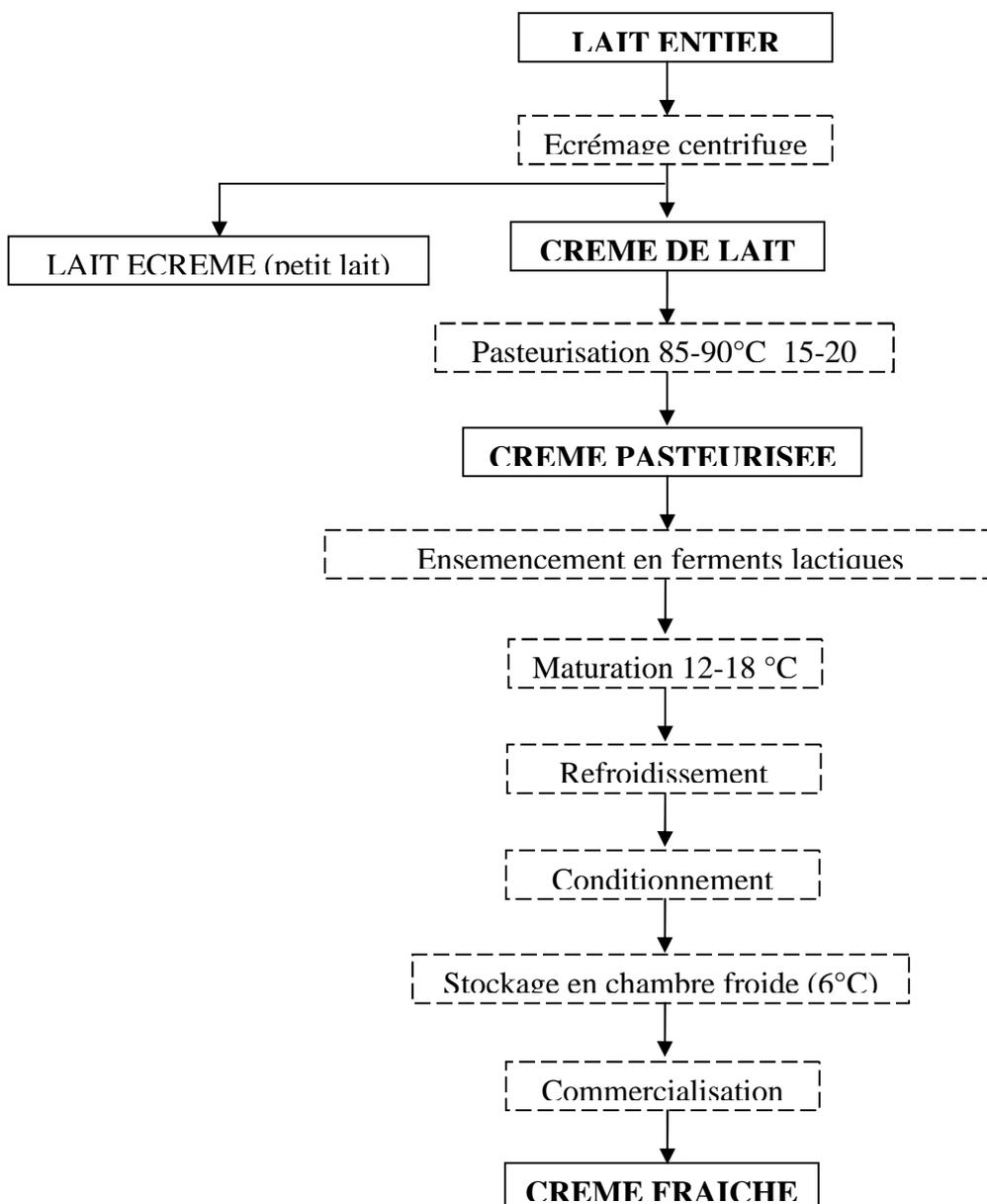


Figure 3. Diagramme de fabrication de la crème fraîche (Fredot, 2005)

3.4. Conservation des différents types de crème

La date limite de consommation des différentes crèmes est variable (tableau 6), selon la charge microbienne qui suit le traitement thermique appliqué et aussi selon l'ajout des ferments lactiques qui jouent un rôle important dans la conservation des produits laitiers.

Tableau 6. Conservation des différents types de la crème (Fredot, 2005)

Type de crème	DLC (après la date de conditionnement)	Stockage (avant ouverture)	Conservation (après ouverture)
Crème crue	7 jours	4-6 °C	4-6 °C Consommation dans les 48 heures
Crème fraîche liquide	15 jours		
Crème fraîche épaisse	30 jours		
Crème stérilisée	3 mois	Endroits frais (≤ 18 °C)	
Crème stérilisée UHT	8 mois		

3.5. Altération de la crème fraîche

La crème fraîche est un produit alimentaire qui renferme plusieurs nutriments tels que les protéines, les glucides, les vitamines liposolubles et surtout la matière grasse en plus de sa teneur élevée en eau (59%), ce qui la rend sujette à différents types d'altérations : microbienne, enzymatique et physicochimique.

3.5.1. Altération microbienne

La crème peut contenir tous les germes rencontrés dans le lait, même elle peut véhiculer les bactéries pathogènes (Guiraud, 2003).

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

Plusieurs types de microorganismes peuvent être des agents de dégradation. Tout d'abord, les bactéries lactiques peuvent entraîner une acidité très forte. Les coliformes et les entérobactéries peuvent entraîner un mauvais goût. Les bactéries lipolytiques détruisent et oxydent la matière grasse, entraînant le rancissement de la crème. Les bactéries protéolytiques peuvent dégrader les caséines. Les germes psychrophiles interviennent aussi en raison du stockage au froid. En fin les levures et les moisissures peuvent provoquer des altérations du goût (moisi, âcre, malté, caramélisé)

(Guiraud, 2003). Certaines espèces de levures comme *Torula cremoris*, *Candida pseudotropicalis* et *Torulopsis sphaerica* peuvent se développer dans la crème fraîche en provoquant l'apparition des odeurs fruitées (Wilbey, 2002 ; Rowe et Donaghy, 2011)

Une altération de la qualité hygiénique de la crème fraîche met en cause la santé du consommateur, cette altération est généralement invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogènes responsables d'intoxication alimentaire de gravité diverse. Ces germes pathogènes libèrent des toxines (exotoxines) qui rendent la crème dangereuse à consommer même si le microorganisme responsable n'est plus vivant dans le produit. Certains microorganismes présentent eux-mêmes un danger pour le consommateur, c'est le cas des entérobactéries qui fabriquent des endotoxines (Bouix et Leveau, 1984).

Les germes les plus souvent évoqués sont les mycobactéries, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, parmi lesquelles les *Escherichia coli* producteurs de toxines et *Salmonella*. D'autres micro-organismes pathogènes peuvent être rencontrés dans le lait et les produits laitiers, parmi lesquels existent *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Coxiella burnetii*, *Streptococcus agalactiae*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, les moisissures productrices de toxines et les virus. La présence et la persistance de ces germes dans les laits et les produits laitiers dépendent de leur résistance au traitement de pasteurisation que peut subir le lait cru et du niveau initial de contamination dans le lait cru (Brisabois *et al.*, 1997).

Une altération de la qualité marchande de la crème modifie ses caractéristiques plastiques et organoleptiques (rancissement, altération du goût), cette altération bien que non dangereuse pour le consommateur, rend la crème non commercialisable. La défaillance de la technologie mise en œuvre pour la stabilité physiologique du produit est la cause principale de cette altération (qui se produit généralement lentement au cours du stockage de la crème) (Bouix et Leveau, 1984).

3.5.2. Altération enzymatique

3.5.2.1. Protéolyse

La protéolyse est une dégradation enzymatique des protéines par les enzymes protéolytiques ou protéases. Ces dernières sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liens peptidiques de protéines et qui produisent des protéoses, des peptones, des peptides ou même des acides aminés selon le degré d'hydrolyse (Vignola, 2002).

Dans le lait et les produits laitiers, la protéolyse a deux origines principales : bactérienne ou native (Haddadi, 2006). Les protéases microbiennes, sont souvent thermorésistantes, sécrétées par les bactéries psychrotrophes (Martin, 2000). La protéolyse induite par ce type de flore provoque une

dégradation des caséines préférentiellement dans l'ordre $\kappa \gg \beta > \alpha$ (Fairbairn et Law, 1986 ; Grieve et Kitchen., 1985 *In* Haddadi, 2006) ; elle n'est significative, que pour des contaminations supérieures à $10^6 - 10^7$ germes/ml (Guinot-Thomas *et al.*, 1995 *In* Haddadi, 2006)

Les deux principales protéases du lait sont le lysosyme et la plasmine. Le lysosyme possède des propriétés antibactériennes et la plasmine joue un rôle important dans le lait, car elle hydrolyse les caséines β , α_1 et α_2 , ce qui libère des peptides de différentes longueurs, cette enzyme est thermorésistante puisqu'il faut des traitements à 70°C pendant 40 minutes ou à 90°C pendant 5 minutes pour la dénaturer à 99%. La présence de plusieurs ponts disulfure dans sa structure explique en partie cette résistance à la chaleur (Vingola, 2000).

L'hydrolyse des caséines conduit à la formation de peptides très courts hydrophobes, qui confèreraient une amertume à la crème (Goursaud, 1985 et Moller, 2000).

3.5.2.2. Lipolyse

La lipolyse est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres (Kuzdzal- Savoie, 1982, Chilliard et Lamberet, 1984 *In* Heuchel *et al.*, 2003).

La lipolyse est due, le plus souvent, à l'action d'enzymes présents dans les produits laitiers eux-mêmes. Ce sont les lipases naturelles du lait qui dégradent la matière grasse. Au stade final de leur action, elles décomposent les glycérides en glycérol et acides gras. La dégradation est souvent partielle avec production des mono et diglycérides intermédiaires. Ces derniers sont responsables de l'amertume décelée dans les produits laitiers. Le défaut « rance » apparaît lorsque des acides gras sont libérés (acide butyrique), lorsque la dégradation est poussée assez loin, le défaut s'amplifie jusqu'à l'apparition du goût de savon. La lipolyse des crèmes se marque par des modifications de la tension superficielle et un certain freinage de l'acidification lactique (Jamotte, 1967).

La lipase naturelle est très instable et hautement sensible à la chaleur, elle est inactivée par un chauffage de 30 mn à 55°C à 75% (Goursaud, 1985).

Les lipases microbiennes, sont secrétées par certaines espèces bactériennes, appartenant à la flore psychrotrophe, en générale, du groupe *Pseudomonas fluorescensputida*. Elle est capable de se développer si la température n'est pas assez bien contrôlée au dessus de 4°C. Ces lipases sont capables d'agir à basse température et sont thermorésistantes contrairement aux germes qui les produisent (Demazeaud, 1997).

D'autres enzymes peuvent intervenir dans la dégradation de la matière grasse laitière notamment les lipases secrétées par les levures et les moisissures (Weber, 1994) et par les cellules leucocytaires, dont le rôle est probablement mineur (Martin, 2000).

3.5.3. Oxydation lipidique

L'oxydation de la matière grasse est probablement la transformation chimique, causant le plus important problème en technologie laitière.

L'oxydation des différents constituants de matière grasse peut entraîner l'apparition de nombreux goûts comme le goût d'oxydé ou métallique. Les phospholipides sont les plus exposés à l'oxydation lipidique vu leur structure chimique et leur situation à la périphérie des globules gras (Vignola, 2002). Les peroxydes ainsi libérés seront dégradés et génèrent des aldéhydes, des hydrocarbures, des cétones ou des acides (Weber, 1994). Par ailleurs, un de goût de suif peut provenir de l'oxydation des triglycérides. L'oxydation de la matière grasse se produit surtout sur les chaînes des acides gras insaturés, et ce en trois étapes. D'abord, il y a formation d'un radical en position α d'une double liaison, c'est-à-dire sur les atomes de carbone adjacents aux atomes de carbone qui forment la double liaison. Ce radical est initié par la lumière ou certains métaux comme le nickel et le fer (Vignola, 2002 ; Jeantet *et al.*, 2006a ; Jeantet *et al.*, 2008). Par la suite, l'oxygène s'ajoute au radical et provoque l'accumulation des hydroperoxydes d'acides gras. Enfin, ces derniers se décomposent en différents produits comme les aldéhydes, les alcools, les cétones et les acides gras libres (Vignola, 2002; Jeantet *et al.*, 2006a).

Les moyens mis en œuvre pour prévenir cette décomposition consistent à protéger le lait et les produits laitiers de la lumière, notamment par l'utilisation des emballages opaques, et contre toute contamination en cuivre et en fer. En outre, les antioxydants naturels comme les tocophérols et l'acide ascorbique sont très efficaces pour prévenir l'oxydation des matières grasses (Vignola, 2002).

Matériel et méthodes

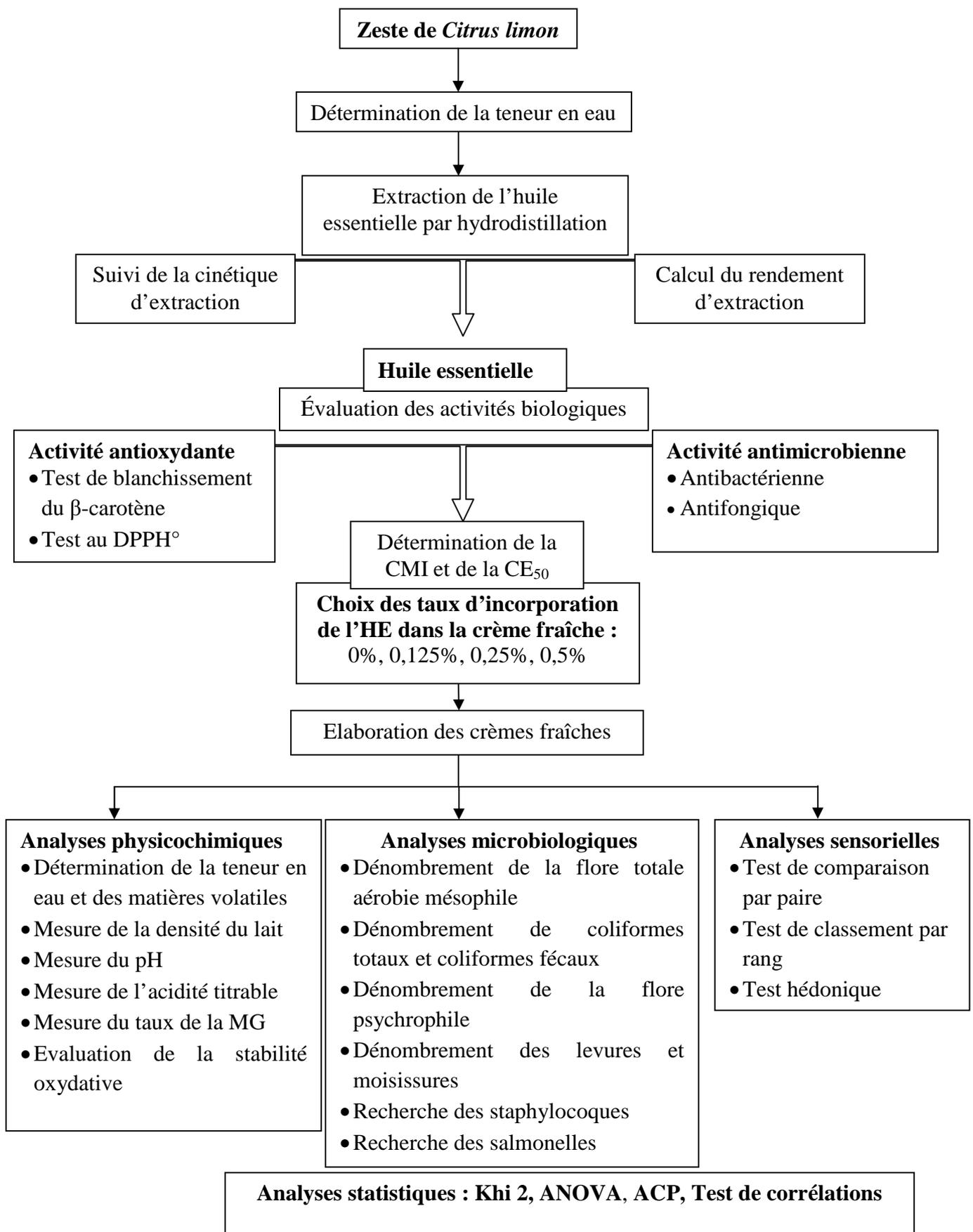


Figure 4. Organigramme de la méthodologie de l'étude

1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée aux laboratoires physicochimiques de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A., U.C.1).

1.1. Matériel végétal

L'huile essentielle testée a été extraite à partir de l'écorce ou zeste du Citron (*Citrus limon*), variété *Eurêka*. Le zeste est la partie du fruit la plus riche en huile essentielle rapport aux autres parties (Robert et Lobstein, 2005).

La récolte du fruit a été effectuée durant les mois avril et mai 2012, provenant d'un verger, situé dans la région d'El-Milia dans la wilaya de Jijel. Les caractéristiques déterminées sur le fruit récolté sont la couleur, la forme qui sont déterminées par une analyse visuelle à l'œil nu, l'épaisseur de l'écorce par un décimètre, le poids du fruit entier ainsi celui de zeste par une balance analytique, enfin la teneur en eau à l'aide d'un humidimètre à 105°C.

Avant l'utilisation du fruit, il doit subir un lavage par l'eau pour éliminer les souillures et les tâches noires qui se trouvent à la surface du fruit, puis un essuyage par un chiffon propre.

1.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée en utilisant un appareil de type Clevenger. Une quantité de 100 g de zeste du citron est introduite dans un erlenmyer à deux cols de 2L rempli d'eau distillée jusqu'aux deux tiers de sa capacité (d'environ 660 ml). L'ensemble est ensuite mis à ébullition pendant une durée déterminée après le suivi de la cinétique d'extraction. L'erlenmyer ainsi chauffé, produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact d'un réfrigérant. Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique, cette dernière constitue l'huile essentielle qui sera traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau (Chanthaphon *et al.*, 2008).

L'huile obtenue est conservée dans un réfrigérateur à une température de 4°C, dans des flacons en verre emballés avec du papier aluminium en vue de son analyse et de son incorporation dans la crème fraîche.

1.3. Suivi de la cinétique d'extraction

Selon Bachelot *et al.* (2006), la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Dans notre étude, le

rendement à été déterminé chaque 15 minutes en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau.

1.4. Calcul du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE}(\%) = \frac{M}{M} \times 100$$

Où : R_{HE} : rendement en huile essentielle ;
 M_1 : masse de l'huile essentielle obtenue en g ;
 M_2 : masse des zestes en g.

2. Evaluation des activités biologiques de l'huile essentielle du *Citrus limon*

2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Les tests de l'activité antioxydante sont effectués au niveau du laboratoire physicochimique de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A., U.C1).

L'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite a été évaluée *in Vitro* par deux méthodes : le test de blanchissement du β -carotène et par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH°.

2.1.1. Test de blanchissement du β -carotène

Le test de blanchissement du β -carotène est réalisé en suivant la méthode décrite par Mayachiew et Devahastin (2008) où 2 mg de β -carotène ont été dissous dans 20 ml de chloroforme. Un volume de 3ml de la solution obtenue a été introduit dans un ballon contenant 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 20. Après évaporation du chloroforme par le rotavapeur à 50°C pendant 5 min, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation. De cette nouvelle solution, 3 ml sont mélangés avec 120 μ l de la solution d'huile essentielle du *C. limon* à une concentration de 0,004g/ml d'éthanol dans un tube à essai.

Dans le contrôle positif, l'huile essentielle est remplacée par l' α - tocophérol (antioxydant naturel lipophile), et dans le contrôle négatif par l'éthanol. Une solution ayant la même composition de cette dernière solution, mais sans β -carotène et sans antioxydant (huile essentielle ou vitamine E) a été employée pour étalonner le spectrophotomètre.

Les tubes ont été placés dans un bain Marie à 50°C et l'oxydation de l'émulsion du β -carotène a été surveillée par spectrophotométrie à 470 nm chaque 20 min pendant 120 min.

- **Expression des résultats**

L'activité antioxydante, exprimée en pourcentage, est calculée par l'équation suivante :

$$AA (\%) = [1 - (A_{E0} - A_{Et}) / (A_{C0} - A_{Ct})] \times 100$$

Où : AA (%) : Activité antioxydante ;

A_{E0} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine E mesurée à t=0 ;

A_{C0} : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=0 ;

A_{Et} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine E mesurée à t=120 mn ;

A_{Ct} : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=120 mn.

2.1.2. Test au DPPH°

Le DPPH° (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH° est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (Gachkar *et al.*, 2007 ; Chaabi ,2008).

Le protocole suivi est celui décrit par Dung *et al.* (2008) et Nikhat *et al.* (2009). Dans des tubes à essai secs, une quantité de 2,9 ml de chaque dilution d'huile essentielle (16 μ g/ml ; 8 μ g/ml ; 4 μ g/ml ; 2 μ g/ml ; 1 μ g/ml ; 0,5 μ g/ml) a été mélangée avec 100 μ l de la solution éthylique au DPPH° de 0,004% (p/v). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Dans le contrôle négatif, les différentes dilutions d'huile essentielle ont été remplacées par 100 μ l d'éthanol et dans le contrôle positif par des dilutions de l' α -tocophérol (16 μ g/ml ; 8 μ g/ml ; 4 μ g/ml ; 2 μ g/ml ; 1 μ g/ml ; 0,5 μ g/ml).

- **Expression des résultats**

Les résultats ont été exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres (DPPH°) en pourcentages (I %) a été calculée par la formule ci-dessous :

$$PR (\%) = \frac{(Ac - Ae)}{Ac} \times 100$$

Où : PR : pouvoir de la réduction en % ;

A_E : absorbance de la solution de DPPH° en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine E ;

A_C : absorbance de la solution de DPPH° en absence de l'huile essentielle et de la vitamine E.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle ou de la vitamine E a été exprimée par la Concentration Efficace (CE_{50}), celle-ci est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel (Nikhat *et al.*, 2009).

Les valeurs CE_{50} moyennes ont été calculées graphiquement à partir de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pouvoir de réduction en pourcentage (Brand-Williams *et al.*, 1995, Portes, 2008).

2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests de l'activité antibactérienne sont réalisés au niveau du service de microbiologie de l'établissement public hospitalier d'El-Milia, Jijel.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée a été réalisée par deux méthodes : la méthode des aromagrammes et la méthode de dilution d'agar. Dans cette partie, nous avons testé six souches microbiennes, deux souches bactériennes et quatre souches levuriennes.

2.2.1. Micro-organismes testés

Deux bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ont été testées. Ces deux souches sont des bactéries à Gram négatif, pathogènes et contaminant le plus souvent la crème fraîche. Elles nous ont été fournies par l'établissement public hospitalisé d'El-Milia, Jijel. La souche *Pseudomonas* spp peut hydrolyser la matière grasse et causer le rancissement de la crème fraîche (Rowe et Donaghy, 2011). Par manque de souches de levure de référence, nous avons procédé à l'isolement et à l'identification de quelques souches à partir de la crème fraîche contaminée.

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne afin que nous puissions fixer des concentrations minimales inhibitrices ou seuils de l'huile essentielle à incorporer à la crème fraîche.

2.2.2. Isolement et identification de levures à partir de la crème fraîche contaminée

L'isolement des levures à partir de la crème fraîche contaminée est effectué au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LamyBAM) de l'U.C1.

L'identification des levures isolées et les tests de l'activité antifongique sont effectués au niveau du laboratoire microbiologique de l'I.N.A.T.A.A., U.C1.

- **Isolement**

L'isolement des levures a été effectué en suivant le protocole du Lopandic *et al.* (2006). Une quantité de 10 gramme de crème fraîche est homogénéisée dans 90 ml de solution du citrate de sodium à 2% stérile. Une série de dilution est préparée jusqu'à 10^{-6} . Chaque dilution est étalée à la surface du milieu gélosé Oxytétracycline Glucose Agar (OGA) (Guiraud, 2003), en présence de l'antibiotique oxytétracycline à 1 mg/ml dont le rôle est d'inhiber la croissance de bactéries Gram positif et Gram négatif. L'ensemencement a été fait en surface, par étalement de 0,1 ml de culture en stries transversales. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C, pendant 24 à 72 h.

Après incubation de ces boîtes, les souches de levures ont été purifiées par des repiquages successifs. Les cultures sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations.

- **Identification**

- **Etude des caractères cultureux**

Les caractères cultureux ont été étudiés en milieu liquide (YPG) et milieu OGA. Les cultures ont été incubées pendant 3 jours 28°C, examinées puis laissées 4 semaines à la température du laboratoire et réexaminées. Les caractères cultureux étudiés ont été la forme des colonies, la coupe des colonies, l'aspect de la culture sur milieu liquide et la couleur (Guiraud, 2003).

- **Etude des caractères morphologiques**

La morphologie cellulaire normale et le mode de reproduction végétative sont deux caractères étudiés par des examens microscopiques. Cette étude microscopique permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de division des cellules. Les examens microscopiques ont lieu à partir des milieux solide et liquide utilisés au bout de deux à trois jours. Les préparations microscopiques utilisées sont l'état frais et la coloration au bleu de méthylène (Guiraud, 2003).

Pour observer l'aptitude à la filamentation, une culture de levures est ensemencée en une strie longitudinale, sur une lame stérile préalablement coulée par le milieu PDA.

La lame est mise dans la boîte de pétri, contenant un peu d'eau stérile, pour éviter la dessiccation du milieu et incubée à 30°C. L'observation microscopique se fait après 2 à 5 jours (au grossissement x 40 ou x 100) (Guiraud, 2003).

- Fermentation des sucres

Les sucres testés sont le D- glucose, le maltose, le D-fructose, le saccharose, le lactose, le D-galactose. La solution de base utilisée pour la fermentation des sucres, est le milieu eau de levure (extrait de levure à 0.5% dans l'eau), conditionné avec une cloche de Durham. Avant ensemencement, des solutions stériles des sucres à tester sont ajoutées dans ces tubes, de sorte que la concentration finale soit de 2%. Les tubes sontensemencés avec une goutte d'une suspension de levure. Les cultures sont incubées à 25-28°C, pendant 48 heures à 3 semaines. Un sucre est fermenté, quand il y a présence de gaz dans la cloche (Wickerham et Burton, 1948 et Wickerham, 1951 in Merabti, 2006).

2.2.3. Préparation des suspensions microbiennes et des disques

2.2.3.1. Suspension bactérienne

Les bactéries à tester sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Hektoen et incubées pendant 24 heures. A partir d'une culture jeune de 18 h, et à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9% de NaCl. La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

La lecture de la transmittance est effectuée par un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620 nm. La transmittance doit être entre 22% et 32%, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml (Hazzit, 2008).

2.2.3.2. Suspension levurienne

La préparation de l'inoculum pour les levures est la même que celle des bactéries sauf que, pour les levures, la culture doit être jeune de 48h sur le milieu OGA (Guiraud 2003) et la transmittance doit être entre 2% et 3%, ce qui correspond toujours à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml. L'inoculum doit être utilisé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation (Hazzit, 2008).

2.2.3.3. Disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N°40 par un perforateur à 2 trous du papier, avec un diamètre de 6mm. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante.

2.3. Méthode de diffusion ou des aromagrammes

La méthode des aromagrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose, de 6 mm de diamètre et imprégné de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (mm ou cm) de la zone claire autour du disque (halo translucide), appelée zone d'inhibition.

Selon Hussain *et al.* (2010), un volume de 20 ml de milieu gélosé (l'agar de Muller Hinton pour les bactéries et de Sabouraud pour les levures) en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification des milieux de culture, 100 µl de la suspension microbienne à tester sont étalés en surface.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques stériles, imbibés avec 5 µl d'huile essentielle de *Citrus limon*, sont déposés sur la surface de la gélose. Les boîtes de pétri sont maintenues à 4°C pendant une heure pour que l'huile essentielle puisse diffuser (Rožman et Jeršek, 2009).

L'incubation s'effectue à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et 25 °C pendant 48 heures pour les levures.

- **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition, mesuré à l'aide d'une règle en (mm) (y compris le diamètre de disque de 6mm). D'après Meena et Sethi (1994) et Ela *et al.* (1996) la sensibilité à l'huile essentielle a été classée en fonction des diamètres des halos d'inhibition comme suit :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm ;
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

2.4. Méthode de dilution d'agar

Selon Hammer *et al.* (1999), un volume de 20 ml d'Agar Muller Hinton fondu et additionné de 0.5% (v/v) tween 20 ont été mis dans des tubes à essai en leur rajoutant, aseptiquement (200 ; 400 ; 800 ; 1600 µl) de l'huile essentielle pour obtenir les concentrations suivantes (1% ; 2% ; 4% ; 8%), et la même quantité de Sabouraud additionnée de 0.5% (v/v) tween 20 ont été mis dans des tubes à essai en leur rajoutant (25 µl; 50 µl ; 100 µl ; 200 µl ; 400 µl ; 800 µl) pour obtenir les

concentrations en huile essentielle suivantes (0,125% ; 0,25% ; 0,5% ; 1% ; 2% ; 4%). Ces deux gammes de dilutions sont préparées en basant sur des essais préliminaires.

Les milieux de culture avec les différentes dilutions de l'huile essentielle et le tween 20 sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 35°C pendant 30 minutes.

Les boîtes coulées avec le milieu Mueller Hinton sont partagées en deux parties dans lesquelles nous avons mis les deux souches bactériennes sous forme de dépôts de 1µL contenant 10⁷ germes/ml. Les boîtes coulées avec le milieu Sabouraud sont partagées en quatre parties dans lesquelles nous avons mis les quatre souches de levures à concentration identique que celle des bactéries (1µl).

Le Mueller Hinton et Sabouraud avec 0,5% (v/v) de Tween-20 et sans huile essentielle, ont été utilisés comme contrôles positifs.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28°C pendant 48 heures pour les levures.

- **Expression des résultats**

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après la période d'incubation à 37°C et à 28°C. La présence de deux colonies ou moins est à négliger (Hammer *et al.*, 1999).

3. Incorporation de l'huile essentielle dans la crème fraîche

L'ensemble des travaux de cette partie est effectué dans l'atelier de la crème fraîche et aux laboratoires de physicochimie et de microbiologie de la laiterie SARL Safilait. Le test de stabilité oxydative et les séances des analyses sensorielles ont été réalisées au niveau du laboratoire de physicochimie de l'I.N.A.T.A.A., UC.1.

3.1. Fabrication des crèmes fraîches incorporées de l'huile essentielle du *Citrus limon*

Le procédé de fabrication des crèmes fraîches élaborées est illustré dans la figure 5. L'ajout de l'huile essentielle stérile est effectué au niveau du laboratoire microbiologique dans des conditions stériles. Le prélèvement de la crème fraîche est effectué après l'étape de pasteurisation dans des conditions aseptiques. Le conditionnement est réalisé manuellement dans des flacons stériles de 50ml, emballés avec du papier aluminium.

L'huile essentielle ajoutée a été stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre stérile de 0,22 µm (MILLIPORE MILLEX GS) (Annexe 1).

Les trois doses incorporées dans la crème fraîche sont fixées à partir des résultats des tests des activités biologiques et des analyses sensorielles préliminaires: 0,125% ; 0,25% ; 0,5%.

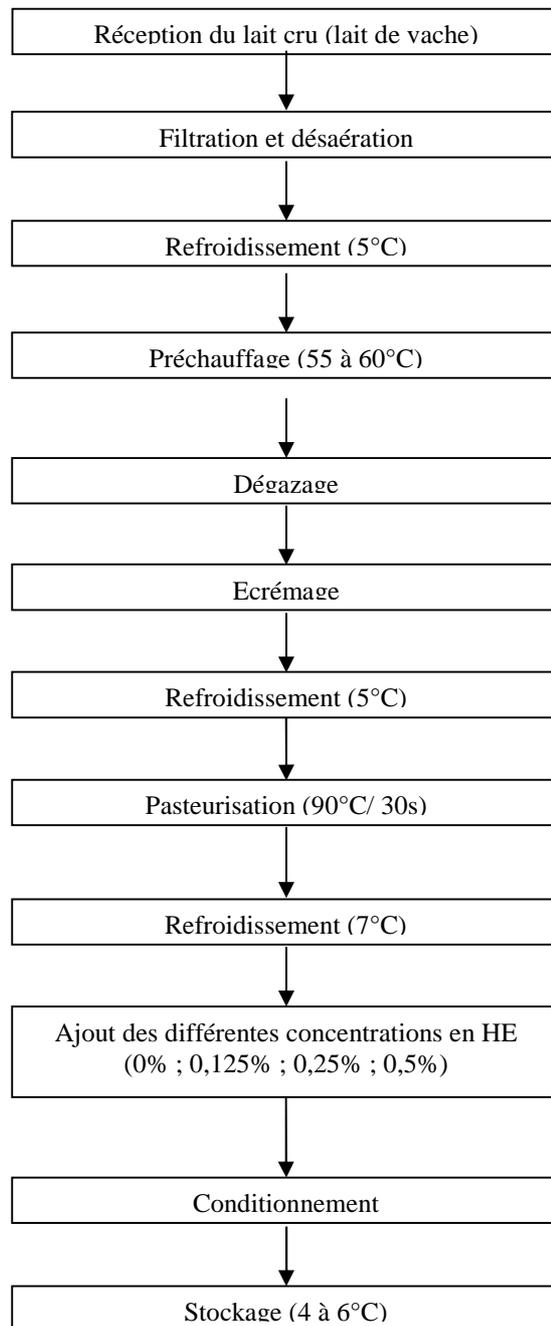


Figure 5. Principales étapes de fabrication des crèmes fraîches

3.2. Prélèvement d'échantillon

Des prélèvements à partir des échantillons de lait cru, de crème avant pasteurisation, des crèmes et des crèmes fraîches élaborées ont été effectués tous les deux jours à partir du premier jour d'ouverture et de fabrication jusqu'au jour de leur altération.

Les flacons stériles sont stockés par la suite dans un réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'à analyse.

Des prélèvements à partir des crèmes fraîches élaborées ont été effectués chaque 2 jour dès le premier jour de production après son ouverture jusqu'à leur altération microbiologique.

3.3. Analyses physico-chimiques

3.3.1. Teneur en eau et en matières volatiles

La détermination de l'extrait sec a été réalisée par un dessiccateur MAC110/NH, son principe repose sur l'élimination de l'eau totale à une température de 125°C pendant 25 minutes.

Une prise d'essai de 3g a été étalée sur toute la surface d'une capsule en verre préalablement tarée, puis introduite dans le dessiccateur et l'analyse est lancée. La valeur de l'extrait sec en pourcentage (%) est lue directement sur l'afficheur numérique après le bip sonore.

3.3.2. Densité du lait

Dans une éprouvette, un volume du lait a été versé lentement en évitant la formation de mousse; puis le thermo-lacto-densimètre a été plongé dans l'éprouvette et après stabilisation de celui-ci, la lecture de la densité et de la température a été effectuée.

La densité est ramenée à 20°C par la formule suivante (Labioui *et al.*, 2009):

$$\text{Densité corrigée} = \text{densité lue} + 0,2 (\text{température du lait} < 20^\circ\text{C}).$$

3.3.3. pH

La mesure du pH a été réalisée avec un pH-mètre en introduisant directement les deux sondes (pH et température) dans les échantillons (lait et crèmes fraîches élaborées) à une température de 20 à 25°C.

3.3.4. Acidité titrable

Neutralisation de l'acide lactique d'un produit laitier par une solution de NaOH à N/9 en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine).

Un volume de 10 ml de lait a été introduit dans un bécher, 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées, le mélange est homogénéisé, dans le cas de la crème fraîche les 10 ml ont été dilués dans 10 ml d'eau distillée.

A partir d'une burette réglée à 0, le dosage de l'échantillon par la soude jusqu'au virage au rose a été effectué. La coloration rose doit persister au moins 10 secondes. La lecture du volume de la solution titrante utilisée est lue directement sur la burette.

- **Expression des résultats**

L'acidité du lait et des crèmes fraîches élaborées est exprimée en degré Dornic (°D), le degré Dornic (°D) correspond au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaire pour assurer le virage de la phénolphtaléine (Guiraud, 2003).

L'acidité est donnée par la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = V \times 10$$

V : le volume en ml de NaOH de la chute lue.

1°D= 0,1g d'acide lactique.

3.3.5. Teneur en matière grasse

La matière grasse du lait et des crèmes élaborées est déterminée par la méthode de Gerber ou méthode acidobutyrométrique décrite par AFNOR (1980).

La matière grasse a été séparée par centrifugation au butyromètre, après dissolution des protéines par l'addition d'acide sulfurique. La séparation de la matière grasse a été favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool isoamylique. La teneur en matière grasse a été lue directement sur l'échelle du butyromètre.

Un volume de 5ml de l'échantillon a été introduit dans un butyromètre (dans le cas de la crème fraîche 10ml d'eau distillée ont été ajoutés), 10 ml d'acide sulfurique et 1ml d'alcool isoamylique ont été additionnées. Le butyromètre a été fermé à l'aide d'un bouchon, agité avec précaution jusqu'à disparition des grumeaux, puis introduit dans une centrifugeuse pendant 5 minutes à une vitesse de 1200 tours/min à 65°C.

- **Expression des résultats**

La teneur en matière grasse exprimée en pourcentage a été lue sur l'échelle graduée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en matière grasse (\%)} = X_1 - X_0$$

X_0 = graduation atteinte par le niveau inférieur du butyromètre;

X_1 = graduation atteinte par le niveau supérieur du butyromètre.

3.4. Analyses statistiques

Les résultats de l'activité antioxydante ont été traités par le test du Khi 2 et des analyses physicochimiques par l'analyse de variance (ANOVA) à l'aide d'un logiciel statistique XLSTAT (2009) pour déterminer la signification des différences des paramètres au seuil de signification de 0,05.

3.5. Analyses microbiologiques

Selon l'arrêté interministériel du 27/05/1998, les germes recherchés et dénombrés dans le lait et la crème fraîche sont : la flore totale aérobie mésophile (FTAM) à 30°C ; les Coliformes totaux ; les Coliformes fécaux ; les Salmonelles ; *Staphylococcus aureus* ; la flore psychrophile et les levures et les moisissures.

3.5.1. Préparation des solutions mères et des dilutions décimales

Pour chaque prélèvement 10 ml de produit à analyser a été introduit dans un flacon contenant 90 ml d'eau physiologique, ainsi la solution mère qui correspond à la dilution 10^{-1} a été obtenue, à partir de laquelle des dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} ont été préparées, où 1ml de la dilution 10^{1-n} a été introduit dans un tube à assai contenant 9 ml de l'eau physiologique pour obtenir la dilution 10^{-n} (Guiraud, 2003).

3.5.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

Les microorganismes aérobies et aéro-anaérobies facultatifs peuvent se développer dans un milieu nutritif non sélectif, incubés à 30°C pendant 72 h. Ils apparaissent sous formes de colonies de tailles

Un volume de 1ml de solution mère et de chaque dilution a été introduit dans des boîtes de pétri vides, sur lesquelles le milieu gélose nutritif a été ajouté. L'ensemble a été mélangé avec précaution par rotation en forme de huit et laissé se solidifier. L'incubation a été effectuée à 30 °C pendant 72 heures.

Après 72 heures, les colonies développées quel que soit leur taille ont été comptées à l'aide d'un marqueur.

3.5.3. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux

Le principe consiste à compter les colonies caractéristiques des coliformes totaux qui se développent en 24 h à 37°C et les coliformes fécaux qui se développent en 24 h à 44°C, sur la gélose Mac Concky puis à confirmer le nombre de colonies par fermentation du lactose, il s'agit d'un dénombrement de coliformes (NF ISO 4832).

Dans deux séries des boîtes de pétri, transférer 1 ml d'échantillon à examiner et verser rapidement 10 à 15 ml de milieu gélose en surfusion. Puis mélanger avec précaution par rotation lente en forme de huit et laisser les boîtes se solidifier.

La première série a été incubée à une température de 37°C pendant 24/48 heures pour la recherche de coliformes totaux et la deuxième série est incubée à 44°C pendant 24 heures pour la recherche de coliformes fécaux.

Après incubation, compter les colonies rouges violets, ayant un diamètre d'au moins de 0,5 mm. Le nombre de bactéries coliformes par gramme est donné par la formule suivante ;

$$N = C \cdot \frac{1}{d}$$

C : nombre de colonies ;

d : facteur de dilution.

3.5.4. Dénombrement des levures et des moisissures

L'isolement des levures et des moisissures nécessite des milieux sélectifs contenant des substances antibactériennes (Guiraud, 2003). Le milieu OGA est le milieu le plus utilisé, auquel un antibiotique est ajouté afin d'inhiber tout développement bactérien.

La gélose OGA préalablement fondue et refroidie a été répartie dans des boîtes de pétri vides. De l'oxytétracycline (1mg/ml) lui a été ajoutée et l'ensemble est homogénéisé. Après solidification, 0,1 ml de la dilution 10^{-1} ml a été ensemencé en surface. L'incubation a été faite à une température de 25°C pendant 3 à 5 jours.

Les levures et les moisissures sont de formes, de couleur, d'aspect et de taille variables (Sina, 1992).

3.5.5. Recherche des staphylocoques

Ensemencement de la solution mère en surface d'un milieu sélectif (Chapman) à une température de 37°C pendant 24 heures.

Un volume de 0,1 ml de la solution mère de l'échantillon a été ensemencé à la surface des boîtes pétri coulées par le milieu Chapman. L'incubation a été faite à une température de 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

Les *Staphylococcus aureus* sont de couleur jaune, entourés d'un halot claire. Les staphylocoques non pathogènes se caractérisent par des colonies transparentes et visqueuses.

3.5.6. Recherche des salmonelles

La recherche des salmonelles se fait en suivant trois étapes qui sont : le pré-enrichissement, l'enrichissement et l'isolement sur un milieu sélectif.

- **Pré-enrichissement**

Le pré-enrichissement s'effectue en bouillon de sélénite, l'intérêt de cette étape pour la plupart des produits analysés. Elle permet la récupération des bactéries stressées (Geldel, 1996).

Une quantité de 25 g du produit ont été prélevés et additionnés avec 225 ml d'eau peptonée puis mélangés jusqu'à dissolution complète du produit. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

- **Enrichissement**

Un volume de 1ml de la solution de pré-enrichissement de chaque produit a été introduit dans des tubes à essai contenant 10ml de sélénite cystéine. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures

- **Isolement sur gélose *Salmonelle- Schigella* ou milieu (SS)**

Un volume de 0,1ml de contenant des tubes positifs a étéensemencé à la surface des boites de pétri préalablement coulées par le milieu SS. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

Les salmonelles se présentent sous formes des colonies translucides avec un centre noir.

3.6. Evaluation de la stabilité oxydative des crèmes fraîches élaborées

***Test de Schaal**

Le test de Schaal implique un chauffage à l'air de 50-100 g des lipides placés dans des capsules ouvertes à une température donnée (50-100°C), jusqu'à l'apparition des flaveurs d'oxydation qui sont déterminées à des intervalles réguliers par voie analytique (indice de peroxyde ou test de thiobarbiturique) (Collomb et Spahni, 1996).

Une quantité de 50 g du produit (crèmes fraîche) ont été introduits dans un bécher de 100 ml, puis placés dans l'étuve à une température de 63°C pendant 8 jours. Des prélèvements ont été effectués chaque deux jours (chaque 48heures) pour déterminer l'oxydation des lipides par la méthode de l'acide thiobarbiturique (Bandyopadhyay *et al.*, 2008).

*Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Cette méthode permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma et les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde (MDA), un des produits majeurs de dégradation des lipides (Botsoglou *et al.*, 1994). Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner des pigments de coloration rouge mesuré à une longueur d'onde de 532 -535 nm.

20 ml de l'acide trichloroacétique (TCA) à 20 % (p/v, pH : 3,5) a été ajouté à une quantité de 20 g de crème fraîche, quantité nécessaire à l'extraction du MDA du produit oxydé. Le mélange a été centrifugé à 4000 tours/mn pendant 15 mn. Un volume de 2ml de la solution de TBA à 20 mM a été ajouté à 2ml du sous-nageant obtenu (le MDA extrait) avec une agitation pendant 5 secondes dans un vortex.

Le mélange a été placé ainsi dans un bain marie réglé à 95°C pendant 10 minutes pour favoriser la réaction TBA et MDA; cette réaction nécessite un milieu acide et à chaud. Après refroidissement du mélange, un volume de 5 ml de butan-1-ol a été ajouté avec agitation pendant 5 minutes.

La phase supérieure à butan-1-ol obtenue, après Centrifugation à 1500 trs / mn pendant 10mn, a servi à la mesure de l'absorbance à 532nm (Djenane *et al.*, 2011).

• Expression des résultats

La quantité de TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) a été calculée sur la base de coefficient d'extinction molaire $\varepsilon = 155\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en utilisant l'équation suivante (Draper et Hadley, 1990) :

$$\text{mg équivalent MDA/Kg} = (A_{\text{corrigée}} \cdot V_{\text{TCA}} \cdot 2 \cdot M \cdot 10^{-1}) / 1,66 \text{ m}$$

Soit, V_{TC} : volume de solvant d'extraction

m: masse de l'échantillon analysé (g)

M : Masse moléculaire de MDA = 72 g/mol

3.7. Analyses sensorielles

Les tests utilisés couramment dans les laboratoires pour l'analyse sensorielle des produits alimentaires comprennent l'étude de la différence, du classement par rang de l'intensité, de l'attribution des cotes d'intensité et les analyses descriptives (watts *et al.*, 1991). Les tests appliqués sur nos produits sont le test de comparaison par paire, le test de classement par rang et le test hédonique.

- **Panel**

Le panel est constitué de 10 sujets de sexes masculin et féminin ; enseignants, étudiants en graduation et en post-graduation de l'Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro Alimentaire de l'Université Constantine1.

Il leur est montré la façon dont les bulletins seront remplis, en se servant de bulletins agrandis projetés sur un écran. Nous avons évité de discuter de l'aliment qui sera soumis aux essais, en expliquant la méthode et les protocoles d'analyses utilisées, pour réduire la confusion et rendre la tâche plus facile aux dégustateurs. Il est important qu'ils comprennent bien les procédures utilisées et la façon de remplir les bulletins afin de participer aux essais sur la même base. Il faut recommander aux dégustateurs d'éviter l'utilisation de produits à l'odeur prononcée, comme les savons, les lotions et les parfums avant de participer à un panel et d'éviter de manger, de boire ou de fumer au moins 30 minutes avant de procéder aux essais.

3.7.1. Test de comparaison par paire

Le test de comparaison par paire est utilisé afin de déterminer la direction des différences entre deux échantillons pour la propriété déterminée « l'arôme » et afin de voir s'il y a une différence entre deux échantillons pour essai (NF V 09-012, 1983).

Le principe es la présentation aux sujets d'une paire d'échantillons, l'un de ces échantillons pouvant être le témoin (NF V 09-012, 1983).

Six paires d'échantillons (AB ; AC ; AD ; BC ; BD ; CD) ont été préparées. Les échantillons de chaque paire ont été présentés aux dégustateurs dans des gobelets contenant la même quantité de produit et codés par des cotes constituées par trois chiffres. Il est demandé aux examinateurs de remplir le bulletin préalablement établi (annexe 2) et de se rincer la bouche entre chaque paire lors de la dégustation.

- **Analyses des données**

Le nombre des réponses allant dans le sens prévu est totalisé, en se référant à la table de Roessler, Baker et Amerine pour analyser la signification des résultats (annexe 3).

3.7.2. Test de classement par rang

Ce test a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. L'acceptation d'un produit alimentaire indique en général la consommation réelle de ce produit.

Présenter un ensemble d'échantillons et demander aux dégustateurs de classer par rang ces échantillons codés en fonction de l'acceptation en allant du moins acceptable au plus acceptable.

Une série de quatre échantillons (les crèmes fraîches élaborées) a été préparée pour chaque dégustateur, dans des gobelets codés. Tous les échantillons ont été présentés simultanément à chaque dégustateur dans un ordre au hasard, et ils ont eu le droit de goûter plusieurs fois les échantillons (annexe 4).

- **Analyse des données**

Afin d'analyser les données, les classements attribués à chaque échantillon ont été totalisés. La détermination de la signification des différences a été procédée en comparant les totaux des classements pour toutes les paires possibles des échantillons en se servant du test de Friedman. Les différences entre toutes les paires possibles des classements totalisés sont comparées à la valeur critique du tableau donné dans l'annexe 5, pour un niveau de signification de 5 %.

3.7.3. Test hédonique

Ce test a été retenu pour évaluer d'une façon générale le degré d'appréciation des échantillons de crème fraîche en réalisant des profils sensoriels pour chaque produit.

Demander aux dégustateurs d'évaluer des échantillons codés de plusieurs produits en indiquant leur degré d'appréciation sur une échelle à 9 niveaux, afin de réaliser des profils sensoriels.

Les quatre crèmes fraîches élaborées ont été présentées simultanément dans des gobelets identiques codés. Il est demandé aux dégustateurs de remplir les bulletins (annexe 6) en se basant sur l'analyse de la texture, de la couleur, de l'odeur, du goût et de l'arôme des produits.

- **Analyse des données**

Les résultats ont été traités par deux analyses indépendantes à l'aide d'un logiciel statistique XLSTAT (2009). La première analyse est une analyse de la variance (ANOVA) permettant de déterminer la signification entre les crèmes fraîches élaborées. La deuxième analyse est une analyse en composantes principales (ACP) permettant de réduire un système complexe de corrélations en un plus petit nombre de dimensions dont le but est de visualiser la corrélation entre le taux d'incorporation en HE et les paramètres physicochimiques d'une part et les caractéristiques sensoriels d'autre part.

Résultats et discussion

1. Extraction des huiles essentielles

1.1. Caractéristiques du fruit du citron utilisé

Le fruit utilisé dans cette étude est de couleur jaune, de forme ovale avec un appendice au pédoncule (annexe 7) et de poids moyen de 210 ± 3 g. L'écorce a une épaisseur de 2 mm et représente un pourcentage pondéral de $14,8 \pm 0,8$ %. Son taux d'humidité est de l'ordre de $78,67 \pm 1,15$ %.

1.2. Cinétique d'extraction

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction montrent que cette dernière passe par deux phases importantes (figure 6). La première phase correspond à l'augmentation du rendement d'extraction en huile essentielle, de $0,22 \pm 0,11$ % à $0,83 \pm 0,08$ % suite à l'éclatement intense des poches schizolysigènes. Cette augmentation s'observe dans l'intervalle de temps de 15 à 105 minutes. La deuxième phase s'observe au-delà de 120 minutes et se caractérise par un palier où le rendement d'extraction a atteint un taux constant de $0,89 \pm 0,09$ %. Cette stagnation pourrait s'expliquer par l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Himed (2011) où la durée d'extraction observée a été de 120 min. A l'issue de ce suivi, la durée d'extraction de cette huile a été fixée à 120 mn.

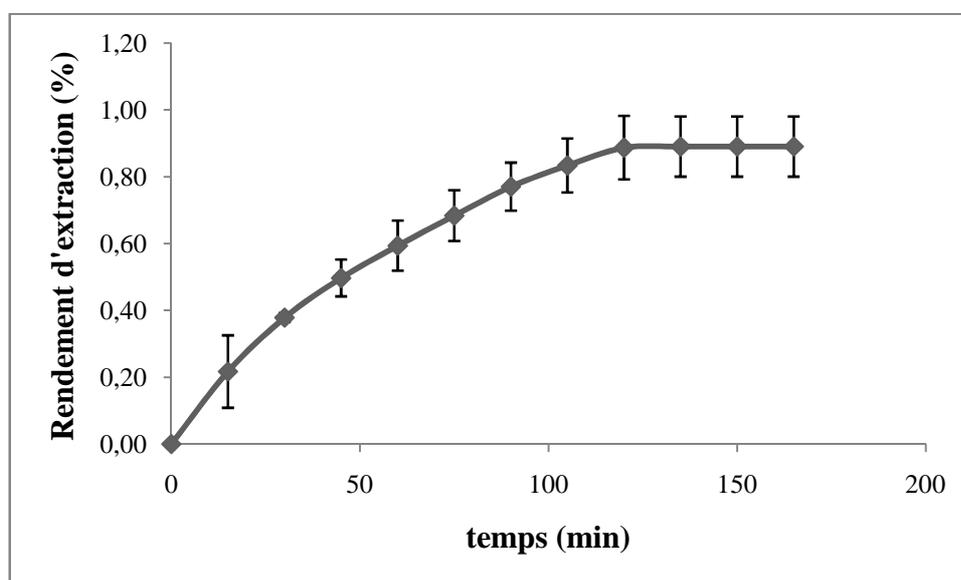


Figure 6. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *Citrus limon*

1.3. Rendement d'extraction

Le rendement moyen en huile essentielle obtenu par hydrodistillation est de l'ordre de $0,89 \pm 0,09$ %, ce rendement est supérieur aux rendements obtenus par Blanco Tirado *et al.* (1995) et Hellal (2011) qui valent respectivement 0,19% et 0,70 %, mais il est inférieur aux rendements obtenus par Ahmad *et al.* (2006), Bourgou *et al.* (2012) et par Himed (2011) qui sont respectivement de l'ordre

de 1,12%, 1,30% et 2,18%. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet variétal, la période de récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur) et la méthode d'extraction employée. (Bourgou *et al.*, 2012).

Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. Bourgou *et al.* (2012) ont constaté que le rendement en HE du citron augmente au début puis diminue vers la fin de la maturation.

La région géographique apparaît aussi comme un facteur influençant le rendement en HE. Nous rappelons que le citron utilisé dans la présente étude est collecté de la région de Jijel, celui de Himed (2011) de la région de Constantine et celui de Bourgou *et al.* (2012) de la région de Menzel Bouzelfa (Tunisie). Il est évident que ces régions se caractérisent par des climats différents.

Le taux d'humidité peut avoir une influence sur le rendement d'extraction des huiles essentielles, sachant que le fruit du citron utilisé dans cette étude a un taux d'humidité de $87,67 \pm 1,15$ %, ce qui a donné un rendement inférieur à celui obtenu par Himed (2011) dont le taux d'humidité était de $67,7 \pm 1,15$ %.

D'après Himed (2011), le mode d'extraction a un impact sur le rendement d'extraction des huiles essentielles. Le même auteur a constaté que, en utilisant la même variété de citron, le rendement obtenu par hydrodistillation est nettement supérieur à celui obtenu par expression à froid.

2. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles du *Citrus limon*

2.1. Evaluation de l'activité antioxydante

2.1.1. Test de blanchissement du β -carotène

La figure 7 montre que l'HE ainsi que le β -carotène présentent une activité antioxydante par comparaison au contrôle négatif (éthanol). Le changement des valeurs de l'absorbance du β -carotène, à différents intervalles de temps, a montré que l'HE du citron semble être le meilleur inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique par rapport à la vitamine E. En parallèle, il y'a une oxydation du β -carotène traduite par une décoloration plus intense en présence de la vitamine E, tandis qu'elle est moindre en présence de l'huile essentielle.

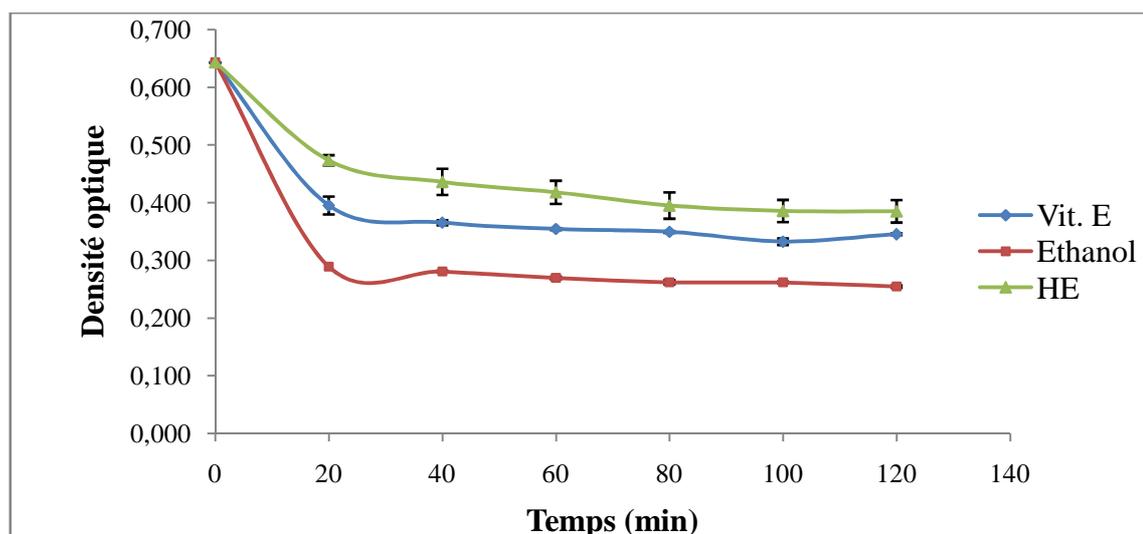


Figure 7. Cinétique de blanchiment du β -carotène pour l'huile essentielle de citron, la vitamine E et le contrôle négatif

D'après les résultats de la figure 8, nous constatons que l'HE de citron (à une concentration de 4000 $\mu\text{g/ml}$) inhibe d'une manière significative ($p \leq 0,05$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β - carotène, avec une activité antioxydante de $33,57 \pm 4,9 \%$, par rapport à celle de la vitamine E qui équivaut à $23,38 \pm 0,3\%$.

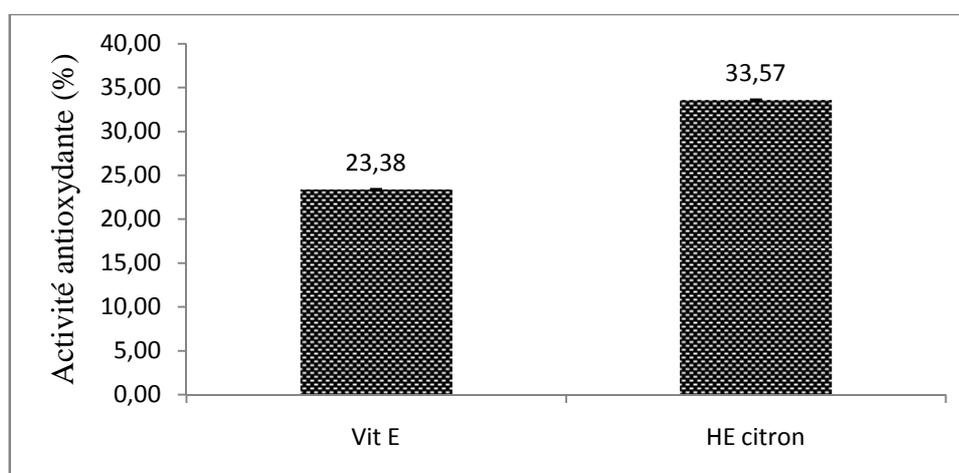


Figure 8. Activité antioxydante de l'huile essentielle de citron et de la vitamine E à une concentration de 4000 $\mu\text{g/ml}$

2.1.2. Test au DPPH°

Les résultats obtenus (figure 9), exprimés en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (CE_{50}), ont montré que l'HE de citron possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH° plus important par rapport à la vitamine E. Le test de Khi 2 nous a permis de constater une différence significative ($p < 0,05$) entre les CE_{50} de l'HE ($\text{CE}_{50} = 5,5 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$) et celle de la vitamine E ($\text{CE}_{50} = 12,90 \pm 2,77 \mu\text{g/ml}$).

Dans cette étude, l'HE et la vitamine E ont réduit le radical DPPH° en donnant des atomes d'hydrogène ce qui a conféré la couleur jaune au produit obtenu qui est le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine.

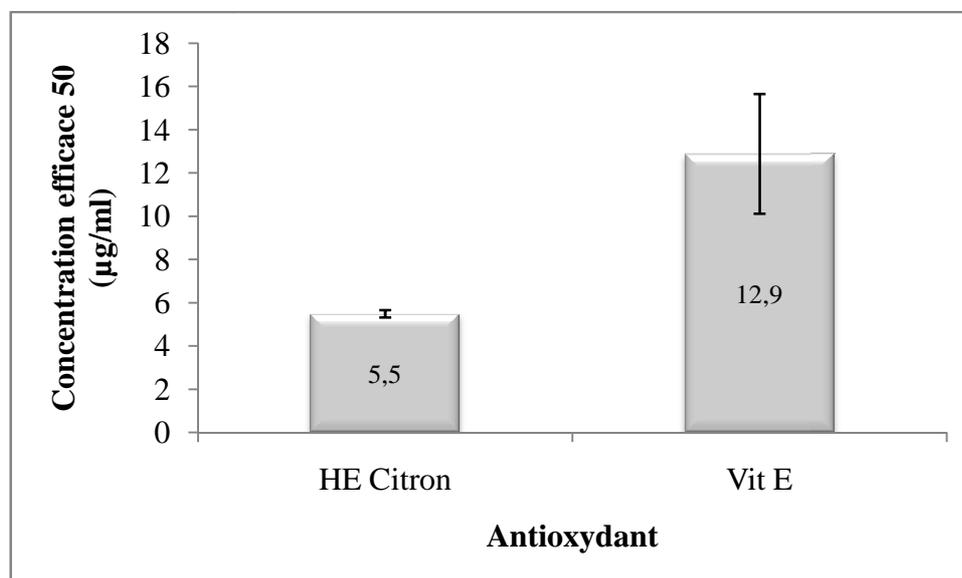


Figure 9. Concentration efficace 50 moyenne (CE₅₀) de l'huile essentielle de citron et de la vitamine E

Les résultats du test de DPPH° corroborent avec les résultats obtenus par le test de blanchiment du β -carotène, dont le pouvoir antioxydant de l'HE du citron s'est révélé supérieur à celui de la vitamine E.

L'activité antioxydante de l'HE testée est probablement liée aux composants majoritaires qui sont principalement les monoterpènes notamment le D-limonène, le β -pinène et le γ -terpinène (Misharina et Samusenko, 2008). Campêlo *et al.* (2011) ont montré que l'HE du citron est constituée de 99 % de D-limonène. Selon Tang *et al.* (2001), le β -pinène et le limonène présentent des propriétés antioxydantes importantes ; ils ont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyle.

D'après Liyana-Pathriana et Shahidi (2006), un antioxydant qui inhibe ou retarde le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

L'étude de Chun Yan *et al.* (2010) ont montré que dans le système acide linoléique/ β -carotène, l'HE du citron, à une concentration de 120 $\mu\text{g/ml}$, inhibe 70.3 ± 3.74 % de l'oxydation de l'acide linoléique. L'HE obtenue a inhibé $33,57 \pm 4,9$ % d'oxydation à une concentration de 4000 $\mu\text{g/ml}$. En plus des concentrations qui sont nettement différentes, cet écart peut s'expliquer par la

différence dans la composition des deux huiles essentielles en relation avec l'origine du fruit, la période de récolte et les conditions expérimentales.

Concernant les résultats de l'activité antioxydante de l'HE obtenue dans la présente étude, ils sont similaires aux résultats obtenus par Himed (2011). La valeur de la CE_{50} est de $5,4 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$, obtenue par le test de DPPH° et de 38,7 % par la méthode de blanchiment de β -carotène.

Les résultats de l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de l'HE de citron testée par la méthode de réduction du DPPH° et de blanchissement du β -carotène ont montré que cette HE a un pouvoir antioxydant. Ce résultat nous a incités à suivre cette étude par l'incorporation de l'HE extraite et testée dans la crème fraîche comme moyen possible de sa prévention de l'oxydation des lipides.

2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

En vue d'incorporer les huiles essentielles du citron comme agent antimicrobien dans la crème fraîche, il était nécessaire d'évaluer cette propriété *in vitro* d'une manière qualitative par la méthode des aromatogrammes et quantitative par la méthode de dilution d'agar.

2.2.1. Identification des levures isolées

Dans la crème fraîche contaminée, quatre souches de levure S1, S3, S4 et S7 ont été isolées. Les colonies sont de couleur blanche pour les souches S1 et S7, blanche grisâtre pour la souche S3 et rose pour la souche S4. Elles sont de formes convexe et circulaire pour les souches S1, S4 et S7, punctiforme pour la S3 et brillantes pour les souches S1, S7 et S4 (figure.10).

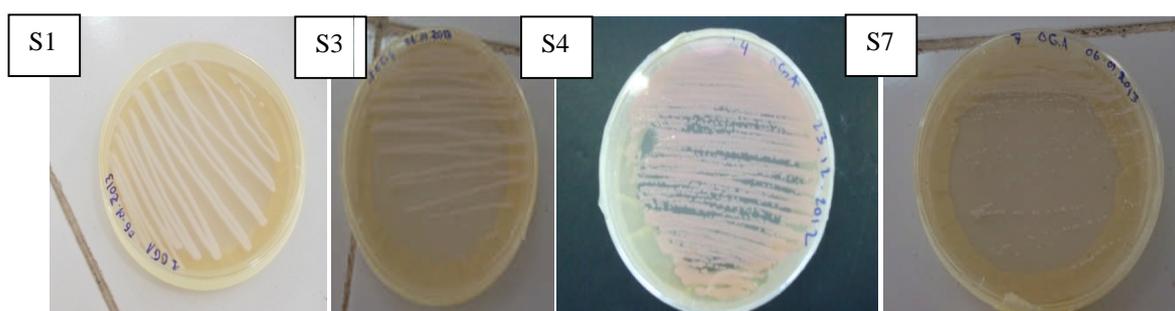


Figure 10. Caractéristiques macroscopiques des souches isolées dans le milieu OGA après 48 heures d'incubation

L'observation microscopique de leurs cellules, colorées au bleu de méthylène, montre des formes ovales des souches S1, S4 et S7 et ronde de la souche S3 (figure 11). A l'état frais, les souches présentent une reproduction par bourgeonnements bipolaires pour la souche S1 et

monopolaires pour les souches S3, S4 et S7 avec sporulation pour la souche S1 et sans aucune forme sporale pour les souches S3, S4 et S7 (figure 12). Les caractères cultureux montrent une sédimentation pour les souches S1 et S7 et une floculation pour les souches S3, et S4 des cellules cultivées dans le milieu yeast-glucose (YG) en tubes. Le test de filamentisation sur milieu PDA montre que les quatre souches sont dépourvues de filamentisation (annexe 8).

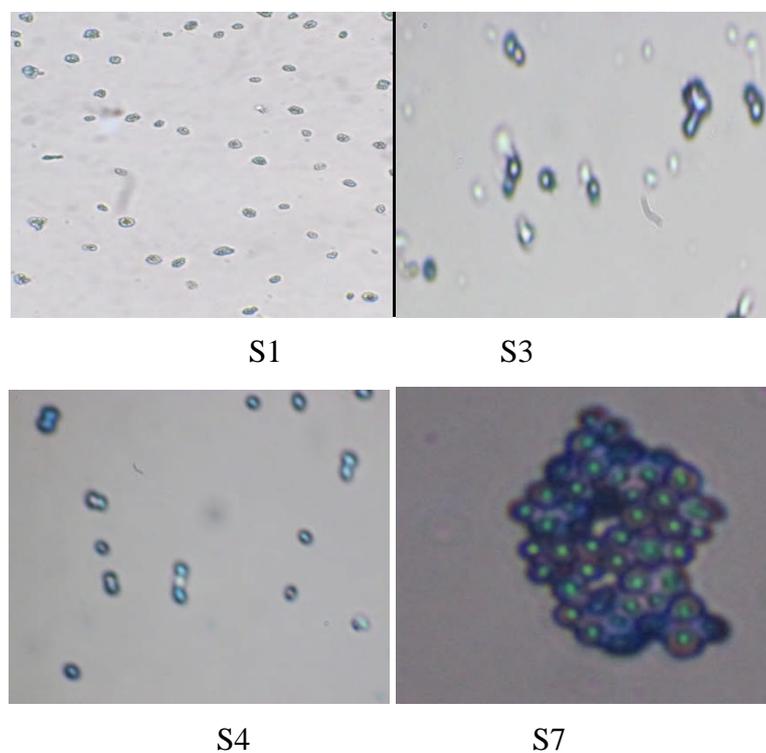


Figure 11. Aspect des cellules des souches (S1, S3, S4, S7) (G x 40)

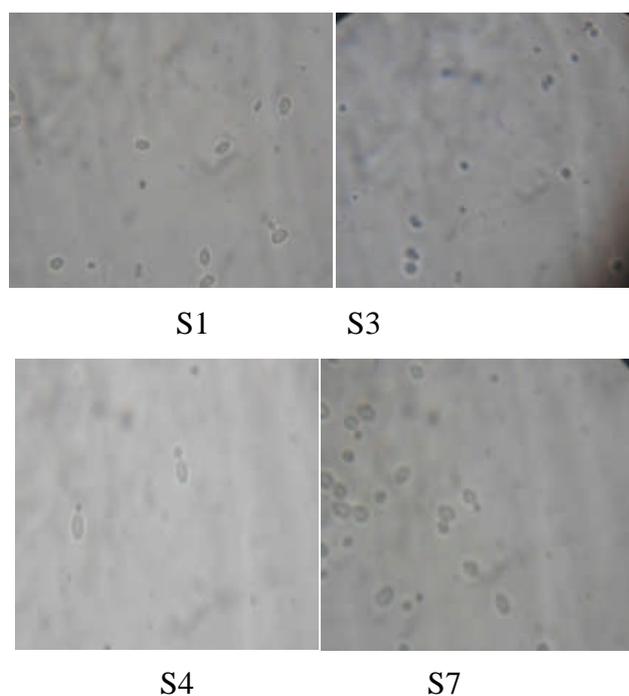


Figure 12. Aspect des cellules des souches (S1, S3, S4, S7) à l'état frais (G x 100)

La fermentation des sucres est révélée par la présence de gaz dans la cloche de Durham. La souche S1 présente une aptitude à fermenter la plupart des sucres testés (D-glucose, D-fructose, saccharose et D-galactose). La souche S7 ne fermente que le D-glucose et le D-fructose. La souche S3 présente à leur tour une aptitude à fermenter le D- glucose. Cependant la souche S4 n'a pu fermenter aucun sucre.

Suite à ces observations microscopiques, les souches levuriennes S1 et S7 semblent s'apparenter au genre *Zygosaccharomyces*. Selon Kurtzman et Fell (1998), Barnett *et al.* (2000), James et Stratford (2003), Kurtzman et James (2006), ces mêmes caractéristiques sont celles du genre *Zygosaccharomyces*. La souche S3 semble appartenir au genre *Debaryomyces*. Les mêmes caractères de la souche 3 sont ceux observés et identifiés du genre *Debaryomyces* par Kurtzman et Fell (1998) et Barnett *et al.* (2000). Selon Pitt et Hocking (1997), Frolich-Wyder (2003), Pitt et Hocking (2009), les caractères observés de la souche S4 sont ceux du genre *Rhodotorula*.

2.2.2. Méthode de diffusion ou des aromatogrammes

Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues, par mesure des diamètres d'inhibition de la croissance des microorganismes, sont reportés dans le tableau 7.

Les deux souches bactériennes *P. aeruginosa* et *E. coli* présentent une résistance à l'huile essentielle du citron. Nous avons remarqué aussi que *P. aeruginosa* est plus résistante que *E. coli*. Aucune zone d'inhibition autour du disque imbibé par l'HE n'a été observée vis-à-vis de *P. aeruginosa* mais une petite zone d'inhibition de diamètre moyen de $8,35 \pm 0,25$ mm autour du disque imprégné par *E. coli*.

A partir de la crème fraîche contaminée, nous avons pu isoler quatre souches (*Zygosaccharomyces sp1*, *Debaryomyces sp.*, *Rhodotorula sp.* et *Zygosaccharomyces sp2*). Les souches *Zygosaccharomyces sp1* et *Zygosaccharomyces sp2* présentent une résistance à l'huile essentielle testée avec des diamètres d'inhibition moyens de $7,25 \pm 0,95$ mm pour S1 et de $8,75 \pm 2,5$ mm pour S7. Par contre cette huile essentielle est légèrement inhibitrice de la croissance des souches *Debaryomyces sp.* et *Rhodotorula sp.* qui ont révélé des diamètres d'inhibition moyens de $13,5 \pm 1,73$ mm pour *Debaryomyces sp* et de $10,25 \pm 1,50$ mm pour *Rhodotorula sp.*

Tableau 7. Diamètre des zones d'inhibition (mm) montrant l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Citrus limon* (diffusion par disque)

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Classification de l'HE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ± 0,00	Non inhibitrice
<i>Escherichia coli</i>	8,35 ± 0,25	Non inhibitrice
<i>Zygosaccharomyces sp1</i>	7,25 ± 0,95	Non inhibitrice
<i>Debaryomyces sp.</i>	13,5 ± 1,73	Légèrement inhibitrice
<i>Rhodotorula sp.</i>	10,25 ± 1,5	Légèrement inhibitrice
<i>Zygosaccharomyces sp2</i>	8,75 ± 2,5	Non inhibitrice

Le diamètre du disque en papier filtre (6mm) est inclu.

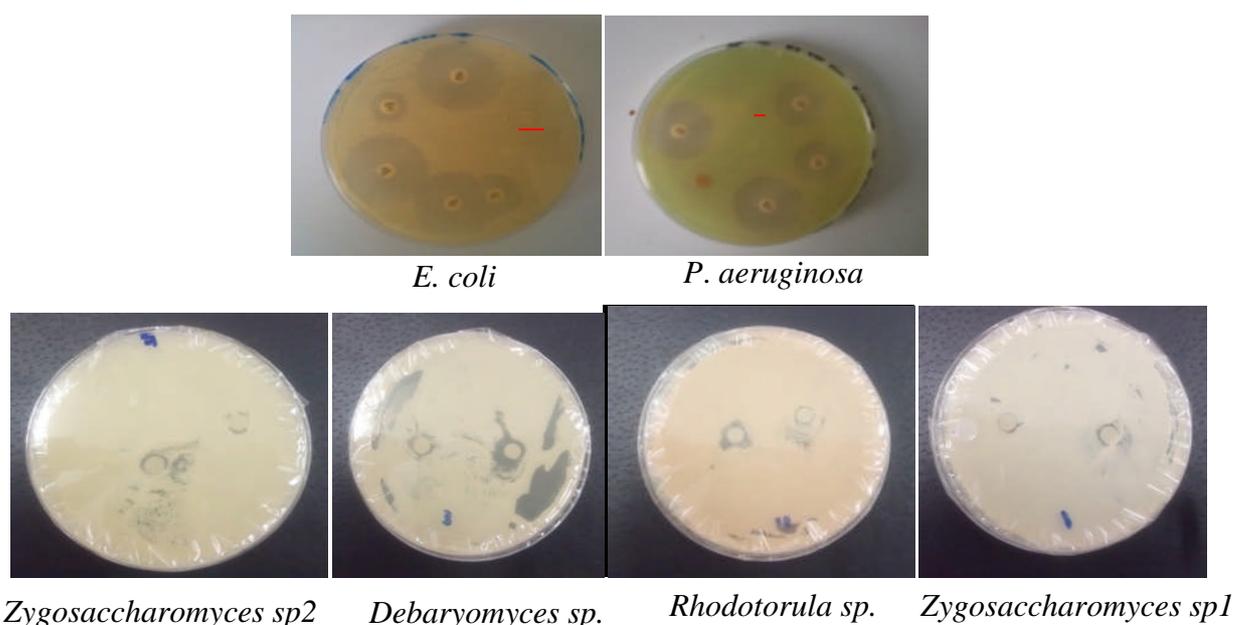


Figure 13. Effet de l'huile essentielle de citron sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Zygosaccharomyces sp1*, *Debaryomyces sp.*, *Rhodotorula sp.* et *Zygosaccharomyces sp2*, (méthode de diffusion sur gélose)

2.2.3. Méthode de dilution d'agar

La concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle du citron, déterminée par la méthode de dilution d'agar, est présentée dans le tableau 8 et illustrée dans les figures 14 et 15.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle testée a des CMI élevées vis-à-vis des souches étudiées. Les bactéries sont plus résistantes que les levures dont *P. aeruginosa* présente une CMI plus élevée (> 8%) et *E. coli* présente une CMI plus faible (de l'ordre de 4%).

Les souches de levure *Debaryomyces sp.* et *Rhodotorula sp.* ont été inhibées à des concentrations relativement faibles, respectivement égales à 0,25% et 0,5% , mais les deux autres souches *Zygosaccharomyces sp1* et *Zygosaccharomyces sp2* sont inhibées à des concentration plus élevées qui sont respectivement 1% et > 4%.

Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de citron

Souches	<i>P. aeruginosa</i> P	<i>E. coli</i> E	<i>Zygosaccharomyces sp1</i> E	<i>Debaryomyces sp.</i> E	<i>Rhodotorula sp</i>	<i>Zygosaccharomyces sp2</i>
CMI (%)	> 8	4	1	0,25	0,5	> 4

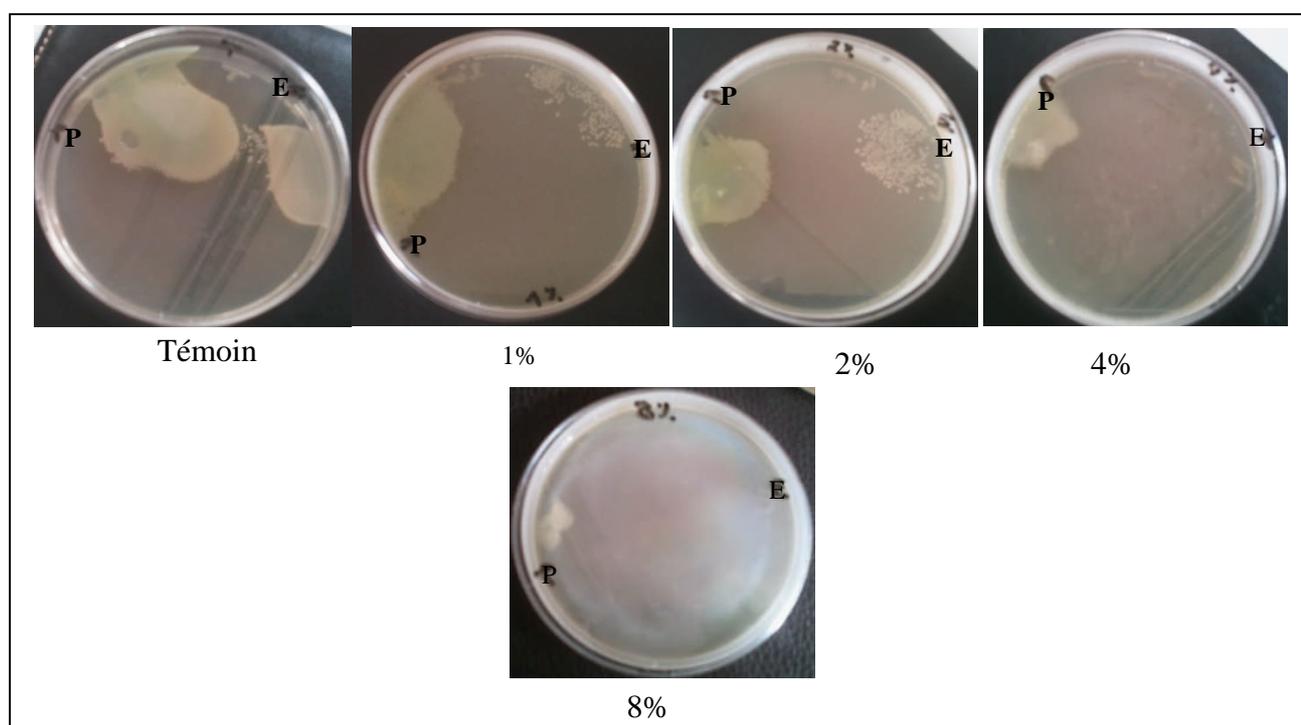


Figure 14. Evaluation des CMI de l'huile essentielle de citron vis-à-vis de *P. aeruginosa* (P) et *E. coli* (E) (méthode de dilution après 24 heures d'incubation)

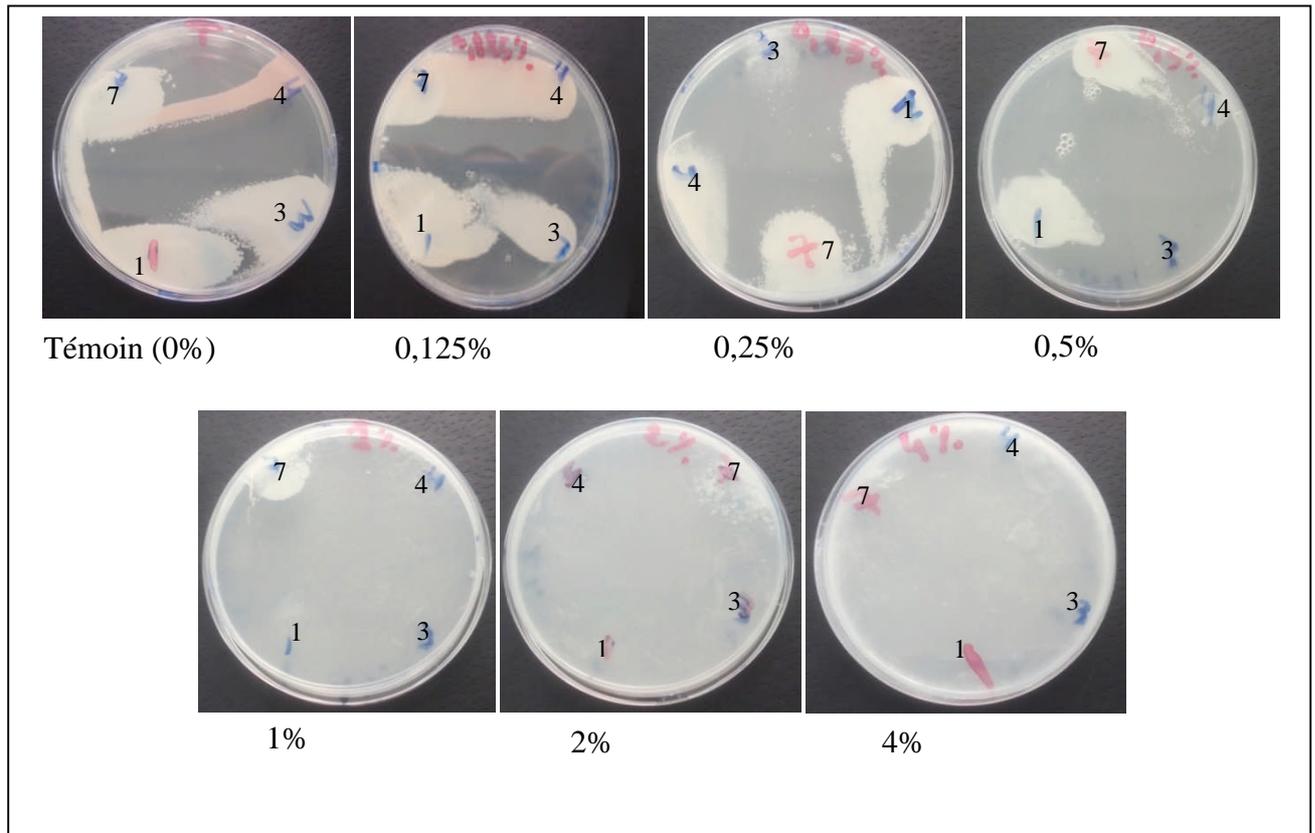


Figure 15. Evaluation des CMI de l'huile essentielle du citron vis-à-vis de *Zygosaccharomyces sp1*, *Debaryomyces sp.*, *Rhodotorula sp.* et *Zygosaccharomyces sp2* (par la méthode de dilution après 48 heures d'incubation)

- **Discussion**

Notre étude a montré que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne plus ou moins importante, sur la croissance de souches testées (bactéries et levures). Pour l'inhibition de leur croissance, les CMI doivent être comprises entre 0,25% et > 8%.

Les deux méthodes utilisées dans la présente étude ont montré que les souches bactériennes testées (*P. aeruginosa* et *E. coli*) sont résistantes à l'effet de l'huile essentielles du citron. Le Gram négatif de ces deux bactéries peut expliquer cette résistance. Les bactéries Gram négatif sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huile ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis de l'huile. La membrane externe des lipopolysaccharides des bactéries Gram négatif constitue une barrière à la perméabilité des substances hydrophobes, qui en entrant, empêchent la croissance des bactéries (Chao *et al.*, 2000).

La haute résistance constatée de *P. aeruginosa* peut être due à sa membrane externe particulière et à sa capacité de métaboliser un éventail composés organiques (Tasson *et Nychas*, 1995 ; chao *et*

al., 2000 ; Mann *et al.*, 2000 ; Innouye *et al.*, 2001 in Ferhat *et al.*, 2010). Les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie ; elles transforment le limonène (comme molécule modèle des terpènes) en alcool perillyl, en acide perillyl, en α -terpinéol, ou en limonène-6,8-diol (Malekey, 2007). Hinou *et al.* (1989) ont prouvé que *P. aeruginosa* est la bactérie la plus résistante à 32 huiles essentielles différentes. Boontawan et Stuckey (2006) ont montré une dégradation des terpènes par la souche *P. fluorescens*.

Les composants hydrophobes des huiles essentielles peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu de cellules bactériennes et fongiques (Cox *et al.*, 2000 ; Burt, 2004; Cristani *et al.*, 2007). Le α -terpinène et le limonène affectent la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *Candida tropicalis* entraînant la perte des composants cytoplasmiques de la cellule (Adegoke *et al.*, 2000).

Le mode d'action des HE contre les levures pourraient être dû également à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et la synthèse de composés structuraux (Conner et Beuchat, 1984). Les constituants majeurs de l'huile essentielle du citron β -pinène et le D-limonène, peuvent inhiber l'activité respiratoire dans les cellules intactes de levures et dans les mitochondrie isolées (Uribe *et al.*, 1985).

Plusieurs auteurs ont attribué l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* à la présence des composants volatils dans la composition de l'huile comme le limonène et le linalool (Rodov *et al.*, 1995 ; Alma *et al.*, 2004 ; Bezic *et al.*, 2005 ; Tepe *et al.*, 2006). Cette activité peut être déterminée par l'effet d'un seul composant ou par effet synergique ou antagonique de divers composants (Deba *et al.*, 2008). Veldhuizen *et al.* (2006) ont attribué cette activité aux composés phénoliques dont l'amphipathicité de ces composés peut expliquer leurs interactions avec les constituants membranaires et ainsi l'activité antimicrobienne.

Selon Knobloch *et al.* (1989) In Satrani *et al.* (2007), les bactéries sont plus vulnérables que les levures à l'HE. En effet, les terpénols sont plus efficaces contre les bactéries que contre les champignons. Dans cette étude, c'est l'inverse les levures se sont avérées plus sensibles que les bactéries, ceci peut s'expliquer par la composition majoritaire des huiles essentielles du *C. limon* en hydrocarbures terpéniques (limonène et β -pinène).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du citron a été étudiée par plusieurs chercheurs. Ferdeş et Ungureanu (2012) ont confirmé que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne. De même, Deb Roy *et al.* (2012) ont trouvé un diamètre de zone d'inhibition, de la croissance d'*E. coli* par l'HE extraite à partir l'écorce du citron, de l'ordre de 8 mm. Ce résultat concorde avec notre constat.

Rusenova et Parvanov (2009) ont montré, par la méthode de diffusion dans le disque, que l'HE du citron n'a pas un pouvoir antimicrobien sur les souches *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* et *Malassezia pachydermatis*.

Tserennadmid *et al.*, (2011) ont montré que les huiles essentielles du citron peuvent substituer les conservateurs synthétiques dans les produits acides à base de fruits et du lait, qui sont sensibles à la détérioration par les levures.

Cependant la comparaison de l'efficacité des HE, à travers les différentes publications, reste difficile à réaliser et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables, comme la composition chimique des HE qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce (Hellal, 2011) et les conditions expérimentales, la dose de l'HE appliquée sur le disque, l'émulsifiant utilisé, la température d'incubation, etc.

En récapitulation, l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du citron a révélé que les deux bactéries testées présentent une résistance à l'effet de cette huile, qui correspond à des CMI très élevées (4% et > 8%). Cette étude a montré aussi que, certaines des souches de levures testées présentent une certaine sensibilité à l'effet des huiles essentielles qui possèdent des CMI de 0,25 % et 0,5%. Mais les autres souches sont résistantes, leur CMI sont de l'ordre de 1 % et > 4 %.

Nous ne pouvons pas appliquer les doses élevées dans la crème fraîche (1 %, 4 %, > 4 % et > 8%), puisque elles affectent les propriétés organoleptiques en donnant un goût amer au produit. Cependant nous pouvons utiliser les faibles concentrations 0,25 % et 0,5 %.

3. Elaboration et analyses des crèmes fraîches

3.1. Choix des doses d'incorporation en huile essentielle

Pour choisir les doses de l'HE à incorporer dans la crème fraîche, nous avons évalué ses activités biologiques. A partir du test de l'activité antioxydante, nous avons obtenu une CE_{50} de $5,5 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ (5,5 ppm), et à partir du test des dilutions d'agar, des CMI variant entre 0,25 % (2500 ppm) et > 8 % (80000 ppm) ont été obtenues.

A la base des essais préliminaires sur les analyses sensorielles de deux crèmes fraîches élaborées à des concentrations de $5,5 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ (5,5 ppm) et de 1% (10000 ppm), nous avons écarté toutes les concentrations qui sont supérieures à 1% à cause de l'amertume perçue à cette concentration, et inférieures à 5,5 ppm du fait de l'absence de la perception de l'arôme du citron. Pour répondre aux critères sensoriels et conservateurs de l'huile essentielle, les doses de 0,125% ; 0,25% et 0,5% ont été choisies afin de les incorporer dans la crème fraîche. Ce qui nous a permis

d'élaborer trois types de crème fraîche avec l'échantillon de référence (crème témoin de la laiterie Safilait).

3.2. Analyses physico-chimiques

3.2.1. Densité du lait

La densité moyenne du lait cru, utilisé comme matière première pour l'élaboration des crèmes fraîches, est de $1031,67 \pm 1,53$. Il est à constater que cette densité est conforme à celle rapportée par la FAO (2010), qui donne une densité du lait cru variant entre 1028 et 1032. En effet, ce paramètre dépend de la teneur en matière sèche, en matière grasse, de l'augmentation de la température et des disponibilités alimentaires (Labioui *et al.*, 2009). Amiot *et al.* (2002) ont rapporté que chacun des constituants du lait agit sur la densité, plus la teneur en solide non gras est élevée plus la densité du produit laitier sera élevée.

3.2.2. Extrait sec

La figure 16 illustre les résultats correspondant aux taux des extraits secs. Pour le lait cru, il est de $11,75 \pm 1,05$ %, ce qui répond aux normes requises par la FAO (2010). Après écrémage et avant pasteurisation, il est élevé et vaut $46,83 \pm 2,33$ %. L'analyse de la variance (ANOVA) montre qu'il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux taux. L'augmentation du taux de l'extrait sec après écrémage peut être expliquée probablement par l'élimination de l'eau contenue dans le lait écrémé. Pour les quatre types de crème fraîche élaborée (crème fraîche à 0%, 0,125%, 0,25% et 0,5%) et qui n'ont subi aucun traitement thermique, les résultats montrent que les taux d'extraits secs obtenus sont légèrement différents mais sans aucune différence significative ($p > 0,05$). Ce constat s'explique par le fait que les quatre préparations sont issues de la même fabrication, même si leurs extraits secs fluctuent entre $38,08 \pm 1,79$ % et $40,74 \pm 2,6$ %. Une diminution significative ($p < 0,05$) du taux d'extrait sec est constatée après pasteurisation. Cette diminution peut être le résultat du traitement thermique (pasteurisation) appliqué sur la crème en favorisant une perte de certains constituants fragiles (Vitamine : B12, thiamine, pyridoxine, etc.). Ces constituants subissent une dégradation par la chaleur en diminuant la concentration des nutriments dans le lait (Amiot *et al.*, 2002).

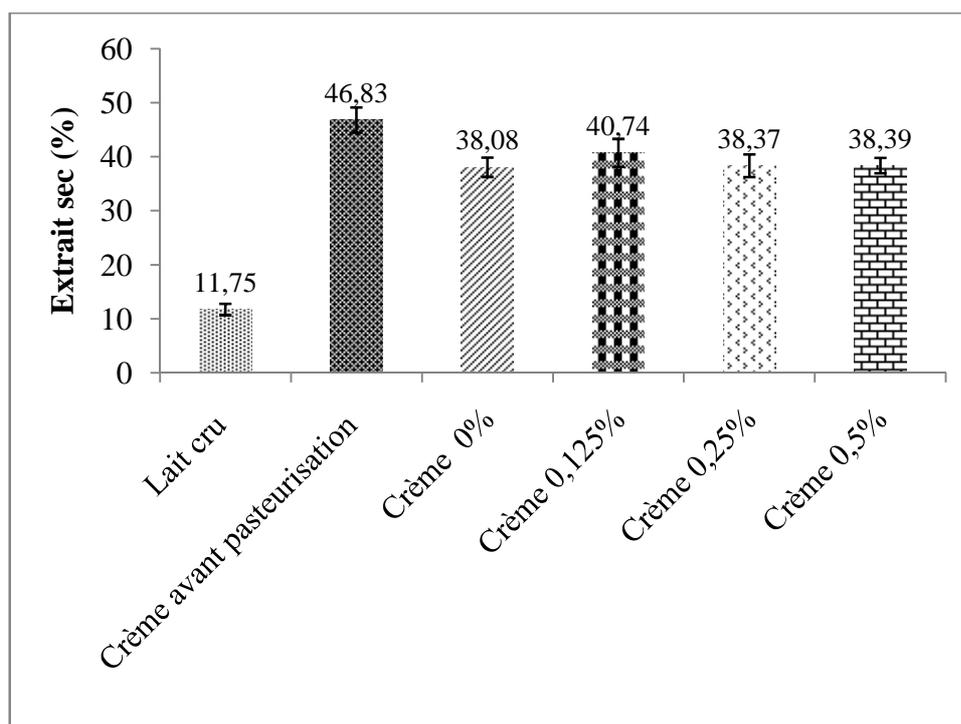


Figure 16. Taux d'extrait sec dans le lait cru, la crème avant pasteurisation et les crèmes fraîches élaborées

3.2.3. Matière grasse

Comme le montre la figure 17, le taux moyen de matière grasse de la matière première (lait cru) est de $3,33 \pm 0,15\%$, cette teneur dépasse la teneur rapportée par le journal officielle de la république algérienne 1993 (1,45 à 1,93 %). D'après ce résultat, le lait utilisé pour l'élaboration des crèmes fraîches est riche en matière grasse. Si ce lait est destiné à la transformation industrielle, il donne des rendements importants en produits finis.

Après l'écémage, la crème obtenue a eu un taux de l'ordre de $30 \pm 3\%$, cette teneur reste constante après la pasteurisation et même après l'ajout des huiles essentielles dans la crème fraîche.

Les crèmes fraîches élaborées ont une teneur en matière grasse en conformité avec les normes.

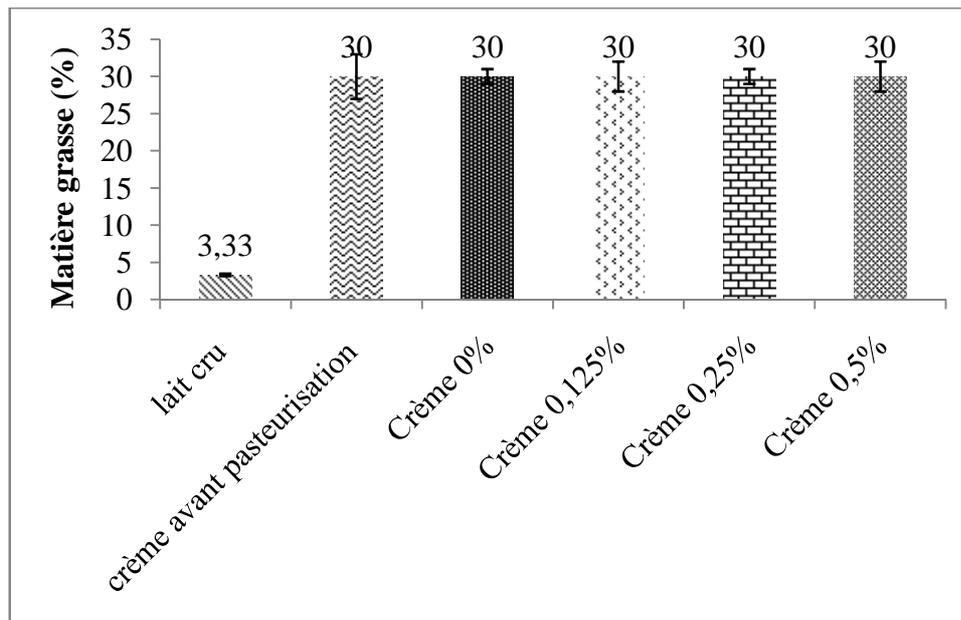


Figure 17. Taux de matière grasse dans le lait cru, la crème avant pasteurisation et les crèmes fraîches élaborées

3.2.4. pH et Acidité titrable

Les figures 18 et 19 indiquent l'évolution de l'acidité et du pH au cours de l'élaboration des crèmes fraîches et après l'ouverture de l'emballage. A partir de ces deux courbes, nous remarquons que ces deux paramètres sont inversement proportionnels. Plus l'acidité titrable est élevée, plus le pH est bas et vis versa.

L'évolution du pH des quatre crèmes fraîches élaborées passe par trois phases ; dans la première phase nous ne constatons aucune variation après l'écémage, tandis qu'une nette diminution peut être notée après pasteurisation jusqu'à pH variant entre 5,57 et 6,5 et cela selon le taux d'incorporation de l'huile essentielle. Cette chute de pH est vraisemblablement due à une éventuelle peptisation qui se traduit par un déroulement et une dissociation des chaînes protéines sous l'effet du traitement thermique tout en libérant des ions H^+ . Cette baisse du pH se poursuit même après ouverture de l'emballage mais à une vitesse plus vive suite à une fermentation hypothétique due à une contamination microbienne après ouverture de l'emballage. Enfin, une stabilisation du pH peut être notée au-delà du deuxième jour, Cuq *et al.* (2003) ont rapporté que la fermentation bactérienne peut présenter le phénomène de l'auto-inhibition en gardant le pH constant à un pH ultime.

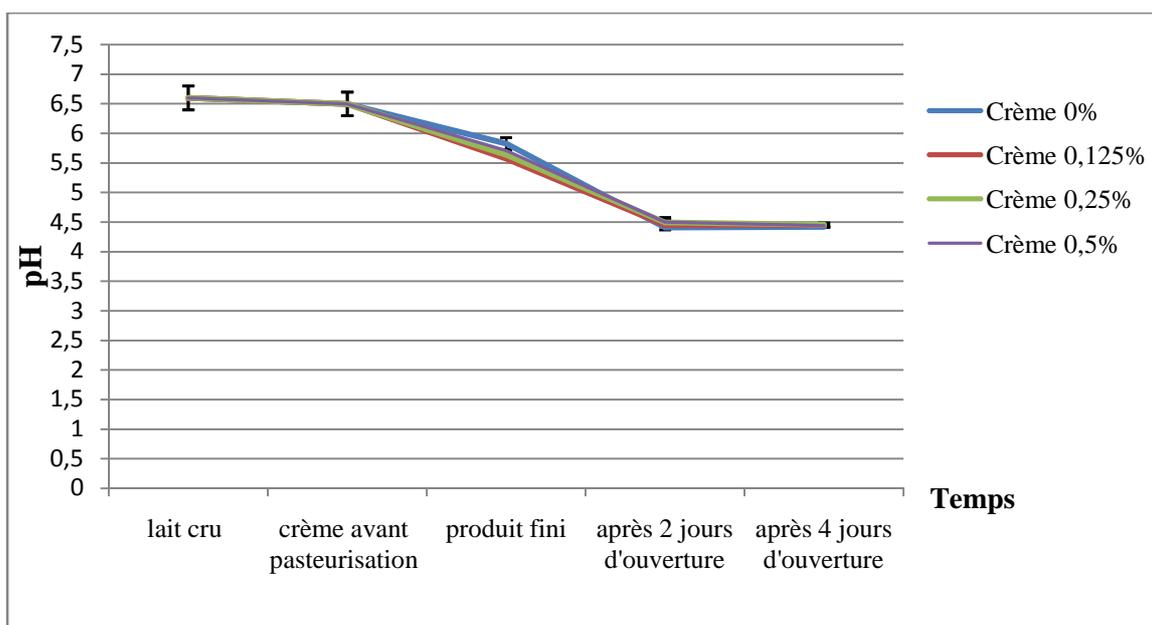


Figure 18. Evolution de pH au cours de la fabrication des crèmes fraîches et après ouverture de l'emballage

Le suivi de l'évolution de l'acidité titrable a révélé que l'écémage n'a pas influencé l'acidité titrable qui a été à $18,33 \pm 0,57^\circ\text{D}$, et que la pasteurisation pourrait augmenter légèrement ce paramètre pour atteindre les environ de $19,33 \pm 0,6^\circ\text{D}$ dans les quatre crèmes fraîches élaborées. L'ouverture de l'emballage peut être la cause de l'augmentation très remarquable de l'acidité titrable jusqu'à $53,33 \pm 0,57^\circ\text{D}$ pour la crème fraîche à 0%, $52 \pm 2^\circ\text{D}$ pour la crème fraîche à 0,125%, $51,33 \pm 2,51^\circ\text{D}$ pour la crème fraîche à 0,25% et $50 \pm 1^\circ\text{D}$ pour une incorporation de 0,5% de l'huile essentielle de *Citrus limon*. Ces résultats démontrent l'impact de la présence de l'huile essentielle de *Citrus limon* sur la crème fraîche. Elle peut abaisser favorablement son acidité titrable avec une possibilité d'inhiber le développement des bactéries lactiques qui fermentent le lactose en acide lactique.

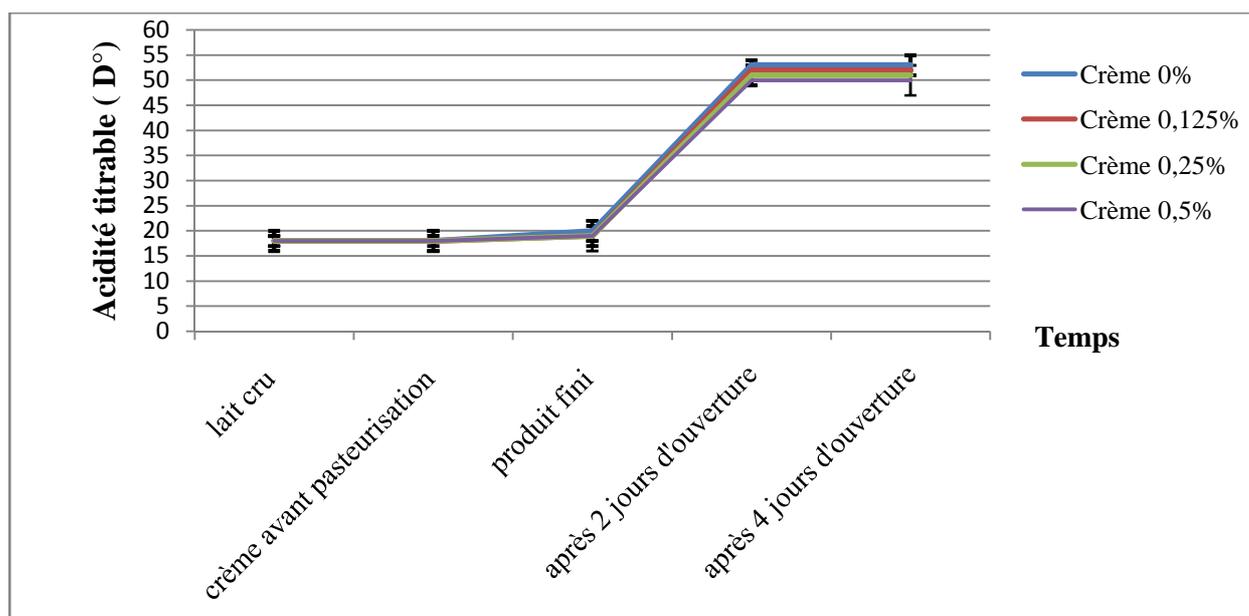


Figure 19. Evolution de l'acidité titrable au cours de la fabrication des crèmes fraîches et après ouverture de l'emballage

3.3. Analyses microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques du lait cru et de la crème avant pasteurisation sont présentés dans le tableau 9. Ces résultats montrent que ces deux produits contiennent une flore microbienne importante susceptible d'évoluer rapidement. L'absence des salmonelles et des staphylocoques indique une bonne santé des vaches. Ces résultats dépassent les normes décrites dans le journal officiel algérien n°35/1998.

Tableau 9. Qualité hygiénique de lait cru et de la crème avant pasteurisation

Germes	Lait cru	C.F. avant pasteurisation
FTAM	60.10 ⁴ /ml	73.10 ⁴ /ml
Coliformes totaux	100.10 ⁶ /ml	105.10 ⁴ /ml
Coliformes fécaux	18.10 ⁶ /ml	30.10 ⁴ /ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 / 0,1 ml	9 / 0,1 ml
Levures et moisissures	131/ml	17/ml
salmonelles	0/ 25 ml	0/ 25 ml

C.F. : crème fraîche

Le tableau 10 regroupe les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les crèmes fraîches élaborées pendant quatre jours après son ouverture. Les résultats du premier jour ont décelé la conformité des crèmes fraîches élaborées aux normes décrites dans le journal officiel algérien n°35/1998. Les résultats du deuxième jour montrent un développement de la FTAM et des levures dans toutes les crèmes fraîches élaborées et une apparition des coliformes fécaux dans les crèmes fraîches à 0,125 % et 0,25 % de l'huile essentielle. En comparaison aux normes, les résultats obtenus sont nettement élevés, ce qui rend les crèmes fraîches élaborées, après 48 heures d'ouverture impropres à la consommation. Dans le quatrième jour, nous avons remarqué la diminution du nombre de la FTAM, la disparition des coliformes fécaux, l'apparition des *Staphylococcus aureus* et l'augmentation du nombre des levures dans les quatre produits. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'augmentation de l'acidité du produit engendrée par la fermentation lactique qui inhibe la croissance des bactéries et favorise le développement des levures (Guiraud, 2003), par conséquent une augmentation de leur nombre dans les crèmes fraîches élaborées. Cette augmentation est plus importante dans la crème fraîche témoin (0% d'HE) et dans la crème fraîche à 0,125 % en comparaison avec les autres crèmes. Il s'avère aussi que plus la concentration en HE augmente plus le nombre de levures est réduit. Le suivi du dénombrement de la FTAM dans la crème fraîche à 0,5 % de l'HE nous a permis de noter clairement la réduction du nombre de la FTAM par rapport aux autres concentrations. Nous avons remarqué également l'absence totale de salmonelles, des moisissures et de la flore psychrophile pendant les quatre jours dans les quatre produits.

D'après ces résultats, l'ajout des huiles essentielles du citron à la crème fraîche présente un effet léger sur la flore bactérienne (FTAM), mais réduit notablement le nombre de levures. L'huile essentielle du citron n'a pas pu jouer le rôle d'un conservateur dans la crème fraîche à des concentrations de 0,125 % ; 0,25 % et 0,5 %, et elle n'a pas pu prolonger la date de consommation des crèmes fraîches après l'ouverture (après 48 heures) d'où une altération dès le deuxième jour après l'ouverture d'emballage. Ce constat peut être dû d'une part aux faibles concentrations en HE appliquée, et d'autre part à l'effet de la matrice alimentaire qui se compose, dans ce cas, de deux phases ; lipidique et aqueuse. Les huiles essentielles diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur les micro-organismes de la phase aqueuse (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Ainsi le contact de l'HE avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines protège les micro-organisme de l'action des HE (Tassou *et al.*, 1995). Une réaction chimique entre les protéines et les groupes fonctionnels des HE réduit la disponibilité des molécules actives (Malecky, 2007).

Tableau 10. Evolution de qualité hygiénique des crèmes fraîches pendant quatre jours après l'ouverture

Germes		FTAM /ml	C. totau x /ml	C. fécau x /ml	S. /0,1 ml Aureus	levures /ml	Moisissures /ml	Salmonelle s/0,1 ml	Flore psychrophile /ml
0%	J1	500	0	0	0	0	0	0	0
	J3	560. 10 ⁵	0	0	0	10	0	0	0
	J5	184. 10 ⁵	0	0	0	1300	0	0	0
0,125 %	J1	200	0	0	0	0	0	0	0
	J3	5. 10 ⁵	0	5.10 ²	0	20	0	0	0
	J5	3. 10 ⁵	0	0	10	2100	0	0	0
0,25 %	J1	600	0	0	0	0	0	0	0
	J3	472. 10 ⁵	0	2.10 ²	0	30	0	0	0
	J5	93. 10 ⁵	0	0	10	260	0	0	0
0,5%	J1	300	0	0	0	0	0	0	0
	J3	400	0	0	0	60	0	0	0
	J5	240	0	0	15	180	0	0	0

3.4. Stabilité oxydative des crèmes fraîches élaborées

Nous avons procédé à une oxydation de la matière grasse qui se trouve dans les crèmes fraîches élaborées à une température de 63 °C pendant 8 jours. Les produits d'oxydation ont été déterminés à des intervalles de temps de deux jours par le test de l'acide 2-thiobarbiturique (TBA). Dans ce test, une molécule de malonaldéhyde (MDA) réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe de couleur rose à rouge absorbant à 532 nm. La variation de la teneur en MDA dans les crèmes fraîches élaborées, en fonction du temps, est illustrée dans la figure 20.

Nous avons constaté une augmentation de la teneur en MDA dans tous les produits testés pendant 8 jours. Cette augmentation est très importante dans les 6 jours. Nous avons remarqué aussi que plus la crème contient de l'HE, elle résiste plus à l'oxydation provoquée par la chaleur. La crème fraîche témoin présente une forte sensibilité à l'oxydation, cette sensibilité peut s'expliquer par sa teneur en acides gras insaturés. Les lipides d'origine laitière contiennent environ 28% à 48% dont plus de 95% sont présentés par les acides oléique, linoléique et linoléique (Badings, 1970). La présence d'HE dans les autres crèmes fraîches peut favoriser la prévention de la peroxydation des ces acides gras provoquée par la chaleur.

En récapitulation, l'HE du citron présente des propriétés antioxydantes importantes permettant la préservation de la crème fraîche de la peroxydation lipidique.

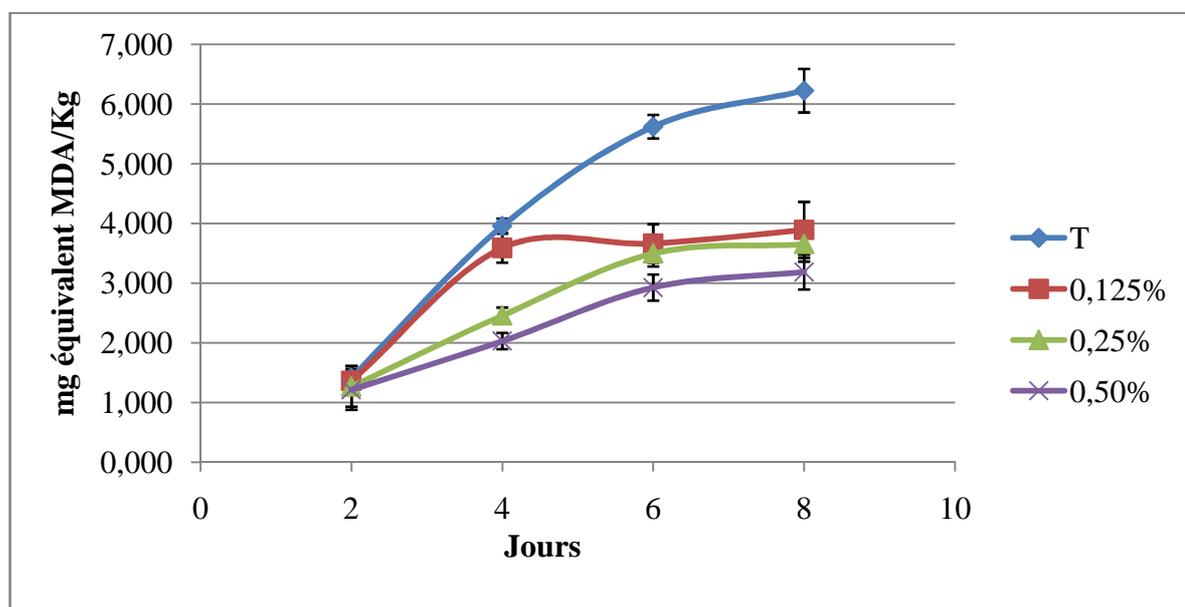


Figure 20. Variation de la teneur en MDA des crèmes fraîches élaborées en fonction du temps de stockage à une température de 63°C

3.5. Analyses sensorielles

3.5.1. Test de comparaison par paire

Les résultats du test de comparaison par paire sont consignés dans le tableau 11 au moyen du tableau statistique de l'annexe 3, la valeur critique était de 9. Pour le test de différence, tous les membres du panel ont pu détecter la différence significative (nombre de réponses juste = 10 > 9) entre les six paires d'échantillons des crèmes fraîches et cela indique que l'incorporation de l'HE à des concentrations différentes (A = 0 %, B = 0,125 %, C = 0,25 % et D = 0,5 %) a permis de donner des produits significativement différents. Le seuil d'aromatisation a été analysé et les résultats obtenus montrent que seules les paires (A-B), (A-C), (A-D) présentent une différence significative d'aromatisation (nombre de détection de différence d'aromatisation = 10 > 9) en indiquant que chaque ajout de l'HE induit une perception d'aromatisation par rapport au témoin même à faible concentration (0,125 %). Quant aux trois autres préparations, la détection de la différence d'aromatisation n'a pas été significative et le degré d'aromatisation a été perçu indifféremment. Aucune préférence significative n'a été révélée entre le témoin et les trois autres préparations aromatisées par l'HE du citron, même entre les différentes concentrations d'aromatisation aucune différence significative n'a été révélée.

Tableau 11. Résultats du test de comparaison par paire

Paire	Réponse juste ; différence	Produit aromatisé	Produit préféré
A-B	10	10	5A - 5B
A-C	10	10	5A - 5C
A-D	10	10	5A - 5D
B-C	10	7	5B - 5C
C-D	10	5	5C - 5D
B-D	10	8	5B - 5D
Valeur critique	9	9	9
Conclusion	il y a une différence significative pour les six paires	il y a une différence significative pour les 3 premières paires	il n'y a pas de différence significative pour les six paires

3.5.2. Test de classement par rang

Nous avons demandé aux dégustateurs de classer les quatre préparations de crème fraîche (A = 0 %, B = 0,125 %, C = 0,25 % et D = 0,5 %) en terme d'acceptabilité sans donner d'égalité, en donnant à chaque échantillon une cote différente même s'ils semblaient comparables. L'échantillon auquel on accordait le goût le plus acceptable se voyait donner la cote 1, le suivant la cote 2 et celui qui paraissait le moins acceptable la cote 3 et le dernier la cote 4. Les cotes de classement données à chaque échantillon par les 10 dégustateurs ont été récapitulées dans le tableau 12.

Tableau 12. Résultats du test de classement par rang des crèmes fraîches élaborées

Dégustateur	A	B	C	D
1	2	1	3	4
2	1	4	3	2
3	3	1	2	4
4	3	2	1	4
5	2	4	1	3
6	3	4	1	2
7	1	2	3	4
8	1	2	3	4
9	2	1	3	4
10	1	2	3	4
Totaux de classement	19	23	23	35

Valeur critique = 15

La valeur critique, calculée pour 10 dégustateurs et 4 échantillons au seuil $p \leq 0,05$, est de 15 d'après le tableau de l'annexe 5.

Les différences entre les totaux de classement par paires (tableau 13), montrent qu'il y a absence de différence significative (différence < 15) entre les paires des échantillons des crèmes fraîches, toute en remarquant une différence nulle entre les doses d'aromatisation de 0,125 % et 0,25%. Cependant, la préparation de crème fraîche contenant 0,5 % de l'HE du citron (D) est significativement déclassée par rapport au témoin (A) ($D - A = 16 > 15$).

Tableau 13. Signification de classement par paires

Paire	Différence	Signification
A et B	4	Non
A et C	4	Non
A et D	16	Oui
B et C	0	Non
B et D	12	Non
C et D	12	Non

En récapitulation, les dégustateurs ont classé les quatre préparations de crèmes fraîche par ordre de préférence selon l'intensité du goût en attribuant le premier rang au témoin (A), suivi par les deux préparations B et C contenant respectivement 0,125% et 0,25% de l'HE en égalité en deuxième rang, et enfin la crème fraîche la plus aromatisée (D) à 0,5% se voyait en troisième rang.

3.5.3. Test hédonique

La figure 21 rassemble les profils sensoriels des quatre crèmes fraîches préparées à différentes concentrations de l'huile essentielle du citron (A : témoin 0 %, B : 0,125 %, C : 0,25 %, D : 0,5 %). Nous constatons que les membres du panel de dégustation perçoivent que les caractéristiques sensorielles décrivant l'arôme et l'odeur du citron ont été plus intenses dans toutes les crèmes fraîches contenant l'huile essentielle du citron. Par contre, aucune différence remarquable n'a été soulignée pour les autres attributs.

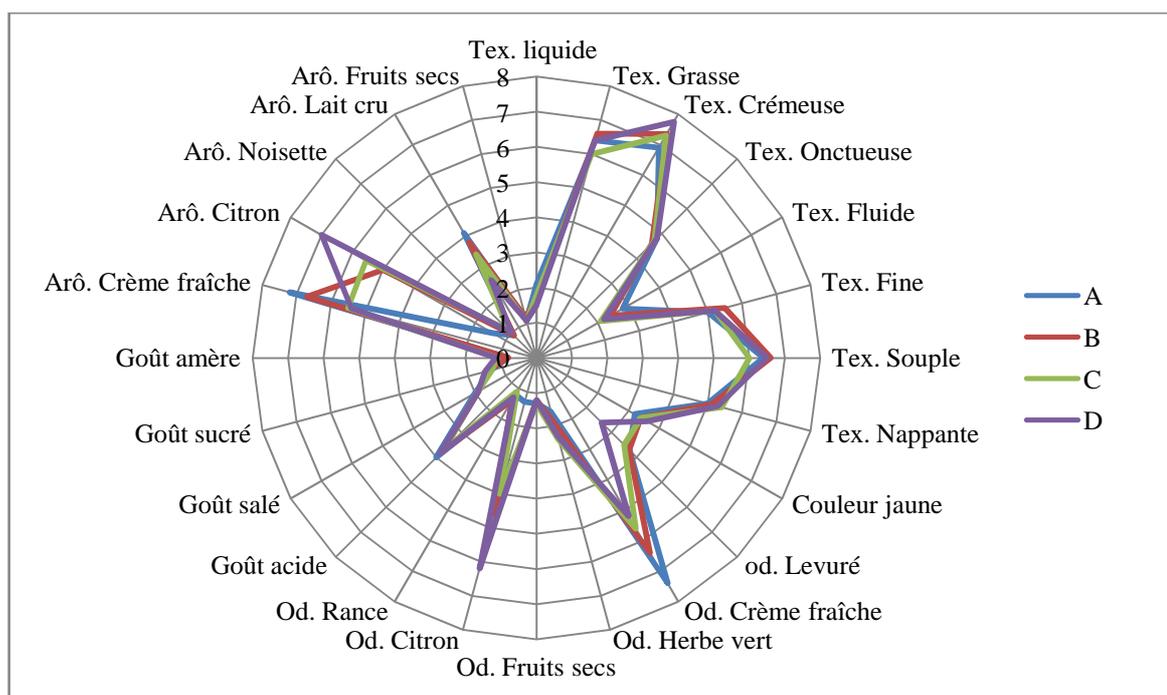


Figure 21. Profils sensoriels des quatre crèmes fraîches préparées à différentes concentrations en huile essentielle du citron (A : témoin 0%, B : 0,125%, C : 0,25%, D : 0,5%)

L'analyse de la variance (ANOVA) sur les notations des caractéristiques sensorielles, nous montre que pour les caractéristiques de la texture et de la couleur aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été parue entre tous les échantillons de crèmes fraîches analysés. Néanmoins, des différences significatives ($p > 0,05$) ont été notées concernant l'odeur du citron et l'arôme du citron.

Ces résultats permettent de conclure que les taux d'incorporation de l'HE choisis dans la crème fraîche, modifient l'arôme et l'odeur, sans toucher aux caractéristiques de la texture et de la couleur. Le degré d'acceptabilité de ces crèmes fraîches avec de l'HE du citron auprès des dégustateurs est maintenu, et cela du fait qu'il n'y avait pas de différence significative pendant le classement des quatre crèmes fraîches étudiées. La concentration de 0,5% en HE a donné un produit significativement déclassé par rapport au témoin.

3.6. Test de corrélation

L'ACP a montré que le taux d'incorporation de l'HE est significativement corrélé avec l'arôme du lait cru et la couleur jaune (figure 23). Cette corrélation est négative ($r = -0,998$) avec l'arôme du lait cru et positive ($r = 0,956$) avec la couleur jaune (annexe 9).

Nous avons observé ainsi une corrélation négative entre le taux d'incorporation de l'HE et la texture liquide ($r = -0,878$), l'odeur de levure ($r = -0,938$), l'odeur de la crème fraîche ($r = -0,934$) et l'arôme la crème fraîche ($r = -0,898$). Une corrélation positive entre le taux en HE et la texture crémeuse ($r = 0,940$), l'odeur d'herbe vert ($r = 0,818$), l'odeur du citron ($r = 0,883$) et l'arôme du citron ($r = 0,897$) et le goût amer ($r = 0,892$) (annexe 9). Ferhat *et al.* (2010) ont rapporté que l'HE de citron se caractérise par une couleur jaune, une odeur fraîche et un goût comprenant un accent fruité et vert enveloppé d'une note d'amertume qui donne ces caractéristiques aux produits et masque les odeurs de crème fraîche et d'herbe verte. La composante grasseuse aldéhydique lui confère une texture crémeuse et moins liquide.

Le test de corrélation a décelé une corrélation négative ($r = -0,824$) entre le taux d'incorporation en huile essentielle et la teneur en MDA. Ce résultat indique que chaque élévation du taux d'incorporation en HE entraîne une diminution de la teneur en MDA qui est l'un des produits majeurs d'oxydation des lipides (Botsoglou *et al.*, 1994) en indiquant que la présence de l'HE favorise la stabilité à l'oxydation de la crème fraîche.

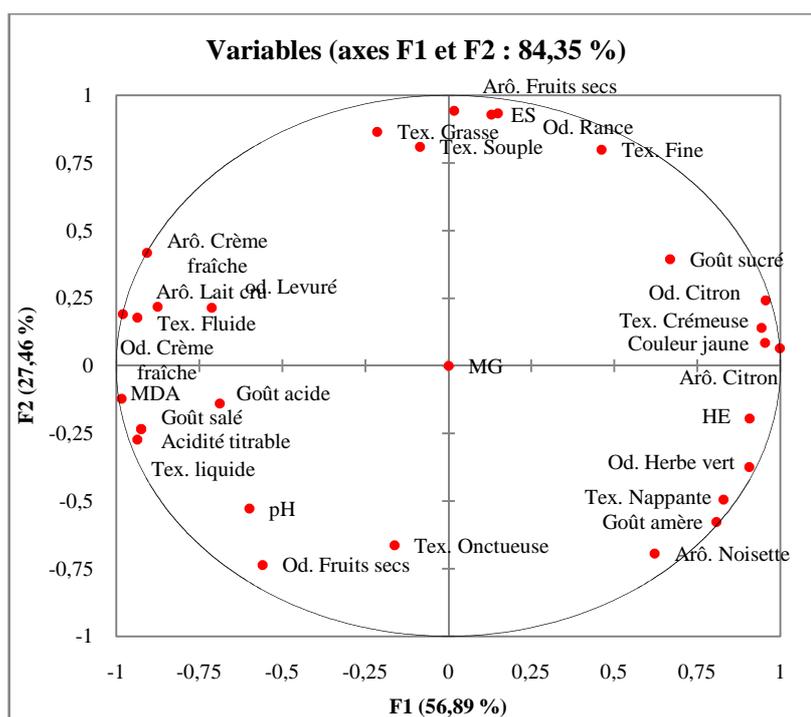


Figure 22. Analyse en composantes principales (ACP) des principales caractéristiques sensorielles et physicochimiques (au seuil de signification 0,05)

Conclusion générale et perspectives

Nous rappelons que les objectifs de cette étude sont la valorisation des écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de son huile essentielle comme agent naturel conservateur et aromatique dans la crème fraîche et la diversification des différents types de crème fraîche existants d'autre part.

Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

Le rendement moyen en huile essentielle du citron obtenu par hydrodistillation est de l'ordre de $0,89 \pm 0,09\%$. L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle du citron *in vitro* par les méthodes de réduction du DPPH° et de blanchiment du β -carotène, a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antioxydant, donc son emploi dans la crème fraîche peut constituer un moyen possible de prévention de l'oxydation des lipides.

Le test antimicrobien de l'huile essentielle a révélé que les deux bactéries testées présentent une résistance contre l'efficacité de cette huile, se traduisant par des CMI très élevées. En ce qui concerne les souches de levures isolées puis testées *Debaryomyces sp. et Rhodotorula sp.*, elles ont présenté une certaine sensibilité à l'effet de l'huile essentielle, se caractérisant par des CMI respectivement de 0,25% et 0,5%. Quant aux autres souches *Zygosaccharomyces sp1 et Zygosaccharomyces sp2*, elles sont révélées résistantes, leur CMI sont respectivement de l'ordre de 1% et > 4%. Nous n'avons pas pu appliquer des doses élevées des huiles essentielles dans la crème fraîche (1%, 4%, > 4% et >8%), puisque elles affectent les propriétés organoleptiques en donnant un goût amer au produit.

Les différents essais concernant l'élaboration des crèmes fraîches additionnées de l'huile essentielle du citron ont été réalisés en élaborant trois crèmes fraîches avec des concentrations de 0,125%, 0,25%, 0,5%. Les caractéristiques s'avèrent conformes aux normes. Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des crèmes fraîches élaborées, après ouverture de l'emballage, montrent que la présence de l'huile essentielle aux faibles concentrations ne limite pas l'altération microbienne.

Les résultats de l'évaluation de la stabilité oxydative par le test Schaal indiquent que les crèmes fraîches à l'huile essentielle du citron sont plus résistantes que le témoin vis-à-vis l'oxydation forcée et que la crème fraîche à 0,5% d'HE est plus résistante que les crèmes fraîches à 0,125% et 0,25%.

Les résultats des analyses sensorielles montrent que l'incorporation de l'huile essentielle dans la crème fraîche, pour des concentrations de 0,125% et 0,25%, n'entraîne aucune différence

significative de point de vue aromatisation, et donnent des produits classés indifféremment avec le témoin. Seul le taux d'incorporation de l'huile essentielle de 0,5% a déclassé significativement le produit par rapport au témoin en troisième rang, dont elle a entraîné des modifications d'odeur et d'arôme toute en gardant les caractéristiques de la texture, de la couleur et du goût inchangées.

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) ont montré que le taux d'incorporation en HE était corrélé négativement avec l'arôme du lait cru et positivement avec la couleur jaune d'une manière significative.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'HE du citron semble être plus appropriée comme agent antioxydant et aromatique dans la crème fraîche.

Même si ce travail a permis d'étudier les caractéristiques biologiques de l'huile essentielle de *C. limon* et d'explorer la possibilité de son utilisation comme agent antioxydant et aromatique dans la crème fraîche, beaucoup de questions mériteraient d'être traitées, donc il est souhaitable :

- D'isoler les bactéries lactiques de la crème fraîche et d'étudier leur comportement vis-à-vis de l'huile essentielle de *C. limon* ;
- D'étudier l'effet de l'huile essentielle de *C. limon* sur les ferments lactiques de la crème fraîche maturée ;
- D'identifier les constituants de l'huile essentielle de *C. limon* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) ;
- D'extraire les composants actifs de l'huile essentielle *C. limon* et de les appliquer directement dans la crème fraîche.

Références bibliographiques

- Abdesselam Z. 2006. Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp. 6-16
- Adegoke G.O., Iwahashi H., Komatsu Y., Obuchi K., Iwahashi Y. 2000. Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielii*. *Flavour and Fragrance Journal* 15, pp. 147–150
- AFNOR NF ISO 855.2004. Huile essentielle de citron [*Citrus limon (L.) Burm. f.*]; AFNOR, Paris.
- AFNOR. 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR. 1980. Recueil des Normes Françaises « Lait et produits laitiers », AFNOR. Paris.
- AFNOR. 2000. Association française de normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. AFNOR, Paris.
- Ahmad M. M., Rehman S. U., Anjum F. M., Bajwa E. E., 2006. Comparative physical examination of various citrus peel essential oils. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8, pp. 186–190
- Alais C., Linden G., Miclo L. 2003. *Biochimie alimentaire*. 5^{ème} Ed. Dunod de l'abrégé. 59 p.
- Alais Ch. 1984. *Science du lait: Principes des techniques laitières*. IN SINA L. 1992. Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la SOCA. *Thèse de doctorat*, Ecole inter-etats des sciences et médecine vétérinaires E.I.S.M.V. Université cheikh Anta Diop de Dakar. 245 p.
- Alavi L., Jabbari A., Barzegar M., Hassanali N. 2008. Chemical composition and Antioxidant Properties of Essential Oils (*lippia citriodora*, *thymus daenensis*), 18th Congress on food technology, Iran. 6p.
- Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T., Yilmaz N. 2004. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), pp. 3911–3914
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R., Turgeon H. 2002. Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait In Vignola C.L, *Science et technologie du lait –Transformation du lait*. Ed. École polytechnique de Montréal, Québec pp. 1-73.
- Anton R. et Lobstein A. (2005). *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec & Doc, Paris, 522 p.
- Ao Y., Satoh K., Shibano K., Kawahito Y., Shioda S. 2008. Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43(1) pp. 6–12
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare Mill.*). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54
- Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A. , Laroui S., Khebri S. 2010. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, 11,(1) pp. 69- 81

- Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne, pp.1-18
- Badings H.T. 1970. Cold- storage defects in butter and thier relation to the autoxidation of unsaturated fatty acids. *J. Netheriands milk and dairy journal*,24, 1pp. 47-256
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. 2000. Yeasts: Characteristics and Identification, 3rd edn. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Baser K.H.C. et Buchbauer G. 2010. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.
- Baser K.H.C., Demirci B., Demirci F., Koçak S., Akinci Ç., Malyer H., Güteryüz G. 2002. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. - *Planta Med.*, 68(10), pp. 941-943
- Belaïche, P. 1979. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. l'aromatogramme. Tome1. Ed. Maloine S.A., Paris,204 p.
- Belletti N., Nadagijimana M., Sisto C., Guerzoni M. E., Lanciotti, R., Gardini, F. 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), pp. 6932-6938
- Bernadet M 1983. *Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles*, Eds. Dangles, France. 384 p.
- Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. 1988. Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. In *Information chimie*, 229 pp. 179-184
- Besombes C. 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289 p.
- Bisignano G., Cimino F., Saija A. 2011. Biological Activities of Citrus Essential Oils. In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp.529-548
- Blanco Tirado, C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., Martinez, J. R. 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gaschromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.A* 697, pp. 501–513
- Blaquiere C., Ferrari V., Girod – Quilain I. 2006. Les arômes alimentaires : les bases de la réglementation européenne. *Rev. Industries Alimentaires et Agricoles*, 26 p.
- Bondet V., Brand-Williams W. and Berset C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidantactivity using the DPPH• free radical method. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30, (6), pp.609-615
- Boontawan, A., D. C. Stuckey. 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha-pinene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, pp.643-649

- Bouguerra A. 2011. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de magistère. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies alimentaires (I.N.A.T.A.A.), Université Mentouri Constantine, 128 p.
- Bouix M. et Leveau J.Y. 1984. *Contrôle Microbiologique, biotechnologie*. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 469 p.
- Bourgeois C.M. 1992. Additifs conservateurs (antibactériens, antifongiques). In Multon J.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 2^{ème} Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 169- 190
- Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., Saidani Tounsi M., 2012. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 10 p.
- Bousbia N. 2004. Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. Mémoire de magistère. Institut National Agronomique, El Harrach – Alger. 130 p.
- Boutonnier J.L. et Dunant C.L. 1985. Crème, beurre, et autres produits laitiers issus de la matière grasse in : *lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre*. Tome 3. Ed. Tec. Doc. Lavoisier, Paris, pp. 443 – 504
- Bozin B., Mimica-Duric N., Samojlik I., Goran A., Igc R. 2008. Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L. Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, pp. 925-929
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28, pp. 25-30
- Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., de Buyser M-L., Collette C., Garin-Bastuji B. et Thorel M.-F. 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (1), pp. 452-471
- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 91
- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Ed. Lavoisier, 2^{ème} Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p.
- Bruno E., Chiricosta S., Licandro G. 1978. Infl uenza del tipo di contenitore sulla concentrazione di metalli pesanti negli oli essenziali agrumari. *Essenz. Der. Agrum.* 48 pp. 265–281
- Buchbauer G., 2010. Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, pp.235 - 280
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), pp. 223-253
- Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Agatino R., Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1e2), pp. 73-79

- Caillet S. et Lacroix M. 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). pp. 1-8
- Campêlo L.M. L., Almeida A . A. C., Freitas R. L.M., Cerqueira G. S., Sousa G. F., Saldanha G. B., Feitosa C.M., Freitas R. M. 2011. Antioxidant and Antinociceptive Effects of Citrus limon Essential Oil in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 8 p.
- Carson C. F. et Hammer K. A., 2011. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. United Kingdom : John Wiley et Sons Ltd. pp. 204-238
- Cautela, D., Castaldo, D., Santelli, F., et al. 2007. Survey of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated bibenzo-p-furans (PCDFs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and mineral components in Italian citrus cold-pressed essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55, pp.1627–1637
- Chami F. 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266 p.
- Chanforan C. 2010. Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechiométrique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. *Thèse de doctorat*, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France. 388 p.
- Chanthaphon S., Chanthachum S., Hongpattarakere T. 2008. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. *ongklanakarín J. Sci. Technol.* 30 (Suppl.1), pp. 125-131
- Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J. 2000. Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.*, 12, pp. 639-649
- Chevolleau, S., Debal, A., Ucciani, E. 1992. Détermination de l'activité antioxydante de plantes médicinales. *Rev. Fr. Corps* 39, pp.120-126
- Chikhouna A. 2007. Huiles essentielles de thym et d'origan : Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante et antimicrobienne. Mémoire de magistère. Institut National Agronomique, El Harrach – Alger. 155 p.
- Chilliard Y., Lamberet G., 1984. Le Lait In Heuchel V., Chatelin Y.M., Breau S., Sobolewski F., Blancard N., Baraton Y. et Ayerbe A. Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers 2003. *Renc. Rech. Ruminants*, 10, pp. 223-226
- Choi H-S., Song H.S., Ukeda H., Sawamura M. 2000. Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric. Food Chem.*, 48, pp. 4156-4161
- ChunYan H., Hong P., ZhenYu Z., Jing S. 2010. Evaluation of antioxidant and antitumor activities of lemon essential oil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(18), pp. 1910-1915

- Clement J.M. 1981. *Les agrumes*. Librairie Larousse, Paris, pp. 3-37
- Collomb M. et Spahni M. 1996. Revue de méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers. *Schweiz. Milchw. Forschung*, 25 (1/2), pp. 3-24
- Commission Codex alimentarius, 1981. Norme générale pour l'étiquetage des additifs alimentaires vendus en tant que tels. Codex Standard 107-1981, 4 p.
- Commission Codex alimentarius, 2010. Rapport de la quarante-deuxième session du comité du codex sur les additifs alimentaires. Trente-troisième session, Genève (Suisse), 5-9 juillet, CL 2010/7-FA 80 p.
- Commission Codex Alimentarius Commission. 2003. Codex standard for creams and prepared creams, Codex Stan. A-9-1976, Rev. 1-2003, FAO/WHO, Rome. 7 p.
- Conner D. E., 1993. Naturally occurring compounds. In Davidson P. M. ; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468
- Conner D. E., Beuchat L. R. 1984a. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49, pp. 429-434
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., et al. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 29, pp.130-35
- 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, pp. 170-175
- Cristiani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. et Micieli D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 6300-6308
- Croteau R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites), in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (eds B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, pp. 1250-1268
- Cuq J.-L., Guiraud J, Navarro J-M 1992 .microbiologie alimentaire In Dupin H., Cuq J.-L., Malewiak M.-I. Leynaud Rouaud C., Berthier A.-M. *Alimentation et nutrition humaines*. Ed. ESF pp. 1257- 1330
- Dabbah R., Edwards V. M., Moats, W. A. 1970. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Applied Microbiology*, 19(1), pp. 27-31
- Deb Roy S., Banial R., Chakraborty J., Goswami R., Laila R., Ahmed S. A., 2012. Pharmacognostic, phytochemical, physicochemical property and antimicrobial activity studies of lemon peel oil *J. Nat. Prod. Plant Resour.*, 2 (3) pp. 431-435
- Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M., & Tawata, S. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food Control*. 19, pp. 346-352

Décret exécutif n° 35 du Aouel Safar 1419 correspondant au 27 mai 1998. Conventions et accords internationaux- lois et décrets arrêtés décisions, avis, communications et annonces, Journal officiel algérien, 26 p.

Demazeaud M. 1997. *Le lait de fromagerie, aptitude du lait en développement de la flore lactique, dans le fromage de la science à l'assurance qualité*. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris. pp. 212- 227

Directive du Conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine (89/107/CEE). Journal Officiel des Communautés Européennes n° L 40 du 11.2.1989, p. 27

Directive du Conseil du 22 juin 1988 relative au rapprochement des législations des États membres dans le domaine des arômes destinés à être employés dans les denrées alimentaires et des matériaux de base pour leur production (88/388/CEE). Journal Officiel des Communautés Européennes n° L 184 du 15.7.1988, 61 p.

Djenane D., Yangüela Y., Gomez D., Roncales P. 2011. Perspectives on the use of essential oils as antibacterials against *Campylobacter jejuni* CECT7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food*.

Dugo G., Di Bella G., Saitta M. 2011. Contaminants in Citrus Essential Oils: State of The Art (2000–2009). In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp. 513- 527

Dugo Giacomo et Di Bella, G. 2002. Contaminants in citrus essential oils. In *Citrus*, eds. G. Dugo, and A. Di Giacomo,. London and New York: Taylor & Francis, pp. 518–531

Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C. 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 3632-3639.

Dupuy A. 2010. Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).France. 305 p.

El Kalamouni C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. *Thèse de doctorat*. Université De Toulouse, France. 228 p.

Ela, M.A., El-Shaer, N.S., Ghanem, N.B. 1996. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils, *Pharmazie*, 51, pp.993-995

Everett D.W. 2007. Cream Products, Chap. 32. In Hui Y. H., Chandan R.C., Clark S. et al. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp. 725- 749

Eymard S. 2003. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. *Thèse Doctorat*, Université de Nantes, France, 217 p.

- Eyob S., Martinsen B.K., Tsegaye A., Appelgren M. and Skrede G. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen). *African Journal of Biotechnology*, 7 (15), pp.2585-2592
- Fairbairn D.J., Law B.A. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* In Haddadi K., (2006). Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de l'inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas d'*Escherichia coli*). *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Lorraine, Ecole Supérieure D'agronomie Et Des Industries Alimentaires, France. 118 p.
- FAO., 2010 .Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine- Laites de consommation <http://www.horizon.documentation.ird.fr>
- Faucher J.L., Avril J.L. 2002. *Bactériologie générale et médicale*. Tome 1, Ellipses (Ed.), Paris, 214 p.
- Ferdeş M., Ungureanu C., 2012. Antimicrobial activity of essential oils against four food-borne fungal strains. *U.P.B. Sci. Bull., Series B*, 74 (2), pp. 87-98
- Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010. *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.
- Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez- Alvarez J. A., Kuri, V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69(3), pp. 371-380
- Ferreira A., Proenc C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* ,108, pp.31–37
- Fillatre Y. 2011. Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. *Thèse de doctorat* (volume 1), université d'Angers, France. 266 p.
- Fisher K. et Phillips C. 2008. Potentiel antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer ? A review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, pp.156-164
- Fisher, K. and C.A. Phillips, 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J. Appl. Microbiol.*, 101, pp. 1232–1240
- Fisher, K., Rowe, C., Phillips, C. 2007. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. *Letters in Applied Microbiology*, 44, pp. 495-499
- Fredot É. 2005. *Connaissance des aliments : bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique*. Ed. TEC et DOC, Paris. pp. 295-336
- Frolich-Wyder, M.-T. 2003. *Yeasts in dairy products*. In *Yeasts in Food*, eds T. Boekhout and V. Robert. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. pp. 209–237

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*,102, pp. 898-904
- Geldel 1996. Les salmonelles In Bourgeois CM.,MESCLE JF.,ZUCCA J. *microbiologie alimentaire*.Ed. Technique et Documentation,Lavoisier, Paris.p.6
- Girard G. 2010. Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco -Dentaires d’hier a au jour d’hui : Mise au point d’un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en pharmacie. Université Henri Poincare - Nancy 1. 100 p.
- Girenavar B., Jayaprakasha G.K., Jadegoud Y., Nagana Gowda G.A., Patil B.S. 2007. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorg Med Chem.* 15(11) pp. 3684–91
- Goris A. 1967. *Manuel de botanique*. Ed. Clin. pp. 265-268
- Gouget M., Mouillet L., Bonjean- Linczowski Y. 1992. Additifs utilisés dans les produits laitiers. In In Multon J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*.2^{ème} Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 647-664
- Goursaud J. 1985. *Composition et propriétés physicochimiques du lait : lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre*. Tome 1 : lait de manuelle à la laiterie. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 311 p.
- Grieve A.P., Kitchen J.B., 1985. Proteolysis in milk: The significance of proteinase originating from milk leukocyte and a comparison of the action leukocyte, bacterial and milk proteinases on casein. *J. Dairy Sci.*, in Haddadi K.2006. Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de L’inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas D’*Escherichia coli*). *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Lorraine, Ecole Supérieure D’agronomie Et Des Industries Alimentaires, France.118 p.
- Groupe d’étude des marchés de restauration collective et de nutrition (GEM RCN). 2009. *Spécification technique de l’achat public laits et produits laitiers*. N° 2009-03 du 30 juillet 2009 du comité exécutif de l’OEAP, Ministère de l’économie de l’industrie et de l’emploi de la république française. 47 p.
- Groupe de recherche et d’échanges technologiques (GRET). 2002. *Transformer les produits laitiers frais à la ferme*. Ed. Educagri, réseau produits fermiers du ministère de l’agriculture et de la pêche, France, 237 p.
- Grysole J. 2005. La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d’analyse. et de séparation. des essences. végétales), Québec, pp.139-162
- Guinot-Thomas P., Al Ammouy M., Le Roux Y., Laurent F. 1995. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: effect of plasmin and microbial proteinases. *Int. Dairy J.* in Haddadi K. 2006. Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de L’inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas

- d'*escherichia coli*). *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Lorraine, Ecole Supérieure D'agronomie Et Des Industries Alimentaires, France. 118 p.
- Guiraud, J.P. 2003. *Microbiologie alimentaire*. Ed. Paris: Dunod. 653p.
- Haddadi K. 2006. Mécanismes de la protéolyse dans le lait lors de L'inflammation de la glande mammaire chez la vache laitière : Activité des protéases leucocytaires et des protéases bactériennes (cas d'*escherichia coli*). *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Lorraine, Ecole Supérieure D'agronomie Et Des Industries Alimentaires, France. 118 p.
- Hammer K. A. Carson C. F. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255 – 295
- Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), pp. 985-990
- Hazzit M. 2008. Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. *Thèse de doctorat*, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Faculté de Chimie, Algérie, 204 p.
- Hellal Z. 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.
- Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, pp. 44-50
- Heuchel V., Chatelin Y.M., Breau S., Sobolewski F., Blancard N., Baraton Y. et Ayerbe A. 2003. Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Rech. Ruminants*, 10 .pp. 223-226
- Himed L. 2011. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. 65 p.
- Hinou J.B. Harvala C.E., Hinou E.B. 1989. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie* 44, 4 p.
- Hoffmann W. 2011. Cream : Manufacture, Products in Fuquay J. W., Fox P. F. et McSweeney P.L. H. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2ème Ed. Elsevier Ltd. London (UK), 1, pp. 912-925
- Holley R.A., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22(4) pp. 273–292
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S., Nigam P.S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, pp.1070-1078

- Innouye S., Takizwa T., Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by Gaseous contact. *J. Antimi. Chemo.*, 47, pp. 565-573
- Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F. *et al.* 2001. *Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparations, soins*. 2^{ème} Ed. Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française Paris. 335 p.
- Jacob M., Pellecuer J., Tomei R. 1979. Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 11: pp. 26-30
- James, S.A. and Stratford, M. 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. In *Yeasts in Food*, eds T. Boekhout and V. Robert. Cambridge, UK: *Woodhead Publishing*. pp. 171–191
- Jamotte P. 1967. Le lait : Dégradation de la matière grasse par lipolyse, NO 461-462, *Station laitière de Gembloux* (Belgique), pp. 25- 42
- Jazet Dongmo P. M., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P. H. A., Menut C. 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agriculture And Biology Journal Of North America*, 1(4), pp. 606-611
- Jeantat R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. 2006a. *Science des aliments*. Tome 1: *Stabilisation biologique et physico-chimique*. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris, 383 p.
- Jeantat R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. 2006b. *Science des aliments*. Tome 2: *technologie des produits alimentaires*. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. 456 p.
- Jeantat R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G. 2008. *Les produits laitiers*. 2 ed: tec et doc, Lavoisier, Paris, 185 p.
- Journal Officiel de la république Algérienne. 1993. Arrêté interministériel du 29 Safar 1414 correspondant au 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation ,N° JORA : 069 du 27-10-1993.
- Just N., Nyunga M., Lelong J., Wallaert B. 2005. Allergie immédiate aux glucocorticoïdes de synthèse oraux. *La Revue de Médecine Interne*, 26, pp. 331-334
- Kaufmann B. et Christen P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, pp.105-113
- Kim J. M., Marshall M. R., Cornell J. A., Preston J. F., Wei C. I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*, 60, pp. 1364-1374
- Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components.. In Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., Talbi M. 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *CLADANTHUS MIXTUS*. *J.Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 85-96

- Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A. 2007. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT e Food Science and Technology*, 41, pp. 119-127
- Kouame A.E.F. 2004. Etude de la migration des antioxydants phénoliques dans les boissons en sachets (Abidjan- Cote D'Ivoire). *Thèse de doctorat*, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 72p.
- Kumar, R., Srivastava, P.K., and Srivastava, S.P. 1994. Leaching of heavy metals (Cr, Fe, and Ni) from stainless steel utensils in food simulants and food materials. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53, pp. 259–266
- Kurtzman C.P., Fell J.W. 1998. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier.
- Kurtzman C.P., James S.A. 2006. Zygosaccharomyces and related genera. In *Food Spoilage Microorganisms*, ed. C. de W. Blackburn. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. pp. 289–305
- Kuzdzal-Savoie S. 1982. In Heuchel V., Chatelin Y.M., Breau S., Sobolewski F., Blancard N., Baraton Y. et Ayerbe A. 2003. Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Rech. Ruminants*, 10, pp. 223-226
- Labioui H., Laarousi E., Benzakour A., El Yachoui M., Berny E. et Ouhssine M. 2009. Étude physico-chimique et Microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, pp. 7-16
- Leclerc H. 1984. Le citron : *Les fruits de France*. 9^{ème} Ed. Masson. France. 274 p.
- Lesley B. 1996. *Plantes médicinales et aromatiques*. Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61
- Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F., 2006. Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, pp. 477-485
- Lopandic K., Zelger S., Ba nszky L.K., Eliskases-Lechner F., Prillinger H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *J Food Microbiology*, 23, pp. 341–350
- Lucchesi M.E. 2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies. 143p.
- Lupien J., 1998. *Lait et produits laitiers dans l'alimentation humaine*. Code FAO : Alimentation et nutrition N°28. 501 p.
- Maan C.M., Cox S.D., Marham J.L. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*, 30, pp. 294-297
- Mahaut M. Jeantet R., Schuck P. et Brute G. 2000. *Les produits d'industriels laitiers*. Ed. tec et doc, Lavoisier, Paris. 187p.
- Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-Shik S., Dong- Suk, C., Suzuki, T. 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21(6), pp. 657- 666

- Malecky M. 2007. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). Paris, 206 p.
- Marinova E. et Yanishlieva N. 1992. Inhibited oxidation of lipids II: comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. *J. Fat Science Technology*, 94, pp. 428-432
- Martel P. et Pescal G., 1992. Additifs antioxygènes. In Multon J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agro-alimentaires*. Ed. Lavoisier, Tec. et Doc. Paris, pp.191-223
- Martin M. 2000. *Technologie des laits de consommation*. Ed. ENIL V. Candia.
- Mayachiew P. et Devahastin S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*, 41, pp. 1153-1159
- Meena, M.R., et Sethi, V.1994. Antimicrobial activity of the essential oils from spices, *J. Food Sc. Techn. Mysore*, 31, pp. 68-70
- Mejlholm, O. et P. Dalgaard. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, pp. 27-31
- Merabti R. 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire de magistère. Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine, Algérie, 85 p.
- Misharina T.A., Samusenko A.L. 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 44(4), pp. 482–6
- Moll M. 1998. *Additifs alimentaires et auxiliaires technologique*. Ed. Dunod. Paris. pp. 89-99
- Moller S. 2000. *La reconstitution du lait*. Ed. Sodiaal, Ivry sur seine. France. 50 p.
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Cicero L., Dugo P., Dugo G. 2003. Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(19), pp.5602-5606
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P. Q., Dugo P., Dugo G. 2005. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.*, 20(2), pp.136-140
- Moreira M. R., Ponce A. G., del Valle C. E., Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT e Food Science and Technology*, 38(5), pp. 565-570
- Morelle J. 1988. Peroxydes lipidiques, radicaux libres, vieillissement et lipoaminoacides, *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 80, pp. 91-104
- Nessrien M.N.Y. et Mohamed A.T. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2 (1), pp. 01-09
- NF ISO 4832 : 2006. Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.

- NF V 09-012, 1983. Recueil des Normes Françaises d'agroalimentaire «analyses esensorielles ». Ed. AFNOR, Paris
- Nikhat F., Satynarayana D., Subhramanyam E.V.S. 2009. Isolation, charectrisation and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygiumcumini* (L) Skeel. *Asian J. Research Chem.* 2(2), pp. 218-221
- OFSP. Office fédéral de la santé publique. Les huiles essentielles. Ed. OFSP, Avril 2009, Suisse. 5 p.
- Olle M. and Bender I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, 8 (3), pp.687-696
- Oudiot C. 1992. Rôle et intérêt des additifs alimentaires en technologie alimentaire. In Multon J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. 2^{ème} Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 34-45
- Oudiot C. 1999. *La transformation des aliments: Génie alimentaire*. Ed. Casteilla, France .79 p.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), pp. 1046-1055
- Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C., Casanovad J. 2008. Etude chimique et activite antidiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research.* , 24,(1), pp. 94-103
- Oyaizu M. 1986. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 35, pp.771-775
- Padrini F., Lucheroni M. T. 1996. *Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies*. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111.
- Paris R., Godon M. 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- Parish E. P., Baum D., Kryger R., Goodrich R., Baum, R. 2003. Fate of Salmonellae in citrus oils and aqueous aroma. *Journal of Food Protection*, 66(9), pp. 1704-1707
- Pauli A. et Schilcher H. 2010. *In Vitro* Antimicrobial Activities of Essential Oils Monographed in the European Pharmacopoeia 6th Edition, In , In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America., pp.353-548
- Perez-Bonilla M., Salido S., Van deek T.A., Linares-Palomino P.J., Altarejos J., Nogueras M. et Sanchez A. 2006. Isolation and identification of radical scavengers in olive (*Olea Europaea*) wood. *Journal of chromatography A*, 1112, pp. 311-318
- Perfumer et Flavorist, 2009. A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34, January 2009. In Baser K. H. C., Buchbauer G. 2010.

- Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, New York, pp. 151-183
- Petraxienne D. et Lapied L. 1981. La qualité bactériologique du lait et de produits laitiers. 2^{ème} Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 288 p.
- Pingot A. 1998. *Les huiles essentielles*. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230- 236
- Piochon M. 2008. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. *Thèse de doctorat*. Université du Québec, pp. 5-9
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3thedn.: Springer Science- Business Media, USA, 519 p.
- Pol I. E., Mastwijk H. C., Slump R. A., Popa M. E, Smid E. J. 2001. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64, pp. 1012– 1018
- Portes E. 2008. Synthèse et Etudes de étrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. N° 3695. Université Bordeaux I, 244 p.
- Praloran J.C. 1971. *Les agrumes*. Ed. Maisonneuve et Larose, Paris, 567 p.
- Pratt D.E. 1980. Natural antioxidants of soybean and other oil seeds. Ed. M.G. Simic, and M. Karel, *Plenum, Autoxidation in food and biological systems*, pp. 261-282
- Prior E. 2003. *Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire*. In : Graille J, ed. Lipides et corps gras alimentaires, pp. 87-147
- Razakarivony A.A., Andriamihaja B., Razanamahefa B. 2009. Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. *Actes du symposium biomad*. Université d'Antananarivo. 28 p.
- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T., Ettayebi M. 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.*, 5, pp. 1179-1184
- Robert A. et Lobstein A., 2005. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- Rodov V., Ben-Yoshua S., Fang D. Q., Kim J. J., Ashkenazi R. 1995. Preformed antifungal compounds of lemon fruit: Citral and its relation to disease resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, pp. 1057–1061
- Rojas-Grau M. A., Avena-Bustillos R. J., Olsen C., Friedman M., Henika P. R., Martin-Belloso O., et al. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634 p.

- Roux D. 2008. *Conseil en aromathérapie*. 2^{ème} Ed. Pro-Officina., 187 p.
- Rowe M. et Donaghy J. 2011. Microbiological Aspects of Dairy Ingredients in Chandan R. C., Kilara A. *Dairy Ingredients for Food Processing*. Ed. Blackwell Publishing Ltd. pp. 59-102
- Rožman T., Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93(1), pp.51-58
- Rusenova N., Parvanov P. 2009. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, 7 (1) , pp. 37-43
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59, pp. 201–22
- Sina L. 1992. Contrôle de qualité du lait et des produits laitiers fabriqués par la SOCA. *Thèse de doctorat* : Ecole inter-etats des sciences et médecine vétérinaires E.I.S.M.V. Université cheikh Anta Diop de Dakar, 245 p.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.*, 18(4), pp. 463–70
- Société suisse pour la protection (SPE) 1987. Les agents conservateurs (lutes contre les microbes et les réactions chimiques). In *Additifs alimentaires – souvent superflus parfois bienvenus*-. 2^{ème} Ed. GERG, Genève, pp. 83-93
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 1996. Fruit. In “*Food composition and nutrition tables*”. Ed. CRC. pp.892-929
- Souverien R. 1992. Définitions et classements. In Multon J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. 2^{ème} Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 3-31
- Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O. 2006. Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1), pp. 22-25
- Subba M. S., Southmithri T. C., Suryanarayana, R. 1967. Antimicrobial action of citrus oils. *Journal of Food Science*, 32, pp. 225-227
- Tang S., Shcchan D., Buckley D.J., Morrissey P.A., Kerry J.P. 2001. Anti-oxidant activity of added tea catechines on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, pp. 685- 692
- Tassou C., Drosinos E. H., Nychas G.-J. E. 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp. 593– 600
- Tepe B., Akpulat H. A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E. 2006. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisatum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), pp.719 –724
- Tranchida P. Q. , Dugo P., Mondello L., Dugo G. 2011. Advanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus Oils In Dugo G. et Mondello L. *Citrus Oils: Composition, Advanced Analytical*

- Techniques, Contaminants, and Biological Activity*. London and New York: Taylor and Francis Group. pp. 477- 511
- Tserennadmid R., Takó M., Galgóczy L., Papp T., Pesti M., Vágvölgyi C., Almássy K., Krisch J, 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144 , pp. 480–486
- Uribe S., Ramirez J., Pena A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161, pp.1195–1200
- Valnet J. 2001. *La santé par les fruits, légumes et les céréales*. Ed Vigot. France, 411 p.
- Veldhuizen E. J., Tjeerdsma-van Bokhoven J. L., Zweijtzer C., Burt S. A., Haagsman H. P. 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 1874–1879
- Vierling E. 1999. *Aliments et boissons : Filières et produits*. Ed. Doin, France, 270 p.
- Vignola CL. 2002. *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Ed. école polytechnique de Montréal. Québec. 600 p.
- Watts B.M., Ylimaki G.L., Jeffery L.E., Elias L.G., 1991. Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments. Ed. Centre de recherches pour le développement international, Amérique, 145 p.
- Weber F. 1994. *Altération des produits laitiers par les bactéries lactiques : bactéries lactiques; aspects fondamentaux et technologiques*. Ed. Loria, Paris II .pp. 567- 572
- Weiss E.R., Braddock R.J., Goodrich R.M., Gregory J.F., Pika J. 2003a. Occurrence and preclusion of terpene chlorohydrins in citrus essential oils. *J. Food Sci.*, 68, pp. 2146–2149
- Weiss E.R., Pika J., Braddock R.J. 2003b. Isolation and identification of terpene chlorohydrins found in cold-pressed orange oil. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp. 2277–2282
- Wilbey R. A. 2002. Microbiology of cream and butter. Chapter 4. In Robinson R.K. *Dairy microbiology handbook*. 3^{ème} Ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 123-170
- West S.D., Turner L.G. 2000. Determination of spinosad and its metabolites in citrus crops and orange processed commodities by HPLC with UV detection. *J. Agric. Food Chem.* , 48, pp. 366–372
- Wickerham L .J.(1951).Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin No. 1029. In Merabti R., 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire magister, Université constantine, Algérie. 85 p.
- Wickerham L .J., Burton K .A .1948. Journal of Bacteriology. In Merabti R., 2006. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Mémoire magister, Université constantine, Algérie. 85 p.
- Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII. pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405 p.

Wuryatmo, E., Klieber, A., and Scott. E.S. 2003. Inhibition of *citrus* postharvest pathogens by vapor of citral and related compounds in culture. *J. Agric. Food Chem.*,51, pp .2637–40

Yang E.-J., Kim S.-S., Oh T.-H., Baik J.S., Lee N.H. and Hyun C.-G. 2009. Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens *Int. J. Agric. Biol.*, 11, pp. 791–794

Zellner B. A., Dugo P., Dugo G., Mondello L. 2010. Analysis of essential oils. In Baser K. H. C., Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, New York,pp. 151-183

Annexes



Annexe 1. Filtre 0,22 μm (MILLIPORE MILLEX GS)

Annexe 2. Bulletin du test de comparaison par paire

Date :				N° Dégustateur :	
Nom :					
But de l'essai :					
Critère en essai :					
Paires en essai		Y a-t-il une différence ?		Quel est l'échantillon le plus aromatisé ?	Quel est l'échantillon préféré ?
Code n° /code n°					
....	Oui	Non
....	Oui	Non
....	Oui	Non
....	Oui	Non
....	Oui	Non
....	Oui	Non
Observation :					

Annexe 3. Table de Roessler, Baker et Amerine pour les tests de comparaison par paire

DEGUSTATEUR	DIFFERENCE			PREFERENCE		
	5%	1%	0, 1%	5%	1%	0,1%
7	7	7	-	7	-	-
8	7	8	-	8	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	10	9	10	-
11	9	10	11	10	11	11
12	10	11	2	10	11	12
13	10	12	13	11	12	13
14	11	12	13	12	13	14
15	12	13	14	12	13	14
16	12	14	15	13	14	15
17	13	14	16	13	15	16
18	13	15	16	14	15	17
19	14	15	17	15	16	17
20	15	16	18	15	17	18
21	15	17	18	16	17	19
22	16	17	19	17	18	19
23	16	18	20	17	19	20
24	17	19	20	18	19	21
25	18	19	21	18	20	21
30	20	22	24	21	23	25
35	23	25	27	24	26	28
40	26	28	31	27	29	31
45	29	31	34	30	32	34
50	32	34	37	33	35	37
60	37	40	43	39	41	44
70	43	46	49	44	47	50
80	80	51	55	50	52	56
90	54	57	61	55	58	61
100	59	63	66	61	64	67

Annexe 4. Bulletin du test de classement par rang

FICHE DE TEST DE CLASSEMENT		N°Dégustateur :
NOM :		
PRENOM :		
-Veuillez classer les quatre échantillons par ordre de préférence		
Code	DATE :	
_____	Classement	_____
_____		_____
_____		_____
_____		_____

Annexe 5. Différences des sommes de classement par rang absolu critiques pour les comparaisons de «tous les traitements» à un seuil de signification de 1 %

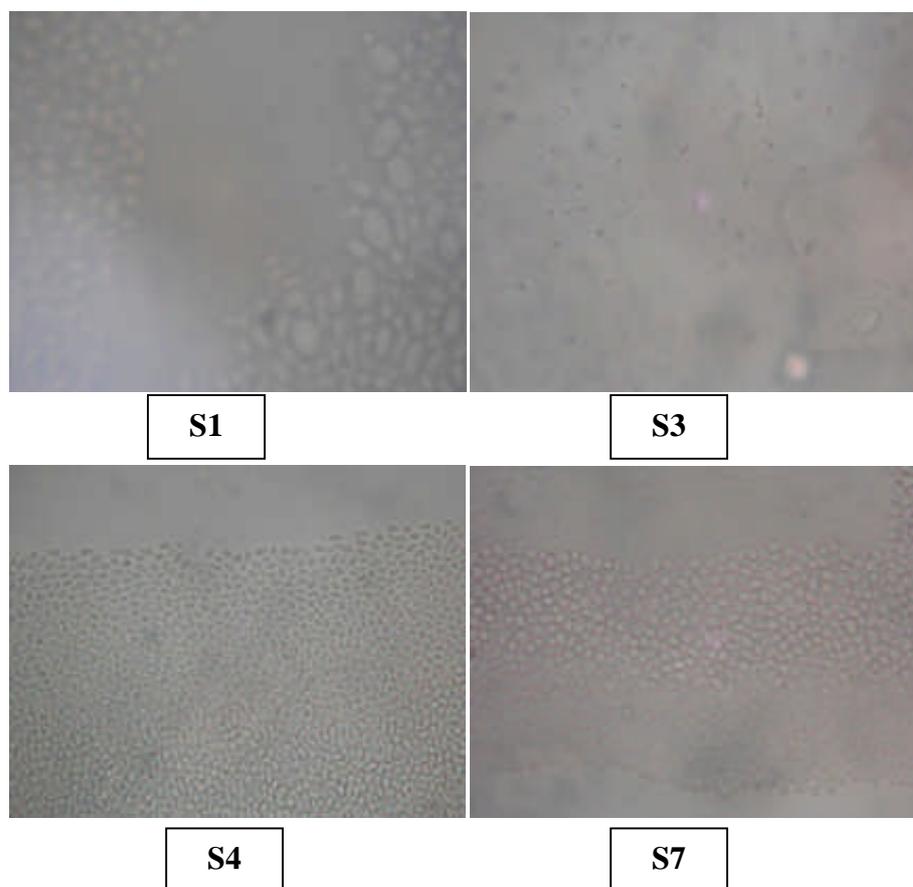
Dégustateurs	Nombre d'échantillons									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	6	8	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	39	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	26	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	76
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	96	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
95	33	46	60	74	88	103	118	133	148	163
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

Annexe 6. Bulletin pour le test hédonique avec un barème de notation allant de 1 à 9

FICHE DE TEST HEDONIQUE		N°Dégustateur :			
NOM :					
PRENOM :					
DATE :					
Veuillez examiner et goûter chaque échantillon de crème fraîche, et donnez une note de 1 à 9 selon l'intensité du caractère.					
		Echantillon			
		A	B	C	D
texture	liquide				
	grasse				
	crémeuse				
	onctueuse				
	fluide				
	fine				
	souple				
Couleur	jaune				
Odeur	levuré				
	crème fraîche				
	herbe vert				
	fruits secs				
	citron				
	de rance				
Goût	acide				
	salé				
	sucré				
	amère				
arôme	crème fraiche				
	citron				
	noisette				
	lait cru				
	fruits secs				
Remarque : Si l'attribut mentionné dans la fiche n'est pas détecté dans le produit, vous mettez 0, la note doit être attribuée en fonction de l'intensité du goût.					



Annexe 7. Les fruits du *Citrus limon* « Eurêka »



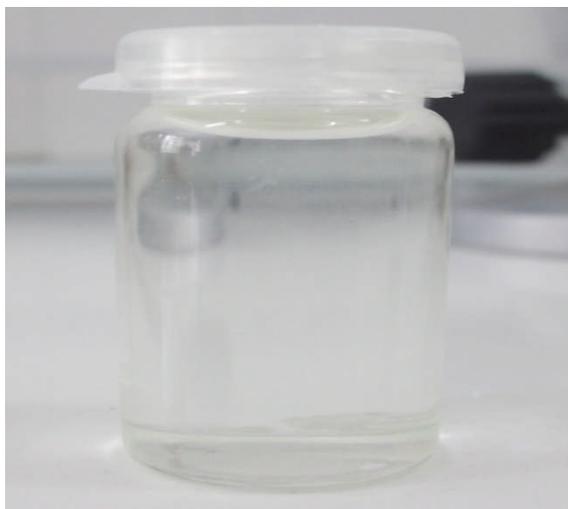
Annexe 8. Observation microscopique de filamentation des souches S1, S3, S4 et S7 après 48 heures d'incubation (GX40)

Annexe 9. Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre le taux d'incorporation en huile essentielles et les paramètres physicochimiques et Les caractéristiques sensoriels

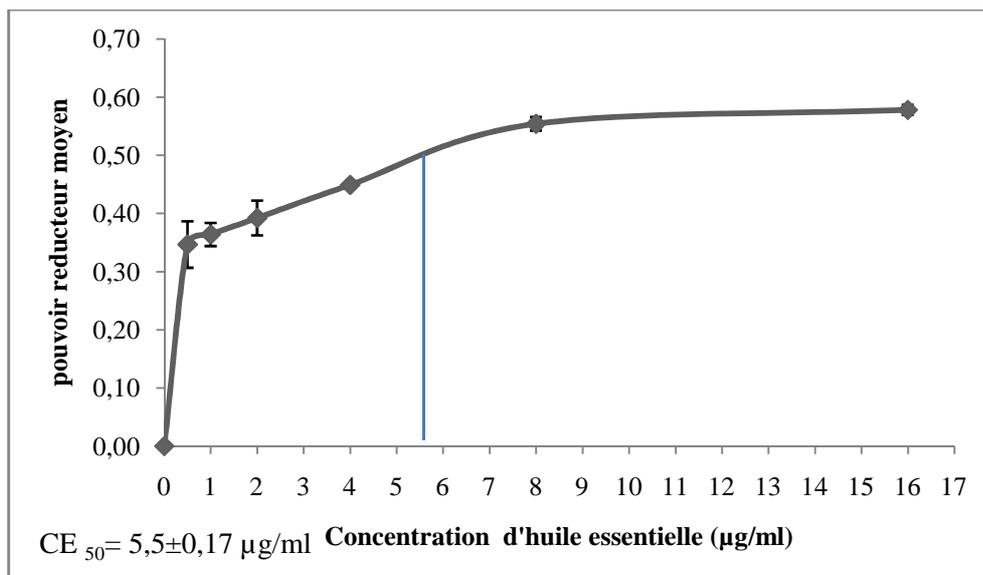
	HE	ES	MG	pH	Acidité titrable	MDA	Tex. liquide	Tex. grasse	Texture crémeuse	Texture Onc.
HE	1	-0,193	0,000	-0,216	-0,683	-0,824	-0,878	-0,194	0,940	0,255

	Texture Fluide	Texture fine	Texture souple	Texture nappante	Couleur jaune	Odeur levure	Odeur CF.	Odeur herbe vert	Odeur fruit sec	Odeur citron
HE	-0,772	0,118	-0,019	0,748	0,956	-0,938	-0,934	0,818	-0,507	0,883

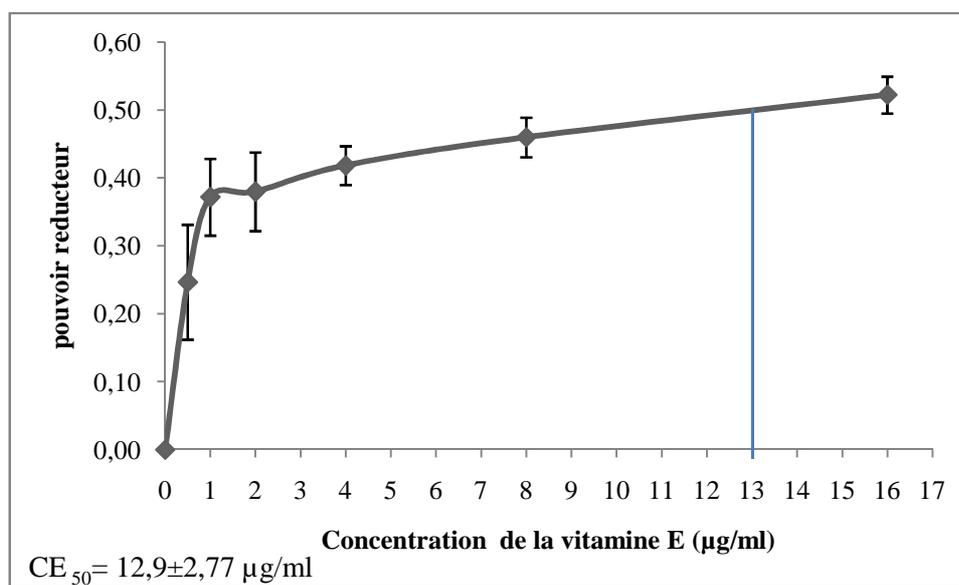
	Odeur rance	Goût acide	Goût salé	Goût sucré	Goût amer	Arôme CF.	Arôme Citron	Arôme Noisette	Arôme Lait cru	Arôme fruit sec
HE	0,076	-0,332	-0,683	0,764	0,892	-0,898	0,897	0,561	-0,998	-0,293



Annexe 10. Huile essentielle de *Citrus limon*



Annexe 11. Pouvoir réducteur d'huile essentielle de *Citrus limon*



Annexe 12. Pouvoir réducteur d'huile essentielle de la vitamine E

This study was conducted in order to enhance the lemon peel (*Citrus limon*) by using their essential oil as a natural agent for preservation and aromatization in cream in order to diversify the types of existing cream on the market.

This essential oil was extracted by hydrodistillation, extraction yield was $0,89 \pm 0,09\%$. The antioxidant activity of the extracted essential oil was studied by the DPPH° test, this free radical has been effectively reduced, compared to vitamin E. These results were confirmed by the test of β -carotene bleaching.

The study of antimicrobial activity of essential oil of *C. limon* showed that two tested bacteria are resistant against the effectiveness of the oil, resulting in very high MICs (4% and > 8%). Regarding yeast strains isolated and tested *Debaryomyces sp.* and *Rhodotorula sp.*, they have some sensitivity to the effect of essential oil, characterized by CMI respectively 0,25% and 0,5%. The other two strains *Zygosaccharomyces sp1* and *Zygosaccharomyces sp2*, were resistant, their MICs are respectively in the order of 1% and > 4%.

The various tests on the formulation of the added essential oil of *C. limon* creams were tested by developing three fresh creams with concentrations of 0,125%, 0,25%, 0,5%. Characteristics are conforms to standard. The results of physicochemical and microbiological analyzes prepared fresh cream after opening the package, show that the presence of the essential oil at low concentrations does not limit microbial spoilage. The evaluation of the oxidative stability by Schaal test indicates that the fresh cream with essential oil of *C. limon* are more resistant than the control opposite the forced oxidation.

Sensory analysis show that the incorporation of essential oil in the cream, at concentrations of 0,125% and 0,25%, involves no significant difference ($p > 0,05$) in terms of flavoring, and make products which are classified in same order than the control. Only the rate of incorporation of the essential oil of 0,5% significantly downgraded the product compared to the control in the third row, which has led to changes in smell and flavor while the texture, color and taste are unchanged. The principal component analysis (PCA) showed a negative correlation ($r = - 0,998$) between the levels of incorporation of the essential oil and the aroma of raw milk, and a positive correlation ($r = 0,956$) with the color yellow.

Keywords: Cream, yeast, bacteria, essential oil, lemon zest, sensory analysis

ملخص :

تهدف هذه الدراسة من جهة الى استغلال قشور الليمون بإستعمال زيوتها الأساسية كحافظ ومعطر في القشدة الطازجة ، ومن جهة اخرى الى تنوع القشدة الموجودة في السوق .

تم استخلاص هذه الزيوت الأساسية بتقنية التقطير المائي حيث ان المردود المتحصل عليه هو : $0,89 \pm 0,09$ %

دراسة الفعالية المضادة بطريقتين طريقة DPPH وطريقة تبييض β -كاروتين للزيوت الأساسية لقشور الليمون ، أثبتت فعاليتها بالمقارنة مع فيتامين هـ.

كما أن دراسة النشاط المضاد للميكروبات ضد نوعين من البكتيريا أظهر مقاومتها لمفعول الزيوت الأساسية حيث أن تراكيزها الصغرى محصورة بين (4% وأكبر من 8%).

كما أثبتت هذه الدراسة ايضا مقاومة نوعين من الخمائر المعزولة (*Zygosacchomyces sp1* و *Zygosacchomyces sp2*) في القشدة الطازجة الفاسدة .

حيث ان تراكيزها الصغرى (1% ، وأكبر من 4%) ولكن نوعين آخرين من الخمائر (*Debaryomyces sp* و *Rhodotorula sp*) اظهرت بعض الحساسية لمفعول الزيوت الأساسية وتراكيزها الصغرى هي (0,25% و 0,5%) .

التحاليل المختلفة المجربة على القشدة المضاف إليها الزيوت الأساسية بالتراكيز التالية (0,125% ، 0,25% و 0,5%) اثبتت مطابقتها للمقاييس .

نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجية المجربة على القشدة الطازجة المحضرة . بعد فتح العبوة المعبئة اثبتت أن وجود الزيوت الأساسية لا يحد من فساد القشدة بالميكروبات

تقييم استقرار الأكسدة تمت باختيار شال ، وقد أثبتت النتائج المتحصل عليها أن القشدة الطازجة المضاف إليها الزيوت الأساسية لقشور الليمون أكثر مقاومة للأكسدة الحتمية بالمقارنة مع القشدة الطازجة بدون زيوت أساسية .

اثبتت التحاليل الحسية أن إضافة الزيوت الأساسية الى القشدة بتراكيز (0,25% و 0,5%) لا يحدث فرق في النكهة ، مما أدى الى تصنيفها في نفس المرتبة مقارنة بالشاهد .

تركيز 0,5% من الزيوت الأساسية المضاف الى القشدة أدى الى تصنيفها في المرتبة الثالثة مقارنة بالشاهد

اين سبب تغييرات معتبرة في الرائحة والنكهة ولكنه حافظ على خصائص اللون والذوق .

أظهر تحليل المكونات الأساسية وجود توافق دلالي سلبي بين نسبة إضافة الزيوت الأساسية ونكهة الحليب الطازج .

ووجود توافق دلالي ايجابي بين نسبة إضافة الزيوت الأساسية واللون الأصفر .

كلمات المفتاح : القشدة الطازجة ، الخمائر ، البيكتيريا ، الزيوت الأساسية ، قشور الليمون ، التحاليل الحسية .

Cette étude a été conduite dans le but de valoriser les écorces du citron (*Citrus limon*) par l'utilisation de leur huile essentielle comme agent naturel conservateur et aromatique dans la crème fraîche afin de diversifier les différents types de crème fraîche déjà existants. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation, le rendement obtenu est équivalent à $0,89 \pm 0,09\%$. L'activité antioxydante des huiles extraites a été étudiée par le test de DPPH°, ce radical puissant a été efficacement réduit, par comparaison à la vitamine E. Ces résultats ont été confirmés par le test de blanchissement du β -carotène.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *C. limon* a révélé la résistance des bactéries testées, se traduisant par des CMI très élevées (4% et >8%). Les souches de levures isolées puis testées *Debaryomyces sp.* et *Rhodotorula sp.* présentent une certaine sensibilité à l'effet de l'huile essentielle, se caractérisant par des CMI respectivement de 0,25% et 0,5%. Les autres souches *Zygosaccharomyces sp1* et *Zygosaccharomyces sp2* sont résistantes, leurs CMI sont respectivement de l'ordre de 1% et > 4%.

Les analyses physico-chimiques et microbiologiques effectuées sur les crèmes fraîches additionnées de l'huile essentielle de *C. limon* à des concentrations de 0,125%, 0,25%, 0,5% après ouverture de l'emballage montrent que la présence de l'huile essentielle aux faibles concentrations ne limite pas l'altération microbienne. L'évaluation de la stabilité oxydative par le test Schaal indique que les crèmes fraîches à l'huile essentielle de *C. limon* sont plus résistantes que le témoin vis-à-vis l'oxydation forcée.

L'incorporation de l'huile essentielle dans la crème fraîche à des concentrations de 0,125% et 0,25% n'entraîne aucune différence significative du point de vue aromatisation, et donnent des produits classés indifféremment avec le témoin. Le taux d'incorporation de l'huile essentielle de 0,5% a déclassé significativement le produit par rapport au témoin en troisième rang, en donnant l'odeur et l'arôme du citron. L'analyse en composantes principales montre une corrélation significativement négative entre le taux d'incorporation en HE et l'arôme du lait cru et une corrélation positive avec la couleur jaune.

Mots clés:

Crème fraîche, levures, bactéries, huile essentielle, écorce de citron, analyse sensorielle