

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGRO/2019

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOMEMASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

MAAMERI Chourouk
BAGHDALI Zohra

Thème

**Essai de mise au point d'un fromage frais enrichi avec les
graines du pin d'Alep « *Pinus halepensis Mill.* »**

Soutenu le : 21 / 09 / 2019

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>KADRI Nabil</i>	<i>MCA</i>	<i>FSNVST/Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>DAHMOUNE Farid</i>	<i>MCA</i>	<i>FSNVST/Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>
<i>REMINI Hocine</i>	<i>MCB</i>	<i>FSNVST/Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>SAHRAOUI Yasmine</i>	<i>MCB</i>	<i>FS/Univ. De Boumerdès</i>	<i>Copromotrice</i>

Année Universitaire : 2018/2019



❁ **REMERCIEMENT**



AU terme de la rédaction de ce mémoire, nous remercions :

❁ ***ALLAH** qui nous a toujours donnée la force de passer à travers les épreuves et les découragements, qui nous a aidée à mener à terme cette recherche.*

❁ *Nous tenons à remercier sincèrement notre promoteur de mémoire monsieur «**REMINI HOCINE**», que quelques mots ne suffisent pas à exprimer nos profondes gratitude pour la confiance que vous nous avez accordée en acceptant de superviser ce travail.*

Un grand merci également à:

*La Co promotrice madame «**YASMINE SAHRAOUI**»,*

❁ *s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, la gentillesse, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Les membres de jury Mnr **Kadri Nabil** et Mnr **Dahmoun Farid** d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner ce travail*



A toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, nous disons merci



DEDICACE

*Avec un énorme plaisir, un coeur ouvert
et une immense joie je dédie ce modeste travail :*

A mes chers parents

*Aucune dédicace et aucun mot ne pourraient exprimer à leur juste valeur la gratitude
et l'amour que je vous porte.*

Vous êtes la lumière de mes jours, la source de mes efforts et la flamme de mon coeur.

Que Dieu vous garde pour moi « inshallah ».

*A mes chers frères : FAROUK, WASSIM et, en témoignant de l'attachement, de l'amour et
de l'affection que je vous porte.*

A ma grande famille : MAAMERJ et BOUREBAJ.

A mes chéries : NADJELAJ et MANEL

Je vous souhaite une vie pleine de succès, de joies et de bonheur.

Merci pour tous les meilleurs moments que nous avons passés ensemble.

*A tous mes amis (es) : merci pour votre amour et encouragement avec tous mes voeux de
bonheur,
santé et réussite.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible

Je vous dis merci.

CHOUROUK ♥

Dédicace

Je dédie ce travail :

Mes chers parents, Mes frères et mes sœurs:

Mes petites

Yassmina, abir, louay abderrahmen, karim, oussama,

ines chaimaa, aymen, yasser,

meryouma, islem abdelwaheb

Monsieur Remini et madame Sahraoui

Toutes les filles de mon promo 2019

Zohra Baghdali

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE D'ABREVIATION

INTRODUCTION 01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LE PIN D'ALEP

I. Caractères botaniques du Pin d'Alep.....	02
I.1 L'écorce.....	02
I.2 Les aiguilles.....	02
I.3 Les cônes.....	02
I.4 Les graines.....	02
II. Systématique	03
III. Répartition du pin d'Alep.....	03
III.1. Dans le monde	03
III.2. En l'Algérie	04
IV. Utilisation	05
V. Les métabolites de Pin d'Alep.....	06
V.1. Les métabolites primaires	06
V.2. Les métabolites secondaires	06
V.2.1 les composés phénoliques.....	06
V.2.1.1 Définition	06
V.2.1.2. Localisation	07
V.2.1.3. Propriétés biologiques.....	07

V.2.2 Les composés terpéniques.....	09
V.2.3 Les composés azotés.....	09
VI. Méthodes d'extraction des phytomolécules.....	09
VI.1. Méthodes traditionnelles	09
VI.1.1 Infusion.....	09
VI.1.2 Décoction.....	09
VI.2. Méthodes conventionnelles.....	09
VI.2.1. Macération.....	09
VI.2.2. L'hydrodistillation.....	09
VI.3. Méthodes d'extraction non conventionnelle.....	10
VI.3.1 Extraction par ultrasons.....	10
VI.3.2 Extraction par microonde.....	10

CHAPITRE II : LAIT ET FABRICATION DE FROMAGE FRAIS

I. Généralité sur le lait	11
I.1 Microbiologie du lait.....	12
I.2 Facteurs affectant la durée de conservation du lait et des produits laitiers.....	12
II. Généralité sur le fromage frais.....	13
III. Fabrication de fromage frais	15
III.1. La préparation du lait.....	15
III.2. La coagulation.....	17
III.3. L'égouttage	17
III.4. Le salage.....	17
III.5. La conservation.....	17

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel et équipements.....	18
II. Matériel végétal.....	19
II.1. Préparation du matériel végétal	19
II.2. Extraction des bioactifs	19
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des graines de <i>Pinus halepensis Mill.</i> Vis-à-vis des souches pathogènes.....	22
III.1. Revivification et vérification de pureté des souches.....	22
III.2. Standardisation des inocula des souches pathogènes et d'altération.....	22
III.3 Tests de l'activité antimicrobienne.....	23
IV. Fabrication de fromage frais enrichis avec les graines de pin d'Alep « <i>Pinus halepensis Mill</i> ».....	24
IV.1. Analyses physico-chimique et microbiologique du lait cru.....	24
IV .1.1. Analyses physico-chimiques.....	24
IV .1.2. Analyses microbiologiques du lait cru.....	26
IV.2. Fabrication de fromage frais	28
IV.2.1. Le caillage.....	28
IV.2.2. L'égouttage et salage.....	28
IV.2.3. Enrichissement des fromages avec les graines de pin d'Alep.....	28
IV.2.3.La conservation.....	28
V. Tests sensoriels.....	28

CHAPITRE IV : RESULTAT ET DISCUSSIONS

I. Extraction des composés bioactifs à partir de la matrice végétale.....	29
II. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des graines de <i>Pinus halepensis Mill.</i> Vis-à-vis des souches pathogènes.....	30
II.1. Résultats de la pureté des souches pathogènes à testées.....	30
II.2. Activité antimicrobienne des extraits aqueux vis-à-vis des souches pathogènes.....	31
II.3 Activité antimicrobienne des extraits organiques vis-à-vis des souches pathogènes testées	31
III. La fabrication de fromage frais enrichis à partir de graine du Pin d'Alpe « <i>Pinus halepensis Mill.</i> ».....	34

III.1. Analyses de lait cru entier.....	34
III.1.1. Résultats de l'analyse physico-chimique du lait cru entier.....	34
III.1.2 Résultats des analyses microbiologiques de lait cru entier.....	35
IV. Résultats des tests sensoriels.....	35
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RESUME	

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
01	Les différentes parties de Pin d'Alep.	03
02	Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne.	04
03	Diagramme de fabrication de fromage frais.	15
04	Photographies des graines de <i>Pinus halepensis</i> Mill. A-sous forme de graines, B- sous forme de poudre brute après broyage.	19
05	Photographie de la délipidation avec l'appareil Soxhlet :A :-Montage de l'appareil soxhlet ; B :- Poudre obtenue après délipidation ; C : L'huile extraite.	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
I	Répartition de pin d'Alep en Algérie.	05
II	Les principales classes des composés phénoliques avec ses propriétés biologiques.	07
III	La composition moyenne du lait entier.	11
IV	Les différents types de fromages frais.	13
V	Composition en nutriments des différents types de fromages frais.	14
VI	La microflore du fromage frais.	14
VII	Les étapes de préparation du lait.	16
VIII	Appareillages et produits chimiques utilisés durant la partie expérimentale.	18
IX	Conditions d'extraction des bioactifs par macération à partir de poudres brutes et délipidés des grains de <i>Pinus halepensis Mill.</i>	21
X	Résultats des tests catalase, coloration de Gram, aspect macroscopique et microscopique des souches pathogènes.	30
XI	Diamètre des zones d'inhibition en millimètre des extraits bruts relatives aux différentes souches pathogènes testées	31
XII	Diamètre des zones d'inhibition (en millimètre) des extraits délipidés relatives aux différentes souches pathogènes testées	32
XIII	Résultats de l'analyse physico-chimique du lait cru entier.	34
XIV	Résultats des analyses bactériologiques du lait cru entier.	35
XV	Résultats d'appréciation des différents fromages frais A, B et C selon les différents attributs sensoriels.	36

LISTE D'ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Bouillon Cœur-Cervelle.
°C	Température en degrés Celsius.
DO	Densité Optique
FTAM	Flore total aérobie mésophiles
GN	Gélose nutritif
HIV	Virus de l'immunodéficience.
JORA	Journal Officiel De La République Algérienne.
KDa	kilodalton
MRS	Man Rogosa Sharpe.
SARM	<i>S. Aureus</i> résistant à la méthicilline.
SS	Milieu salmonelle – Shigella
T°	Température.
UFC	Unité formant colonie.
µL	Microlitre.
µm	Micromètre.
UV	Ultra-violet.
v/v	Volume / volume
<i>P .halepensis Mill</i>	<i>Pinus halepensis Mill</i>

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Les végétaux ont toujours été employés par l'homme pour se soigner. Dans le monde, près de 80% de la population a recours aux plantes médicinales par manque d'accès aux médicaments prescrits (**Benaïssa, 2011**).

Les plantes médicinales, constitue un composant fondamental pour l'avenir du système de santé dans le monde, elles possèdent des propriétés médicamenteuses qui ont souvent une réelle efficacité contre différentes maladies, elles sont donc une matière première naturelle servant à la fabrication des médicaments. Le Pin d'Alep est l'un de ces plantes médicinales le plus répandus en Algérie (**Sofowora, 2010**).

Au cours des dernières années, un intérêt croissant pour l'utilisation des différentes parties de la plante médicinale (feuille, tige, fruit, graines...etc.) a été observé dans différents domaines non seulement dans le domaine médical mais surtout dans les industries agroalimentaires (**Benaïssa, 2011**).

Le fromage fut à son origine, un mode de conservation du lait ou du moins des éléments susceptibles d'être conservés, au prix de fermentations que l'Homme a appris à diriger (**Eck et Gillis, 2006**). Le fromage constitue un élément important dans l'alimentation humaine. Ses taux élevés en lactose, lipides et en protéines en font de lui un aliment nutritif, riche en énergie (**Walther et al 2008**).

L'objectif de ce travail est de contribuer à la valorisation d'une plante spontanée à caractère médicinal tel que le Pin d'Alep «*P. halepensis Mill*». Le mémoire se structure en deux parties

Dans la première partie, la présente étude porte sur l'étude du potentiel antimicrobien des extraits des graines de *P. halepensis Mill*. vis-à-vis des souches pathogènes de références les plus incriminés dans les maladies touchant l'homme ou responsable de la détérioration des aliments.

Dans la deuxième partie, L'étude consiste à un essai de fabrication d'un fromage frais enrichie avec les graines de *P. halepensis Mill*. Des tests sensoriels sont réalisés pour évaluer une partie de la qualité organoleptique du fromage fabriqué.

CHAPITR I

LE PIN D'ALEP

I. Caractères botaniques du Pin d'Alep

Le Pin d'Alep est un arbre forestier résineux de deuxième grandeur qui peut parfois atteindre les 30 mètres de hauteur. Il est parfois appelé *Pin blanc* ou *Pin de Jérusalem* en nom commun français, *Aleppo Pine* en anglais, *Snober halabi* en arabe, et *Azoumbeien* Kabylie. Il est souvent penché et peu droit avec une cime écrasée, irrégulière et claire, avec des branches assez étalées (**Beker et al.1982 ; Boutchiche et Boutrighe, 2016**), résiste à la sécheresse et peu tolérant aux sols peu fertiles, et un climat aride (**Bobbou, 2016**). De plus il est sensible au froid, et réagit négativement entre 0°C et 12°C ; cela se manifeste par l'arrêt de croissance, chlorose, nécrose et mort parfois (**Mazliak, 2000**). Le Pin d'Alep a une longévité importante de 200 à 250 ans, comprend plus de 110 espèces (**Fekih, 2014**). Il se reproduit en général vers l'âge de 8-12 ans (**Chokri, 2005**). Les différentes parties de pin d'Alep sont présentées dans la figure 01.

I.1 L'écorce

L'écorce du pin d'Alep (Fig. 1b) est lisse, de couleur grise - argentée chez les jeunes arbres et devient écailleuse et plus sombre de couleur brune rougeâtre chez les adultes. L'écorce est très inflammable et très riche en tanin (**Boutchiche et Boutrighe, 2016**).

I.2 Les aiguilles

Elles mesurent de 6 à 10 cm de long avec une largeur de 1 mm (Fig. 1a), elles sont fines, molles, lisses et aigues, groupées par 2 en pinces à l'extrémité des rameaux (**Nahal, 1962 ; Boutchiche et Boutrighe, 2016**).

I.3 Les cônes

Les cônes sont gros avec une taille de 6 à 12 cm (Fig. 1e) avec un pédoncule épais de 1 à 2 cm, souvent isolés et réfléchis. Ils sont pourpres puis brun lustré avec des écussons aplatis, persistant plusieurs années sur l'arbre (**Boutchiche et Boutrighe, 2016**).

I.4 Les graines

C'est des graines non comestibles (Fig. 1d), mais dans la région du Maghreb toutefois appelée « Zgougou » sont utilisées dans plusieurs préparations culinaires. Les graines sont ovoïdes bombées à trois angles de petite taille de 5 à 7 mm à aile longue, brun gris sur une face et gris moucheté de noir sur l'autre. (**Boutchiche et Boutrighe, 2016**).



Figure 01 : Les différentes parties de Pin d'Alep : a- les aiguilles, b-l'écorce, c-arbre, d-les graines, e- le cône (Boutchiche et Boutrighe, 2016).

II. Systématique

Règne : Plantae.

Sous-règne : Tracheobionta.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Gymnospermes.

Classe : Pinopsida.

Ordre : Coniferales.

Famille : Pinaceae.

Sous-famille : Pinoideae.

Genre : Pinus.

Espèce : *Pinushalepensis* Mill. (Ozenda, 2006).

III. Répartition du pin d'Alep

III.1. Dans le monde

D'après Quézel, 2000(fig 02) le pin d'Alep couvre des surfaces importantes de plus de 2,5 millions d'hectares. Répartis notamment dans la moitié ouest du bassin méditerranéen. On le retrouve surtout en Afrique du Nord, Espagne, Italie, Grèce, et France. Dans la moitié est, on

le trouve principalement en Palestine, en Jordanie, au Liban, en Syrie et en Turquie avec 6,8 millions d'hectares (Baker et al, 2017 ; Newman et al. 2003).

Au Maroc, il occupe une superficie de 65,000 hectares répartis en peuplements disloqués occupant la façade littorale méditerranéenne au niveau du Rif, du moyen et du Haut Atlas (Quézel,2000). En Tunisie, les forêts naturelles de pin d'Alep couvrent de 170,000 à 370,000 hectares, soit environ 56% de la couverture forestière du pays (Ammari et al.,2001).

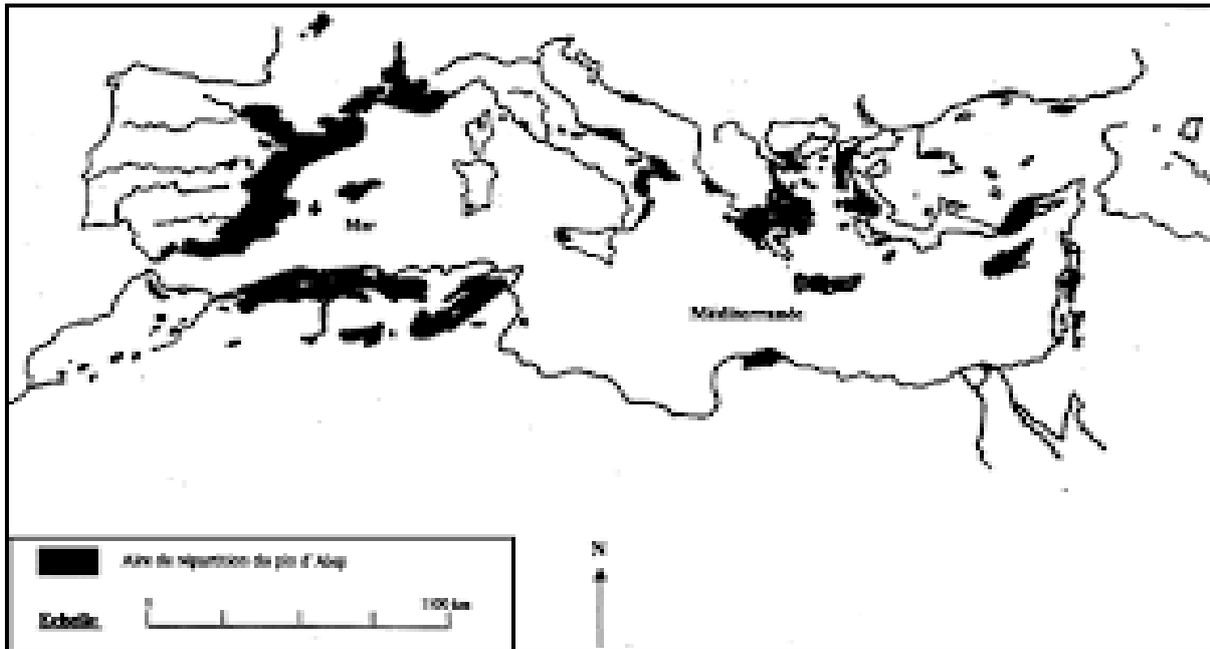


Figure 02 : Aire de répartition du Pin d'Alep en région méditerranéenne (Quézel, 2000).

III.2. En l'Algérie

En Algérie, le Pin d'Alep occupe principalement l'étage semi-aride et s'accommode bien aux terrains calcaires. Cette espèce forme des forêts dans les collines et les montagnes semi-arides (Mezali, 2003 ; Mezerai, 2014).

Le pin d'Alep est fréquent surtout sur les massifs du tell littoral et l'Atlas saharien, Il s'étend à lui seul sur près de 850.000 ha, il occupe 37% de la surface boisée de l'Algérie (Zenzen, 2016).Souvent ma utilisé par l'homme, il en reste néanmoins de vastes peuplements en Oranie (régions de Bel Abbes, Saida, Ouarsenis), dans l'Algérois (Djurdjura, MedeaBoghar, Monts de Bibans, Monts des OuledNail), et dans le Constantinois (Aurès, région de Tebessa surtout) (Mezerai, 2014).La superficie occupée dans ces régions est décrite dans le tableau I.

Tableau I : Répartition de pin d'Alep en Algérie (Bentouati, 2006).

Région	Superficie (ha)
Djurdjura	36,000
Tebssa	90,000
Medéa,Bogher	52,000
Aurès	100,000
Theniet el hed	47,000

IV. Utilisation

Le Pin d'Alep est utilisé généralement dans :

- ❖ Des programmes de reboisement très intéressants sur le plan de la production du bois. Son bois est utilisé en construction, industrie, menuiserie, pâte à papier, pour l'étagage des mines, la construction navale et la charpenterie (Lahouati, 2000).
- ❖ La protection des sols au-delà de la « ceinture verte » dans le Sud de l'Algérie, (Lahouati, 2000), et le développement des activités touristiques et de loisir. (Maestre et Cortina, 2004).
- ❖ Il est riche en résine (les bourgeons) donne environ 3 Kg par (arbre/an) Kadik, 1987) qui contient 20 à 24% d'essence de térébenthine et 75 à 80% de cellophane, sont utilisés comme balsamiques et diurétique (sirops et pastilles). Il a aussi des usages médicaux, parfumerie et en savonnerie (Kadik, 1987).
- ❖ Tannage de la peau, teinture, cuir, laines ou encore des filets de pêche (Kadik, 1987).
- ❖ Les massages de la peau, dans la cuisine comme ingrédient pour les soupes, vinaigre, dans le soulagement de problèmes gastro-intestinaux, un inhibiteur de l'appétit, un stimulant de l'absorption des protéines, ainsi comme un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires. Aussi elle contient des antioxydants qui sont bénéfiques à l'organisme tout entier (Penchev, 2010).
- ❖ en pâtisserie et confiserie. Aussi en médecine traditionnelle (Tala, 2008).

V. Les métabolites de Pin d'Alep

Le Pin d'Alep est très riches en métabolites primaires, secondaires, oligo-éléments et source non négligeable d'oméga 3 ce qui leurs confère d'être l'objet de plusieurs études phytothérapeutique dans le but d'identifier ses principes actifs.

V.1. Les métabolites primaires

Le métabolisme primaire des graines de *P.halepensis* représente tous les processus de bases, comme la croissance ou la respiration qui sont vitaux pour la plante (la machinerie moléculaire de la cellule). Les métabolites primaires sont localisés dans toutes les parties de l'organisme avec de grande quantité (acides nucléiques, protéines, lipides et d'hydrates de carbone) (Diallo, 2000).

V.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. (Epifano et al. 2007). Parmi les principales familles de métabolites secondaires retrouvées dans les graines de *P. halepensis* Mill. On distingue :

- Les composés phénoliques.
- Les composés terpéniques.
- Les composés azotés.

V.2.1 les composés phénoliques

V.2.1.1 Définition

Les composés phénoliques sont des substances présentes dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante avec un poids moléculaire qui peut atteindre 30 KDa (Bravo, 1998). Ils possèdent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Naczek et Shahidi, 2006 ; Barboni, 2006 ; Sun et al., 2011).

Le terme « composés phénoliques végétaux » englobe les phénols simples, les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins, les saponines, les phytostérols et les lignanes (Stalikas, 2007).

V.2.1.2. Localisation

A l'échelle cellulaire, la localisation de ces composés est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement, mais toujours à très faible concentration, dans la paroi cellulaire, du noyau et de la membrane plasmique. Et à l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques qui sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux (Sarni et Cheynier, 2006).

V.2.1.3. Propriétés biologiques

Le tableau II montre les principales classes de composés phénoliques avec ses propriétés biologiques

Tableau II : Les principales classes de composés phénoliques avec ses propriétés biologiques. (Ribeiro et al ,2001; Marongiu et al., 2004).

Polyphénol	Activités
Acides phénolique (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices Antioedémateuses Anticarcinogènes
Flavonoides	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants

➤ Antioxydant

Les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels (**Ribeiro et al ,2001; Marongiu et al., 2004**). Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques (**Ribeiro et al.,2001**). L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes :

- Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- Ils détruisent les hydro peroxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O) (**Ribeiro et al.,2001**).

➤ Anti-inflammatoire

Les polyphénols possèdent des propriétés anti inflammatoires, capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego et al, 2007**).

➤ Anticancéreuse

Des recherches expérimentales suggèrent que les composés phénoliques sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers par l'intervention de plusieurs mécanismes :

- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses
- Induction de l'apoptose et l'inhibition des processus d'angiogénèse (**Ren et al, 2003**).

➤ Antivirale

L'activité antivirale des composés phénoliques agissent contre les virus (le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2) par leurs effets sur les enzymes responsables de leur réplication (**Bylka et al, 2004**).

➤ **Anti allergique**

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Marfak, 2003**).

V.2.2 Les composés terpéniques

Les terpénoïdes représentent le groupe le plus âgé des petits produits moléculaires synthétisés par les plantes (en faible quantité). Ils sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte à 5 carbones appelés « *isoprène* » avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone) (**Guillaume, 2012**).

V.2.3 Les composés azotés

Les composés azotés sont essentiellement sous forme d'acides aminés et de protéines dans les graines. Le stockage et la remobilisation de l'azote sont importants pour la production de graines et pour le contenu de ces graines en azote. Ce contenu déterminera la capacité de germination et la survie des nouvelles générations (**Masclaux-Daubresse et al., 2010**).

VI. Méthodes d'extraction des phytomolécules

VI.1. Méthodes traditionnelles

VI.1.1 Infusion

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes (**Sofowora, 2010**).

VI.1.2 Décoction

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, deux ou trois minutes pour les feuilles, les tiges et les fruits, cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines (**Pierre et Lis, 2007**).

VI.2. Méthodes conventionnelles

VI.2.1. Macération

Le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre.

Dans le cas de la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant 10 à 12 heures au max à fin d'éviter le risque d'oxydation et de fermentation du liquide (**Pierre et Lis, 2007**).

VI.2.2. L'hydrodistillation

La distillation à l'eau ou « hydrodistillation » dont Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau, l'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales (**Benjilali, 2004**).

VI.3. Méthodes d'extraction non conventionnelles

VI.3.1 Extraction par ultrasons

Les ultrasons interagissent avec le matériel végétal et modifient ses propriétés physiques et chimiques. Un effet de cavitation est créé, ce qui facilite la libération des composés extractibles et améliore le transfert de matière en perturbant les parois cellulaires des plantes (**Chemat et al., 2011**).

L'extraction est réalisable à basse température (30-40°C) pendant une courte durée de 30 à 60 minutes, en utilisant soit le méthanol ou l'éthanol en tant que solvant d'extraction (**Wang et Weller, 2006**).

VI.3.2 Extraction par microonde

L'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel l'énergie micro-onde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales. En utilisant du méthanol ou de l'éthanol, à température élevée (135-140°C) pendant une courte durée (49s-8 min) (**Inoue et al., 2010; Jawad &Langrish, 2012**).

CHAPITRE II

LAIT ET FABRICATION DE FROMAGE FRAIS

I. Généralité sur le lait

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

Le lait doit être en outre collecté dans de bonnes conditions hygiéniques et présenter toutes les garanties sanitaires. Il est commercialisé le plus souvent après avoir subi des traitements de standardisation lipidique et d'épuration microbienne pour limiter les risques hygiéniques et assurer une plus longue conservation (**Jentet et al., 2008**).

Le lait est reconnu comme étant un aliment bon pour la santé. Source de calcium et de protéines, très riche en acides gras saturés qu'en acides gras insaturés. Ils véhiculent par ailleurs des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E. Le lait pourrait être consommé en l'état, ou en ses dérivés à savoir : yaourt, lait fermenté, lait caillé, crème, beurre, ou en fromage (**Franworth et Mainville, 2010 ; Guiraud, 2003**). La composition du lait est présentée dans le tableau III.

Tableau III : La composition moyenne du lait entier (**Fredot, 2006**).

Les composants	Teneurs (g/100g)	Les composants	Teneurs (g/100g)
Eau	89,5	Lipides neutres	3,4
Dérives azotés	3,44	Lipides complexes	< 0,05
Protéines	3,27	Composés liposolubles	< 0,05
Caséine	2,71	Glucides	4,8
Protéines solubles	0,56	Lactose	4,7
Azote non protéique	0,17	Gaz dissous	5
Matières grasses	3,5	Extrait sec total	12,8

II. Microbiologie du lait

Le lait dans la mamelle des animaux en bonne santé est quasiment stérile. Cependant, lors de la traite et du stockage, les risques de contamination sont possibles (Fox *et al.*, 2000). Le lait traité dans de bonnes conditions d'hygiène peut contenir systématiquement un taux inférieur à 5×10^3 UFC/ml (Fox *et al.*, 2000; Beresford et Williams, 2004). Il s'agit principalement de microcoques, mais aussi de streptocoques lactiques et lactobacilles, plus ou moins abondants et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production. Cette flore est appelée la flore originelle du lait (Guiraud, 2003).

Le lait et grâce à sa richesse nutritionnelle constitue un milieu favorable pour le développement des microorganismes contaminants (flore d'altération). Ce qui implique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait ou de ces dérivés. Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de la collecte, de la transformation, ou du stockage. Cette présence est généralement indésirable, soit pour leur effet pathogène (provoquant une infection alimentaire et/ou cause d'intoxication alimentaire) pour l'homme ou l'animal ou induisant des transformations indésirables dans le lait. Les souches les plus communément rencontrées sont : *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium bovis*, *M. Tuberculosis*, *Bacillus cereus*, *Listeria Monocytogenes*, *Brucella*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* et *Flavobacterium*, mais on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus (Rosse, 2002).

III. Facteurs affectant la durée de conservation du lait et des produits laitiers

La durée de conservation du lait et des produits laitiers est limitée à environ 3 semaines ou moins, un nombre de facteurs contribuent à cette durée limitée de conservation : qualité microbiologique du lait cru, les enzymes bactériennes, les enzymes du lait (lipoprotéine lipase, plasmine) et la température de stockage (Walstra *et al.*, 2006).

La limite de la durée de conservation peut être signalée par des changements d'aspect, d'odeur ou de saveur, les changements impliquent des transformations physico-chimiques (écrémage de la matière grasse, le gel des protéines de lactalbumine, caillage du lait et de la cristallisation des minéraux), chimiques (brunissement et oxydation non-enzymatiques de la matière grasse) ou biochimiques (croissance des microorganismes, dégradation enzymatique, fermentation et affinage du fromage). Cependant, la limite principale de la durée de conservation est la prolifération des bactéries d'altération, des levures et moisissures qui se développent à la température de réfrigération (< 8 °C) (fox, 2000 ; Jentet *et al.*, 2008).

IV. Généralité sur le fromage frais

Le fromage frais est un fromage à pâte molle non affiné, très humide, peu minéralisée, possède un goût crémeux ou acide peu prononcé, facile à tartiner et à mélanger à d'autres aliments (**Vignola, 2002**). C'est le produit d'une coagulation lente à dominance acide, obtenue grâce à l'action des bactéries lactiques combinée ou non à celle d'une faible quantité de présure (1-5 mL/100 L de lait) et un temps d'incubation long, mais de conservation courte (**Eck et Gillis, 2006**).

Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum et la teneur en matière grasse du lait mis en œuvre. Le tableau ci-dessous cite quelques diversités des fromages frais.

Tableau IV : Les différents types de fromages frais.

Types de fromage	La Définition	Référence
Blanc	Fromage n'a pas subi d'autres fermentations que la fermentation lactique.	(Luquet et Georges, 2005).
Petit suisse	Fromage frais préemballé non salée et de forme cylindrique d'un poids de 30 à 60 g.	(Luquet, 1985).
"Demi-sel"	Fromage frais à pâte homogène, ferme, salée à 2 %.	(Luquet, 1985).
Carré	Fromage frais contenant divers ingrédients	(Fredot, 2005).

La composition moyenne de ces différents types de fromage frais est résumée dans le tableau V.

Tableau V : Composition en nutriments de différents types de fromages frais (**Ireland et al., 2002 ; Roudaut et Lefrancq, 2005**).

Type de fromage Frais	Eau (%)	Matière sèche(%)	Protides (%)	Calcium mg/100g	Sodium mg/100g	Lipides (%)
Blanc 0% MG	-	15	6 à 8	110	30	0
Suisse 40% MG	-	24	10	100	30	9,5
Demi-sel 40% MG	-	35	15	80	1100	16
Carré 60%MG	-	45	13	80	1100	27
Fromage frais	81,8	15 à 45	5 à 15	70 à 110	30 à 1100	0 à 27
% : pourcentage, MG: matière grasse.						

Les microflores des fromages frais (tableau VI) sont composées d'un grand nombre de microorganismes, et appartiennent à des groupes et des espèces très diverses qui ont des origines différentes tel que le lait, l'équipement de traite et de stockage du lait, l'atmosphère, le matériel de fromagerie, les levains et le manipulateur (Mahaut et al., 2000). Il est très difficile de citer toutes les espèces microbiennes intervenant dans la fabrication des fromages car elles sont très nombreuses (Guiraud, 2003).

Tableau VI : la microflore de fromage frais (Guiraud, 2003 ; Hermier et al., 1992).

Flore lactique	C'est la flore bénéfique, responsables de l'acidification du lait par la production d'acide lactique à partir de la fermentation des sucres (<i>lactobacillus bulgaricus, lactococcus lactis, leuconostoc</i>).
Flore d'altération	Provoquant des transformations nuisibles à la qualité marchande des produits traduisent par des défauts de goût, odeur et de texture (levure et moisissure).
Flore pathogène	Les fromages frais peuvent contenir des entérobactéries pathogènes (<i>E.coli, pseudomonas aerogenosa, Staphylococcus aureus...</i>).

V. Fabrication de fromage frais

La transformation du lait en fromage frais est un processus compliqué, impliquant plusieurs étapes de fabrication et de transformations biochimiques, mais on peut les résumer en cinq grandes étapes (figure 03)

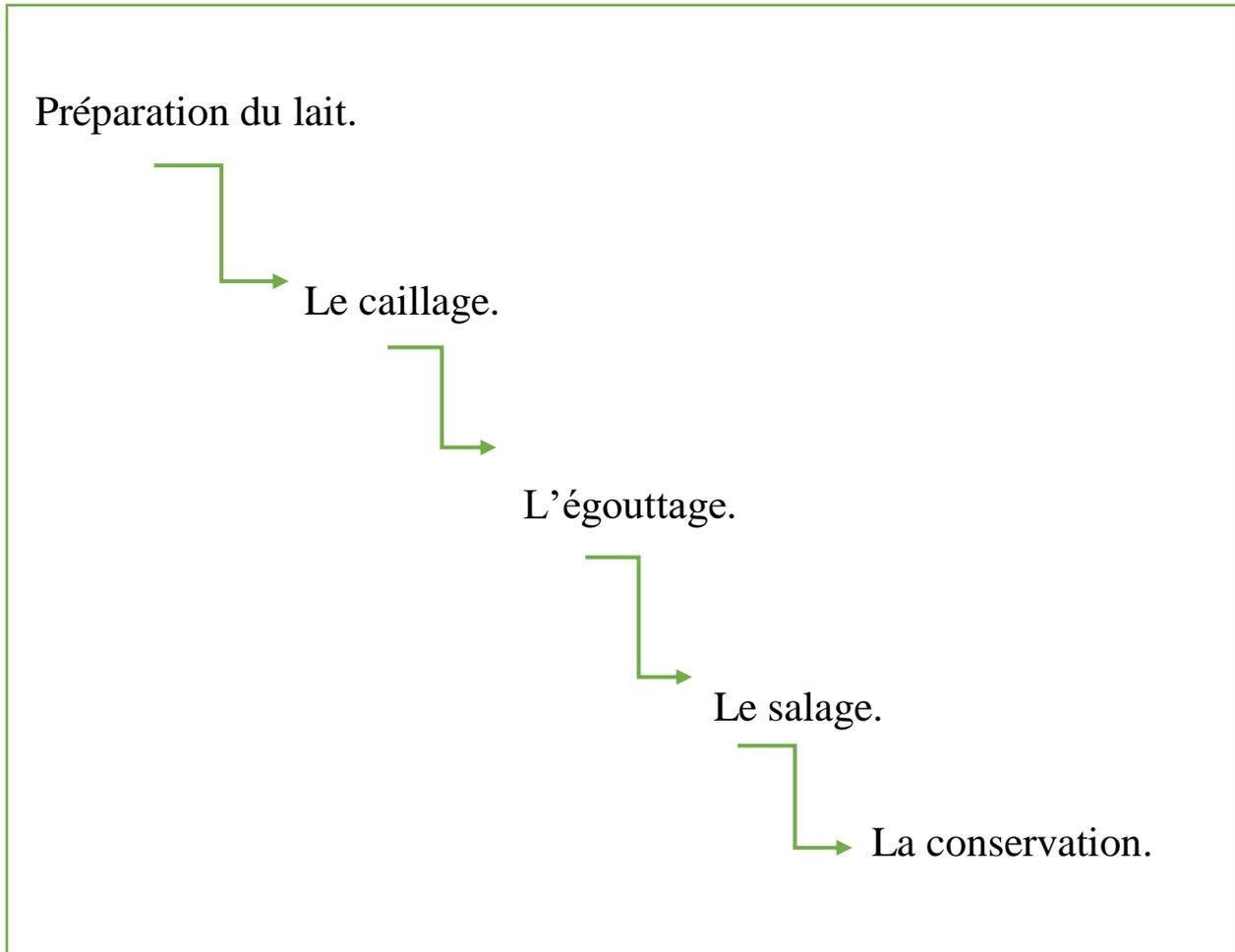


Figure 03 : Diagramme de fabrication de fromage frais.

V.1. La préparation du lait

Pour préparer le lait sur les plans microbiologique et physicochimique, plusieurs opérations sont effectuées. Ces opérations sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau VII : Les étapes de préparation du lait.

Les opérations	L'application	Référence
Filtration et refroidissement	La filtration du lait s'effectue au moyen des filtres qui permettent de retenir les impuretés du lait, ensuite un refroidissement à 4 °C pour but de conserver la qualité du lait et de ralentir la prolifération des espèces bactériennes. Le lait est stocké au maximum pendant 18 à 24 h / 4 °C.	(Dossou et al., 2006).
Chauffage	Le lait subit une thermisation à une température de 60 à 65°C dans le but de réduire le nombre des germes totaux.	(Vignola, 2002).
Standardisation et écrémage	Produire le lait avec une teneur en matière grasse définie. L'opération se fait en deux étapes, dans la première il y'a séparation de la crème et du lait écrémé par une centrifugeuse à disque. La force centrifuge permet, en même temps, la clarification du lait. Il y'aura ainsi un circuit lait écrémé et un circuit crème qui vont être mélangés ensemble à nouveau.	(Vignola, 2002).
Pasteurisation	Traitement thermique à 95 °C pendant 1 à 5 mn, afin d'améliorer la qualité technologique et hygiénique du lait par destruction des germes hétéro fermentaires indésirables et pathogènes.	(Mahaut et al, 2000).

V.2. La coagulation

La coagulation est obtenue en induisant une forte acidification grâce à des bactéries lactiques dont la prolifération est favorisée en ajustant la température à l'optimum de développement (28 °C) et en prolongeant le temps d'incubation. Dans le même but une enzyme coagulante (la présure) est ajoutée, mais son rôle est limité en raison de la faible concentration utilisée (1 à 5 ml/ 100 l de lait) et de la température peu favorable à son utilisation. Une quantité de chlorure de calcium en solution est ensuite ajoutée, afin de réduire le temps de floculation et d'accroître la fermeté du coagulum (**Eck et Gillis, 2006 ; Gouedranche et Camier-Ca, 2001**).

V.3. L'égouttage

L'égouttage est la séparation du caillé du lactosérum. Il se fait par centrifugation, dont le principe repose sur la différence de densité entre le lactosérum et le caillé maigre (**Gouedranche et Camier-Ca, 2001**).

V.4. Le salage

On peut saler le fromage soit par pulvérisation en surface de sel soit par immersion dans un bain de saumure (eau + sel). Le sel règle l'activité de l'eau et favorise ou freine le développement des microorganismes tout en régulant les activités enzymatiques, ainsi il révèle la saveur propre du fromage en influençant le goût et en renforçant les arômes (**Fredot, 2005**).

V.5. La conservation

La conservation du fromage c'est avec l'utilisation normale du froid qui consiste à limiter et même si possible annuler l'évolution des produits, on maintient généralement des températures comprises entre 0°C et +2°C (**Dossou et al., 2006**).

PARTIE

PRATIQUE

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans l'optique de mettre en lumière un potentiel très peu connu à savoir l'effet antimicrobien d'une partie d'un arbre peu exploité « graines de *Pinus halepensis* Mill. ». Le présent travail s'est porté sur l'évaluation de leur potentiel antimicrobien, d'une part. Et d'étudier la possibilité d'une valorisation agroalimentaire par un essai d'enrichissement d'une matrice alimentaire à savoir « fromage frais » avec les graines de pin d'Alep « *P. halepensis* Mill. » de l'autre part.

Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires 4 et 8 du département de biologie (FSNVST) de l'université Akli Mohand Oulhadj de Bouira et le laboratoire de contrôle de qualité de Sour El Ghozlène Bouira, en plus de la literie Celia lait Beni-Tamou de Blida.

I. Matériel et équipements

Le matériel et les équipements utilisés dans notre pratique sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau VIII: Appareillages et produits chimiques utilisés durant la partie expérimentale

Matériels	Milieux de cultures et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Soxhlet - Réacteur d'hydrodistillation - Rota vapeur - Centrifugeuse - Spectrophotomètre - Balance de précision - Bain marie agitateur - Etuve (25 ,37 et 40 °C) - Plaque chauffante agitatrice - Microscope photonique - Mortier - Compteur des colonies - Autoclave - Réfrigérateur - Tamiseur - Cartouche cellulosique 	<ul style="list-style-type: none"> - Ethanol, Méthanol, n-hexane, eau distillée - Na-Cl, Na-OH, HCL - Milieux gélosés : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gélose nutritive, Mueller Hinton PCA, sabouraud, PDA, Chapman, Gélose nutritif, l'eau physiologique - Bouillon de culture : <ul style="list-style-type: none"> ✓ BHI, BN - Folin Ciocaltau, - Carbonate de sodium

II. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi pour la présente étude est les graines de *P. halepensis Mill.*, acheté chez un herboriste. Selon ce dernier, les graines (originaire de la région de Médéa) ont été récupérées à partir des cônes (fruit du *P.halepensis Mill.*) récoltés à un stade optimal de maturation durant le mois de février 2019

II-1.Préparation du matériel végétal

Après triage (élimination des impuretés), les graines de *P. halepensis Mill* ont été rincées avec de l'eau du robinet puis déposées sur un tissu propre pour séchage à l'air libre dans un endroit sec et à l'abri du soleil pendant 7 jours. Elles ont ensuite été broyées grossièrement, puis transférées dans l'étuve ventilée (MAMMERT, lab Expo India) à 40 °C. Durant le séchage, le poids des graines est mesuré régulièrement jusqu'à stabilisation.

Après séchage, les graines ont été broyées à l'aide d'un broyeur électriques (HEIDOLPH, Germany), jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre ainsi obtenue est tamisée à l'aide d'un tamiseur automatique (Retsch 42781, HAAN, Germany) de différentes porosités, à savoir 500, 250 ,125 μm de diamètres pour avoir une poudre fine et homogène. La poudre obtenue est pesée et conservée dans un récipient propre en verre et stocké à l'abri de lumière et de l'humidité jusqu'à l'extraction.



Figure 04: Photographies des graines de *P. halepensis Mill* A-sous forme de graines, B-sous forme de poudre brute après broyage.

II-2.Extraction des composés bioactifs

A cause de la nature huileuse des graines du *P.halepensis Mill* et en vue de l'extraction par solvant (éthanol) des composés bioactifs, une étape de délipidation par Soxhlet au préalable s'avère nécessaire.

➤ Délipidation par Soxhlet

❖ Principe

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (Penchev, 2010). Le schéma de l'appareil Soxhlet est représenté dans la figure 05.

❖ Protocole

Une masse de 20g de la poudre brute des graines de *Pinus halepensis* Mill a été introduite dans la cartouche en cellulose, cette dernière sera placée dans l'appareil soxhlet (behr Labor-Technik, Dusseldorf, Germany) surmonté d'un réfrigérant (Fig.5). Ce dernier est fixé avec un ballon qui contient 200 ml de n-hexane. Le solvant de l'extraction est ensuite chauffé entre 40 et 60 °C pendant 6 heures. L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance. La poudre délipidé obtenue a été laissée séchée à température ambiante, puis conservée dans des emballages en verre opaque les protégeant de l'humidité.

A la fin de l'extraction, la poudre délipidé a été récupérée et séchée à l'étuve à 40 °C pour l'élimination du solvant résiduel. La matière grasse extraite est récupérée après concentration à l'aide d'un rotavapor (BUCHI, Belgique) puis stocké à 4 °C.



Figure05 : Photographie de la délipidation avec l'appareil Soxhlet : A-Montage de l'appareil soxlhet, B-Poudre obtenue après délipidation ; C : L'huile extraite.

❖ **Calcul de rendement d'extraction**

$$R(\%) = (m_{MG}/m_{HV}) * 100$$

R : Rendement

m_{MG} : masse de l'huile grasse en (g)

m_{HV} : masse de matière végétale sèche en (g)

➤ **Extraction des composés bioactifs par solvant**

L'extraction des composés bioactifs a été réalisée selon la méthode décrite par (**Tawaha et al. 2007**), avec de légères modifications. Différentes prises d'essais de la poudre (brute et délipidé) obtenue ont été macérées dans 10 ml de solvant d'extraction (l'eau distillée, et éthanol). Le mélange est soumis à une agitation à l'aide d'un vortex (Nahita681/5), puis introduit dans un bain marie agitateur (NUVE, nb20, Canada) selon les conditions représentées dans le (**Tableau IX**). Après refroidissement, les extraits obtenus ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre. Puis centrifugé deux fois à 14000tours/min pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (LW Scientific, EZ Swing 3K, Germany), Le surnageant obtenu a été conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

Tableau IX : Conditions d'extraction des composés bioactifs par macération à partir des poudres bruts et délipidés des grains de *Pinus halepensis* Mill.

Type de solvant	Type de poudre	Concentration du solvant (%)	Temps d'extraction (h)	Température d'extraction (°C)	Le ratio (Poudre/solvant) (g/ml)
Eau	Brute	100	1,5	50	1/10
					2/10
	Délipidé				3/10
Ethanol	Brute	70	3	40	1/10
					2/10
	Délipidé				3/10

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des graines de *P. halepensis* Mill. Vis-à-vis des souches pathogènes

Afin d'évaluer le potentiel antimicrobien, jusqu'à présent peu connu, des extraits de graines de *Pinus halepensis* Mill vis-à-vis des souches pathogènes de références à savoir : Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SARM ATCC 43300), bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* CIP 813, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et une levure (*Candida albicans* ATCC 10231). Un test de diffusion par des disques imbibés de l'extrait obtenue est réalisé.

III.1. Revivification et vérification de pureté des souches

A partir des cultures pures conservées à 4°C des souches pathogènes. Des tubes de 9ml de bouillon BHI ont été inoculés avec les colonies caractéristiques à chaque souche, puis incubés à 37 °C pendant 24h. Après la période d'incubation, des repiquages à la surface d'une boîte de pétri gélosée ont été effectués et incubée à 37 °C pendant 18 – 24 h. Au terme de cette période les caractères cultureux sont observés, l'examen au microscope optique (morphologie, mode de regroupement des cellules et coloration de Gram) et la catalase sont réalisés.

III.2. Standardisation des inocula des souches pathogènes et d'altération

A partir d'une culture fraîche, obtenue sur bouillon nutritif (Biokar diagnostics Allone, France) un ensemencement par striés est réalisé sur gélose nutritive. Après incubation à 37°C pendant 18h, les colonies sont prélevées et reprise dans un tube d'eau physiologique stérile jusqu'à avoir une densité optique fixée à 0,5 à 625nm (spectrophotomètre ; Optizen POP, Corée).

Des dilutions décimales sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile (10^{-1} à 10^{-8}). A partir des dilutions préparées (10^{-6} jusqu' à 10^{-8}). Un volume de 1ml de chaque dilution est ensemencé en masse de la gélose spécifique (gélose Chapman pour les *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) ; gélose sabouraud pour *Candida albicans* et gélose nutritive pour *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella enterica*). Au terme de la période d'incubation, un dénombrement est réalisé à l'aide d'un compteur de colonies (Funke Gerber)

III.3. Tests de l'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de grains de *P. halepensis* Milla été réalisée par la méthode de diffusion en utilisant les disques

➤ Méthodes des disques (Aromatogramme)

Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les extraits obtenus

A/ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure et fraîche de 18 heures, les colonies des souches pathogènes sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur, puis déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile, après homogénéisation de la suspension bactérienne au vortex, les inocula sont ajustés jusqu'à obtention d'une DO de 0,50 à 625 nm. Une dilution (10^{-2} pour les standards de 10^9 UFC/ml, et une dilution de 10^{-1} pour les standards 10^8 UFC/ml) est effectuée, pour avoir 10^7 UFC/ml.

B/ L'ensemencement

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension microbienne, puis essorer en le pressant fermement, sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Sur une boîte de Pétri présentant 4 mm d'une gélose Mueller Hinton, l'écouvillon est déchargé sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées, l'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Puis, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

C/ Préparation des disques et aromatogramme

Les disques sont préparés à partir de papier Wathman n°1, avec un diamètre de 6mm, puis mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque extrait sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Les boîtes ensemencées après dépôt des disques sont mets dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures pour permettre une meilleure diffusion des extraits. Les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les bactéries pathogènes, et à 25°C pour *Candida albicans*. Au terme de la période d'incubation, on mesure les diamètres des halos clairs (zones d'inhibition) qui

entoure les disques. Le diamètre (mm) des zones est proportionnel à la sensibilité du germe étudié.

IV-Fabrication de fromage frais enrichis avec les graines de pin d'Alep « *P. halepensis* Mill »

IV.1. Analyses physico-chimique et microbiologique du lait cru

Avant d'aborder la fabrication du fromage, il est important de connaître ses qualités physico-chimiques et microbiologiques. Les analyses effectuées sont résumées dans **l'annexe 05**.

IV-1-1. Analyses physico-chimiques

✓ Détermination de l'acidité titrable

D'après Mathieu (1998), l'acidité titrable est déterminée par le dosage de l'acide lactique à l'aide de l'hydroxyde de sodium. En présence de la phénolphtaléine, comme indicateur coloré, qui permet d'indiquer la limite de la neutralisation par changement de couleur (rose pâle)

N.B : Le degré Dornic est une unité de mesure d'acidité de lait du nom de Mr. Dornic ancien directeur de l'école d'industrie laitière. 1°D correspond à 0,1g d'acide lactique par litre de lait. Un lait est considéré comme frais lorsqu'il a une valeur inférieure ou égale à 18°D.

➤ Mode opératoire

Un volume de 10 ml de lait cru a été introduit dans un bécher, puis 3 gouttes de phénolphthaléine ont été ajoutées. Le titrage est réalisé à l'aide d'une solution NaOH (1N) ajouté goutte à goutte. Une agitation délicate est assurée à chaque goutte versée jusqu'au premier virage où une coloration rose apparaît. Le volume de NaOH nécessaire au virage a été noté (chute de burette).

➤ Expression des résultats

Ac lait= V de la chute de la burette (g/kg) = V de la chute de la burette*10 (°D)

✓ Test à l'ébullition

Un lait qui n'est pas frais présente une structure de caséines particulièrement instables. Dès lors, un simple traitement thermique suffit à les précipiter.

➤ Mode opératoire

Mettre une quantité de lait à une température d'ébullition sur une plaque chauffante.

➤ Expression des résultats

- Présence d'une seule phase : lait stable.
- Présence de deux phases : lait non stable (caillé).

✓ Test de lactofermentation

Test pratique simple très efficace. Ce test très précieux fournit une bonne indication concernant la fromageabilité du lait à analyser. Il permet de donner des indications concernant la composition de la microflore capable de se reproduire dans le lait cru.

➤ Mode opératoire

Un volume de 10 ml de l'échantillon de lait cru est remis dans un tube à essai, puis incubé à 37 °C pendant 24 heures. Après la période d'incubation si le **Caillé obtenu est bien lisse**, cela signifie que notre échantillon de lait possède une garantie d'aptitude à l'acidification du lait et de l'absence de germes indésirables en quantité suffisante pour avoir des conséquences d'ordre technologique

✓ Test de la réductase

La plupart des bactéries possèdent la capacité de se multiplier dans le lait. Grâce à l'action de leurs réductases, le potentiel d'oxydoréduction est abaissé jusqu'à décoloration d'un indicateur redox. On utilise généralement le bleu de méthylène dont la forme réduite est incolore (**Guiraud, 1998**). La rapidité de la décoloration, due au métabolisme bactérien et directement proportionnelle au nombre de bactéries présentes.

➤ Interprétation des résultats

- Lait très contaminé = décoloration moins de 2 heures
- Lait contaminé = décoloration entre 2 h et 4 h
- Lait faiblement contaminé = décoloration à partir de 4 h

✓ **Détection d'antibiotique dans le lait par le beta star combo**

Les résidus des antibiotiques dans le lait présentent des risques directs ou indirects pour le consommateur, ils peuvent détruire la flore laitière notamment la flore lactique et supprimer ainsi la fermentation lactique. Pour tester la présence des antibiotiques, nous avons utilisé un appareil « le Beta Star Combo ».

➤ **Mode opératoire**

Une fois l'appareil (Beta Star Combo) est mis en marche jusqu'à atteinte la température de 47, 5°C. Le milieu de culture est ajouté dans l'appareil additionnée de 200 µl de lait à l'aide d'une micropipette, puis laisser en contact pendant 3 min. la lecture est réaliser à l'aide des bandelettes Beta Star Combo

➤ **Lecture des résultats**

- 3 traits : Absence d'antibiotique.
- 2 traits : Présence d'antibiotique

IV.1.2. Analyses microbiologiques du lait cru

Les produits alimentaires transformés peuvent contenir certains microorganismes nuisibles pour leur qualité (modification de la valeur d'usage) et pour la santé du consommateur (risque sanitaire lié à la présence de germe pathogène ou de leurs toxines).

L'analyse microbiologique de ce type de produit tel que le lait est indispensable pour garantir la bonne qualité hygiénique et assurer donc la sécurité des consommateurs.

Les échantillons de lait sont homogénéisés pendant 30 à 60 secondes avant prélèvement puis analysés par les méthodes préconisées par Guiraud et Galzy (1980). Pour chaque prélèvement, 10 ml de lait sont ajoutés stérilement dans un flacon à 90 ml de tryptone sel (ou eau physiologique). On obtient ainsi une dilution 10^{-1} , à partir de laquelle on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-7} . Les milieux de cultures utilisés et les conditions d'incubation sont indiqués dans les paragraphes ci-après. Les résultats des dénombrements sont exprimés en \log_{10} CFU/ml. Toutes les analyses sont répétées trois fois dans le temps (si les moyens les permettent).

➤ **Flore totale aérobie mésophile (FTAM)**

Cette flore est significative du degré de contamination et de l'état de fraîcheur ou de décomposition du produit. Elle est dénombrée sur gélose nutritive (dilution 10^{-4} - 10^{-6}), incubée 24 à 48 h à 30 °C.

➤ **Coliformes totaux et fécaux**

Recherchés en bactériologie alimentaire, ils correspondent le plus souvent à *Escherichia coli*. L'ensemencement se fait en double couche sur VRBL en déposant 1 ml des dilutions (10^{-1} à 10^{-3}) pour les coliformes fécaux et (10^{-4} à 10^{-5}) pour les coliformes totaux.

L'incubation est réalisée à 37 et 44 °C pour les coliformes totaux et coliformes fécaux respectivement. Les colonies typiques sont rouges avec un diamètre de 5 mm.

➤ **Staphylocoques**

➤ **Recherche des Staphylocoques**

La recherche est effectuée après enrichissement sur milieu Giolitti Cantoni additionnée de tellurite de potassium. Trois tubes de 9 ml de ce dernier sont ensemencés par 1 ml du lait de chèvre ou de ses dilutions (10^{-1} et 10^{-2}). L'incubation est faite à 37 °C pendant 48 h en anaérobiose par addition d'une couche de paraffine. La croissance des staphylocoques s'exprime par noircissement du bouillon. Une vérification est réalisée par un ensemencement par stries (incubation à 37 °C pendant 48 h).

➤ **Dénombrement des staphylocoques**

Le dénombrement est fait directement à partir du lait ainsi que la dilution 10^{-1} sur milieu Chapman, sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. Ce milieu est incubé 24-48 h à 37 °C. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont pigmentées en jaune-doré et entourées d'un halo jaune correspondant à l'acidification du mannitol (mannitol+).

➤ **Recherche des Salmonelles**

Les salmonelles étant habituellement rares et peu actives dans le lait, il est indispensable d'enrichir avant d'effectuer la recherche. Un volume de 1 ml de lait est ajouté à 9 ml de bouillon au sélénite et incubé 24 h à 37 °C. L'observation est faite sur gélose Hektoen additionnée de sulfite de sodium par culture en stries, à partir du bouillon au sélénite, sur la gélose solidifiée au préalable. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 h.

IV.2. Fabrication de fromage frais

A sa réception, le lait cru entier issu de la traite du matin ayant subi les analyses microbiologiques et physicochimiques est reparti dans des récipients de 2 L. Puis pasteurisé à 85 °C pendant 2 à 3 min

IV.2.1. Le caillage

Pendant cette étape, le lait se coagule et se transforme en un gel homogène et lisse : le caillé, est obtenu avec l'ajout de 60 ml de vinaigre blanc au lait chaud

IV.2.2. L'égouttage et salage

Il s'agit d'une étape clé pendant laquelle le caillé est vidé de son petit lait (lactosérum). L'égouttage a été réalisé à l'aide d'une passoire pendant 1 heure jusqu'à évacuation partiel du lactosérum, puis malaxée à l'aide d'un mixeur et salé à raison de 1% (4 g de sel pour 400 g de fromage).

IV.2.3. Enrichissement des fromages avec les graines de pin d'Alep

L'enrichissement des fromages fabriqués a été réalisé comme suit :

- ✓ **Lot A (le témoin)** : fromage frais sans aucun rajout.
- ✓ **Lot B** : On ajoute à raison de 0,5% de graines entières de *P. halepensis Mill.* (2 g pour 400 g de fromage)
- ✓ **Lot C** : On ajoute à raison de 0,5 % (2 g de la poudre des graines de *P. halepensis Mill.*)

IV.2.4. La conservation

Après le conditionnement des trois échantillons dans les pots, les fromages frais (nature et enrichis) sont conservés au réfrigérateur à 4°C.

IV.3. Tests sensoriels

Elle repose sur la dégustation des fromages en réponse à un questionnaire fournie en annexe 02. Les séances de dégustation se sont déroulées dans des conditions non normalisées et par un panel de 34 dégustateurs naïfs

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Extraction des composés bioactifs à partir de la matrice végétale

L'extraction des composés bioactifs a été faite par la méthode de macération par solvant (éthanol/eau) de la matière végétale brute et délipidé.

Les extraits obtenus par la méthode de macération (éthanol et l'eau) sont, de couleur jaunâtre foncée pour les extraits éthanoliques, jaune claire à transparente pour les extraits aqueux.

➤ Délipidation par la méthode soxhlet

✓ La teneur en matière grasse (Rendement d'extraction)

L'huile extraite à partir des graines de *Pinus halepensis* utilisant la méthode soxhlet est une huile fluide relativement inodore avec une couleur jaune foncé. Le rendement a été déterminé par rapport à 20 g de matière végétale sèche. La teneur en huile obtenue est de 60% soit (12 / 20 g) de matière sèche brute.

Un résultat qui confirme la richesse en matière grasses de ces graines. Selon **Kadri et al. (2013)**, le taux de pépins du pin varie entre 31% et 68%, ce qui est en concordance avec les résultats retrouvés. Les graines oléagineuses peuvent représenter une bonne source d'acides gras essentiels et donc une bonne source d'énergie alimentaire. Dans l'étude de **Kadri et al. (2015)** les taux de lipide enregistrés varient selon les espèces de 19,7% pour les graines de l'espèce *P. halepensis*, 23,9% pour *P. canariensis*, 24,1% pour *P. pinaster*, et 36,7% pour *P. pinea* pour les espèces localisées au nord de l'Algérie. Par rapport au taux de lipides des espèces sus citées, la variété utilisée des graines de *P. halepensis* originaire de Médéa est remarquablement supérieure en matière grasse.

En Tunisie, les graines de *P. halepensis* Mill. Contiennent 43,3% en lipides totaux (**Cheikh-Rouhou et al., 2006**). Au Chili, la concentration moyenne en lipides totaux est de 40,2 % dans les semences de trois macro zones différentes de l'espèce *P. pinea* (**Loewe-Muñoz et al. 2018, López-Mata 2001**), des valeurs qui reste inférieures aux valeurs déterminées dans cette étude. Cependant aux États-Unis, les graines décortiquées de *P. cembroides* possèdent une bonne source d'huile avec une concentration de 64%, avec une composition souhaitable en acides gras (**Wolff et Marpeau 1997**), un taux qui est légèrement supérieure à la valeur déterminée dans la présente étude. Les variations en teneur en matières grasses peuvent être dues à la variation entre les espèces et notamment la composition du sol entre les régions (**Nasri et al. 2005, Nergiz et Dönmez 2004**).

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne des extraits des graines de *Pinus halepensis* Mill. Vis-à-vis des souches pathogènes

L'activité antimicrobienne des extraits des graines de *Pinus halepensis* Mill. a été évaluée sur six souches microbiennes (bactéries et champignons), cette activité a été réalisée par la méthode d'aromatogramme par diffusion. Le pouvoir antimicrobien a été estimé par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions en millimètre.

II.1. Résultats de la pureté des souches pathogènes à testées

A. Examen macroscopique et microscopique

Le résultat de cet examen est résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau X : Résultats des tests catalase, coloration de Gram, aspect macroscopique et microscopique des souches pathogènes.

Les souches pathogènes	Observation macroscopique	Gram	Catalase	Forme	Groupement
<i>Staphylococcus aureus</i>	Blanche petite	+	+	Coque	Grappe de raisin
SARM	Blanche petite	+	+	Coque	Grappe de raisin
<i>Escherichia coli</i>	Blanche grande	-	+	Bacille	Chaînette / isolée
<i>Salmonella enterica</i>	Blanche très petit	-	+	Bacille	Chaînette / isolée
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blanche grande	-	+	Bacille	Diplobacilles
(+) : positif (-) : négatif. SARM : <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline					

Les résultats de l'observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram) montrent que les bactéries utilisées sont pures et non contaminées (Tableau X). Les souches sont ensuite conservées à 4 °C pour une éventuelle utilisation.

II.2. Activité antimicrobienne des extraits aqueux vis-à-vis des souches pathogènes testées.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux des graines de *P. halepensis* Mill. N'a révélé aucune zone d'inhibition vis-à-vis de toutes les souches pathogènes testées.

II.3. Activité antimicrobienne des extraits organiques vis-à-vis des souches pathogènes testées

❖ Extrait brut

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut sont représentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Diamètre des zones d'inhibition en millimètre des extraits bruts relatives aux différentes souches pathogènes testées

	Température/temps d'extraction (40°C/3h)								
	Ratio solide/liquide (g/ml)								
	1/10			2/10			3/10		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Escherichia coli</i>	10	17	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	13	16	13	13	21	-	-	-
SARM	18	-	-	15	13	26	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	-	25	21	22	-	18	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	21	20	24	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	21	16	15	23	17	-	-	-

(R) répétition, (-) absence de zone d'inhibition, SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la métilcilline

Les résultats de l'extrait brut testé sur les souches pathogènes montrent une absence totale des zones d'inhibition vis-à-vis des souches testées pour le ratio 3/10, apparition des zones d'inhibition pour le ratio 1/10 et le ratio 2/10 vis-à-vis des souches pathogènes testées. Le nombre des zones d'inhibitions pour le ratio 2/10 est plus important que le ratio 1/10. La meilleure zone d'inhibition est de 26mm enregistré pour le ratio 2/10 vis-à-vis de la souche SARM, la minimale zone d'inhibition (10 mm) est obtenue avec le ration 1/10 vis-à-vis de la souche *E. coli*.

❖ **Extrait délipidé**

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait délipidé sont illustrés dans le tableau XII.

Tableau XII : diamètre des zones d'inhibition (en millimètre) des extraits délipidés relatives aux différentes souches pathogènes testées

	Température/temps d'extraction (40°C/3h)								
	Ratio solide/liquide (g/ml)								
	1/10			2/10			3/10		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
<i>Escherichia coli</i>	-	17	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SARM	12	-	-	-	21	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	17	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	16	21	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	24	-	-	-	-

(R) répétition, (-) absence de zone d'inhibition, SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline

Les résultats de l'extrait délipidé testé sur les souches pathogènes montrent une absence totale des zones d'inhibition des souches testées dans le ratio 3/10, La présence des zones d'inhibitions avec des diamètres hétérogènes vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *SARM*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans* pour les ratios 1/10 et 2/10. Il est à noter qu'aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour tous les ratios testés vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

La meilleure zone d'inhibition de 24mm de diamètre est obtenue pour le ratio 2/10 vis-à-vis de *Candida albicans*. Par contre, la zone d'inhibition la plus minimale de 12mm de diamètre est enregistrée pour le ratio 1/10 vis-à-vis de la souche *SARM*.

L'activité antimicrobienne des différentes concentrations des extraits éthanoliques des graines de *Pinus halepensis* Mill ont montrées une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (cas de l'extrait brut), *Escherichia coli*, *SARM*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*.

L'extraction (macération) des composés bioactifs par l'utilisation de l'éthanol comme solvant donne des résultats positifs en termes d'activités antimicrobienne par rapport celle obtenues dans la méthode d'extraction utilisant de l'eau comme solvant. Cela est dû probablement à des meilleurs rendements d'extraction des composés bioactifs obtenus pour l'éthanol par comparaison à ceux extraits avec de l'eau.

En plus, les extraits éthanoliques présentent une meilleure efficacité contre les Gram positifs par comparaison au Gram négatif malgré la présence d'enveloppe riche en lipopolysaccharides (rôle de protection).

L'effet inhibiteur des extraits éthanoliques sur la croissance des bactéries peut être expliqué par plusieurs raisons. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer la chélation des métaux tel que le fer qui est nécessaire à la croissance microbienne, l'action sur les membranes des micro-organismes conduisant à la perte de son intégrité structurale (**Akiyama et al., 2001**), l'effet endommageant de la bicouche lipidique (**Funatogawa et al., 2004**), et enfin, l'action sur le métabolisme bactériens (**Scalbert, 1991**).

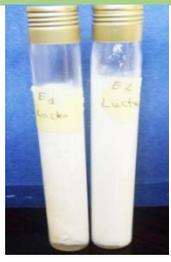
III. La fabrication de fromage frais enrichis à partir de graine du Pin d'Alpe « *Pinus halepensis Mill.* »

III-1. Analyses de lait cru entier

II-1-1. Résultats de l'analyse physico-chimique du lait cru entier

Les résultats obtenus ont été comparé aux valeurs appliquées par la fromagerie et ils sont résumés dans le tableau **XIII**.

Tableau XIII : Résultats de l'analyse physico-chimique de lait cru entier

Paramètres	Acidité titrable	Stabilité	Réductase	Lacto-fermentation	ATB
Photographie du résultat					
Réaction	M=16,83± 1,04	+	-	Gélifie	-
Norme	<18 °D	Stable	Pas de dégradation de couleur	Gel	Absence
(-) réaction négative, (+)réaction positive, (ATB) antibiotique, °D : degré Dornic					

Nous pouvons dire que le lait cru est d'une qualité physico-chimique satisfaisante et ceci conformément à la réglementation nationale.

III-1-2. Résultats des analyses microbiologiques de lait cru entier

Les résultats des analyses bactériologiques effectuées sur le lait cru entier utilisé lors de nos expérimentations, ainsi que les normes utilisées par la laiterie, recommandées par le Journal Officiel de la République Algérienne n° 39 de l'année 2017 sont résumées dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Résultats des analyses bactériologiques de lait cru entier.

Les germes	Norme (UFC/mol)	Essai 1	Essai 2
FTAM	10^5	$\ll 10^5$	$\ll 10^5$
Coliformes totaux	10^2	$< 10^2$	$< 10^2$
Coliformes fécaux	10^2	$< 10^2$	$< 10^2$
Staphylocoques	10^2	$< 10^2$	$< 10^2$
Salmonella	Absence dans 25ml	-	-
FTAM=flore total aérobie mésophile, (<) inférieur, (-) absence			

Les résultats obtenus ont permis d'évaluer la bonne qualité microbiologique de la matière première (lait entier cru) avant l'utilisation par comparaison à la réglementation nationale en vigueur.

Les germes recherchés et dénombrés dans notre travail sont considérés comme des indicateurs de la qualité globale du produit fini et reflètent le respect ou non des bonnes pratiques d'hygiène. Nous pouvons dire que le lait cru est de qualité microbiologique satisfaisante et ceci conformément à la réglementation nationale. Ce qui nous emmène à valider l'échantillon du lait cru entier pour la fabrication du fromage.

III.2. Résultats des tests sensoriels

Le récapitulatif des résultats d'appréciation des différents fromages A (fromage frais nature), B (fromage frais enrichi avec la graine entière du pin) et C (fromage frais enrichi avec la graine broyée du pin) par les dégustateurs (34 personnes) est résumé dans le tableau XV.

Tableau XV : Résultats d'appréciation des différents fromages frais A, B et C selon les différents attributs sensoriels.

		Fromage A	Fromage B	Fromage C
Couleur	Blanc	26/34 (76%)	25/34 (74%)	24/34 (71%)
	Jaune	06/34 (18%)	06/34 (18%)	07/34 (21%)
	Jaune pâle	02/34 (06%)	03/34 (09%)	03/34 (09%)
Odeur	Forte	04/34 (12%)	05/34 (15%)	02/34 (5%)
	Moyen	10/34 (29%)	27/34 (80%)	09/34 (25%)
	Faible	20/34 (59 %)	02/34 (05%)	24/34 (70%)
Acidité	Forte	19/34 (55%)	04/34 (12%)	13/34 (40%)
	Moyenne	15/34 (45%)	26/34 (76%)	18/34 (54%)
	Faible	00/34 (0%)	04/34 (12%)	02/34 (6%)
Goût salé	Forte	04/34 (13%)	06/34 (18%)	07/34 (20%)
	Moyen	25/34 (73%)	23/34 (68%)	21/34 (62%)
	Faible	05/34 (14%)	05/34 (14%)	06/34 (18%)
Texture	Fondante	25/34 (73%)	19/34 (56%)	16/34 (47%)
	Granuleuse	04/34 (13%)	04/34 (12%)	02/34 (06%)
	Collante	05/34 (14%)	11/34 (32%)	16/34 (47%)
<p>Fromage A : fromage frais nature, Fromage B : fromage frais enrichi avec la graine entière du pin, Fromage C : fromage frais enrichi avec la graine broyée du pin,% : pourcentage d'appréciation par rapport l'effectif total des naïfs.</p>				

D'après les résultats obtenus, des pourcentages d'appréciation divergents ont été obtenus pour les différents attributs sensoriels (couleur, odeur, acidité, le goût salé et la texture) pour les trois types fromages testés. L'attribut sensoriel pâte blanche dans le fromage A a obtenu le pourcentage d'appréciation le plus élevé (76%) par les naïfs. Au même temps, ce résultat a été confirmé, pour le même fromage A, par l'obtention du pourcentage d'appréciation le plus faible (06%) par les naïfs de l'attribut sensoriel pâte jaune. En général, les naïfs ont constaté que la pâte des trois fromages est plutôt de couleur blanche (entre 71 à 76%). Généralement, cela est dû probablement au taux faible en matière grasse et/ou de la B-carotène contenue dans le lait entier (lait de vache) impacté par l'ajout du vinaigre lors du processus de fabrication du fromage (Zeller, 2005).

L'attribut sensoriel « odeur moyenne » pour le fromage B a obtenu le pourcentage d'appréciation très le plus élevé (80%) par les naïfs. Cet attribut sensoriel « odeur moyenne » pour le fromage B (apprécié par la majorité des naïfs), est peut-être dû à l'intégrité physique des graines du pin utilisées dans l'enrichissement du fromage frais et au fait que le fromage frais enrichi a été fraîchement fabriqué, ce qui a empêché le développement et surtout la migration d'arômes vers le fromage frais directement liée à son temps de conditionnement. La plupart des natifs (76%) ont apprécié l'acidité moyenne du fromage B. Alors que, L'attribut sensoriel « acidité forte » le plus élevé est attribué au fromage A (témoin), ce qui pourrait être imputé à l'ajout des graines entière du pin au fromage frais, ce qui a contribué, par conséquent, à la diminution de l'acidité naturelle du fromage frais (dû aux bactéries lactiques).

Nous constatons que le pourcentage de du goût salé est convergent dans tous le fromage fabriqué est presque le même, (avec un pourcentage d'appréciation moyen de 67% par les dégustateurs naïfs) montre une salinité moyenne. Cela est lié à la même quantité de sel utilisé ajoutée lors de la fabrication du fromage frais ou enrichi. En plus, les naïfs ont qualifié majoritairement les trois fromages frais fabriqués en premier lieu de fondant (entre 47 à 73%) et en deuxième lieu de collant (de 14 à 47%). Cela est due fort probablement à l'opération du mixage lors de la préparation des trois types de fromages frais et enrichis

- **Choix préférentiel des fromages (test hédonique)**

Selon des résultats obtenus les naïfs ont été questionnés sur leur préférence finale parmi les trois fromages frais et enrichis produits après consommation. Les résultats du test hédonique montrent que la plupart de naïfs (à 60%) ont préférés et choisis le fromage B (fromage frais enrichi avec la graine entière du pin) en premier suivi du fromage C et fromage A.

CONCLUSION

ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude est de mettre en lumière le potentiel antimicrobien des graines de pin d'Alep « *Pinus halepensis Mill* » vis-à-vis de six souches pathogènes les plus incriminées dans les maladies touchant l'homme et/ou l'innocuité des produits alimentaires. Un enrichissement d'une matrice alimentaire « fromage frais », suivi d'un test sensoriel a été réalisé pour apprécier une éventuelle valorisation de ces graines.

Les résultats de l'activité antimicrobienne mis en évidence par la méthode de l'aromatogramme montrent que les extraits préparés à partir de la poudre des graines de *Pinus halepensis Mill* ont une activité hétérogène et à large spectre vis-à-vis des souches pathogènes testés. 26 mm pour *candida albicans*

A l'issue de ces résultats une fabrication d'un fromage frais au lait entier a été réalisée. Le lait utilisé une fois analysé (analyses physico-chimiques et microbiologiques) s'avère de qualité conforme aux normes établies par législation Algériennes.

Trois échantillons de fromage frais enrichis ou non avec les graines (ou poudre) de *Pinus halepensis Mill* ont été fabriqués. Les résultats des tests sensoriels montrent que le fromage frais enrichi avec les graines entières de *Pinus halepensis Mill*. Possèdent un pourcentage d'appréciation le plus important (60%) comparés aux autres fromages fabriqués avec la poudre des graines ou sans graines du tout. Ce résultat ouvre une nouvelle voie pour d'une éventuelle proposition d'une nouvelle variété de fromage enrichi avec les graines de pin d'Alep.

En perspective, ces résultats restent préliminaires, il serait intéressant de compléter avec des études pour comprendre et déterminer la nature des molécules bioactives qui ont permis d'avoir ce potentiel antimicrobien. L'effet antimicrobien de ces graines une fois vérifié dans la matrice fromagère pourra être proposé comme bioconservateur et d'éviter ainsi l'utilisation des additifs/conservateurs chimiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

A

AKIYAMA H, FUJII K, YAMASAKI O, OONO T et IWATSUKI K., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 487-491

AMARIGLIO S., 1986. Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physiques et chimiques.- 3 ème éd.- Paris : ITSV. 1030 p.

AMMARI.Y, SGHAIER.T, KHALDIA et GARCHI.S., 2001. Productivité du pin d'Alep en Tunisie : Table de Production. *Annales de LINGREF N_ Spécial*. Pp 239-246.

B

BARBONI T., 2006 Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. *Thèse de doctorat*. Université de Corse Pascal Paoli.

BAKER J., GRATH M et JAC S., 2000. Metal hyper accumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal - polluted soils. *In* N. T. G. Banuelos, editor. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Pp 246-250.

BAYLK W., MATHAWSK I et PILEWSKI N., 2004. Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association*. Pp 24-26.

BENAISSA O., 2011. Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité Biologique*. Thèse Doctorat. 03 p.

BENJILALI B., 2004. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. *Manuel pratique*. *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation*. Pp 17-59.

BENTOUATI A., 2006. Croissance, productivité et aménagement des forêts de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) du massif d'OuledYaagoub (Khenchela-Aurès). *Thèse Doctorat*. Pp116 -119.

BOBBOU A., 2016. Contribution à l'étude d'inventaire de peuplement de pin d'Alep de la forêt de Sig (forêt de Moulay Ismail), mémoire, master en foresterie, univ.Tlemcen. 55 p

BOUTCHICHE F et BOUTRIGHE S., 2016. Caractérisation morpho métrique de la chenille processionnaire (*Thaumetopoea pityocampa*) et de son hôte au niveau de la wilaya de Tlemcen. Mém, master en génétique, univ, Tlemcen. 79 p

BRAVO L., 1998. Nutrition Review, 56. Pp317–333.

BERESFORD T, WILLIAMS A., 2004. The microbiology of cheese ripening *Cheese in Chemistry, physics and microbiology*. Ed. Elsevier academic press. 287-317.

C

CHEIKH-ROUHOUS, HENTATI B, BESBES S, BLECKER C, DEROANNE C, ATTIA H. 2006. Chemical composition and lipid fraction characteristics of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seeds cultivated in Tunisia. *Food science and technology international* 12: 407-415.

CHEMAT F., HUMAZ et KHAN M., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18, Pp 813-835.

CHOI YM, NOH DO et CHO SY., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of Propolis from several regions of Korea. *LWT* 39, Pp 756–61.

CHOKRI M., 2005. Etude de l'effet de l'irradiation sur la conservation de pin d'Alep et sur les mycotoxines. *Thèse Doctorat*. Pp 13-17.

D

DOSSOU J, HOUNZANGBE A.S, SOULE H., 2006. Production et transformation du lait frais en fromage peulh au Benin, guide de bonnes pratiques, Manuel de transformation du lait. 330 p.

DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY K et MAIGA A., 2004. Constituents study of the *Ziziphys mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), used traditionally to treat diabetes in Mali. *Comptes rendus Chimie*, 7. Pp 1073-1080.

E

ECK A et GILLIS J., 2006. Le fromage. 3ème Edition : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 891p

EPIFANO F., GENOVES S., MENGHINI L et CURINI M. 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68. Pp939-953.

F

FEKIH N., ALLALI H., MERGHACHE S., CHAIB F., MERGHACHE D., EL AMINE M et COSTA J., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinushalepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2). Pp 97-103.

FOX P. F, GUINEE T. P, COGAN T. M, MCSWEENEY P. L. H., 2000. Bacteriology of Cheese Milk in *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg (Aspen Publishers) Maryland. Pp 45-53.

FRANWORTH E et MAINVILLE I., 2010. Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique, Centre de recherche et de développement sur les aliments. Saint-Hyacinthe.

FREDOT E., 2005. Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14. 397 p

FUNATOGAWA K, HAYSHI S, SHIMOMURA H, YOSHIDA T, HATANO T, ITO H. et HIRAI Y., 2004. Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plant against *Helicobacter pylori*. *Microbiology and Immunology*, 48 (4): 251-261.

G

GOUDEDRANCHE H, BENEDICTE C., 2001. Filière de production : produits d'origine animale, procédés de transformation fromagère.

GONZALEZ-GALLEGOJ., SANCHEZ-CAMPOS S. et TUNON J., 2007.Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricinhospitalaria*, 22 (3). Pp 287-293.

GUILLAUME L., 2012. Etude du métabolisme carboné et azoté de *Miscanthus x giganteus*. Thèse Doctorat.Pp52-54.

GUIRAUD J.P et GALZY P.,1998. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition : Usine. Paris. 239p.

GUIRAUD J.P., 2003.Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp : 136-139.

H

HERMIER J., LENOIR J., WEBER F., 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier .Edition CEPIU, paris, pp. 62-88.

I

INOUE T, TSUBAKI S, OGAWA B, ONISHI K et AZUMA J.I., 2010. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 123.Pp 542-547.

IRELAND J, FAVIER J.C et FEINBERG M., 2002. Répertoire général des aliments Tome 2 ; produits laitiers. 2^{ème} édition. Ed. Techniques et Documentation – Lavoisier, Paris.

J

JAWAD A, LANGHRISH T.A.G., 2012. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109. Pp 162-174.

JEANTET R, CROGUENNEC T, MAHAUT M, SCHUCK P. et BRULE G., 2008. Les produits laitiers ,2ème édition, Tec et Doc, Lavoisier : 1-3-13-14-17 .185 p.

JOFFIN C et JOFFIN JN., 1999. Microbiologie alimentaire Collection biologique et techniques. 5 ème édition, 11 p.

K

KADIK B., 1983. Contribution à l'étude du pin d'Alep en Algérie : Ecologie, dendrométrie, morphologie. Thèse Doctorat. Etat, Aix-Marseille III, 313 p.

KADIK B., 1987. Contribution à l'étude du pin d'Alep (*PinushalepensisMill.*) En Algérie : Ecologie, dendrométrie, morphologie. Ed. OPU. Alger., 581p.

KADRI N, KHETTAL B, YAHIAOUI-ZAIDI R, BARRAGAN-MONTERO V et MONTERO J-L. 2013. Analysis of polar lipid fraction of *Pinus halepensis* Mill. seeds from North Algeria. *Industrial crops and products* 51: 116-122.

KADRI N, KHETTAL B, AID Y, KHERFELLAH S, SOBHI W, BARRAGAN-MONTERO V 2015. Some physicochemical characteristics of pinus (*Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L., *Pinus pinaster* and *Pinus canariensis*) seeds from North Algeria, their lipid profiles and volatile contents. *Food chemistry* 188: 184-192.

L

LAHOUATI R., 2000. Expérience des Plantations en Climat Aride. Cas de la Ceinture Verte en Algérie. Direction Générale des forêts, Ministère de l'Agriculture, Alger.

LOEWE-MUNOZ V, ÁLVAREZI A et NAVARRO-CERRILLO R., 2018. Morphometric and chemical fruit variability of selected stone pine trees (*Pinus pinea* L.) grown in non-native environments. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 152 : 547-555.

LOPEZ-MATA L. 2001. Proteins, amino acids and fatty acids composition of nuts from the Mexican endemic rarity, *Pinus maximartinezii*, and its conservation implications. *Interciencia* 26: 606-610.

LUQUET F. M., 1985. Laites et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laites De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris.

LUQUET F.M et CORRIEU G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 p.

M

MAESTRE F.T, CORTINA J., 2004. Insights into ecosystem composition and function in a sequence of degraded semiarid steppes. *RestorationEcology* 12. Pp 494-502.

MAHAUT M, ROMAIN J, BRULE G et PIERRE S., 2000. Les produits industriels laitiers. Technique et documentation Lavoisier. Paris, Pp 34-45.

MARFAK A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges. Pp 7- 62.

MARONGIU B, PORCEDDA S, PIRAS A, ROSA A, DEIANA M et DESSI A., 2004. Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*, *Phytoter. Res.*, 18.Pp 789 – 792.

MASCLAUX-DAUBRESSE C, DANIEL-VEDELE F, DECHRGNAT J, CHARDON F, GAUFICHON L et SUZUKIA., 2010 Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Journal of Experimental Botany* 62.Pp 1375-1390.

MATHIEU J., 1998. Ecole nationale des industries du lait et des viandes de la Roche-Sur-Foron. Initiation à la physico-chimie du lait. Edition. Tec et Doc. Lavoisier, Paris. Pp 12-210.

MAZLIAK P., 2000. Physiologie végétale. Tome I. Edition Heremann. ISBN: 2705659439. 521p.

MEZALI M, 2003. Rapport sur le secteur forestier en Algérie. 3^{ème} session du forum des Nations Unis sur les forêts, 9 p.

MEZERAÏ DJ, 2014. Ecologie du pin d'Alep (*Pinus halepensis*) dans la région de Tlemcen, mémoire, master en biologie, univ. Tlemcen, 85 p.

MOREL I., 1962. Enquêtes sur la présence d'antibiotiques dans le lait de trois zones de production, 1962. Lait, 42, Pp 593-601.

N

NACZK M et SHAHIDI F 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41.Pp 1523-1542.

NAHAL I 1962. Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Etude taxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Ann. Ecole eaux et forêts. Sta. Rech. Exp.19(4), 208p.

NASRI N., KHALDI A., FADY B., TRIKI S., 2005. Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L: Composition and population profiling. Phytochemistry 66: 1729-1735.

NERGIZ C, DONMEZ I. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. Food chemistry 86: 365-368.

NEWMAN D. J., CRAGG G. M, SNADER K. M., 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. J. Nat. Prod: 66, Pp 1022-1037.

O

ORHAN D.D, OZCEELIK B, HOSBASS. et VURAL M., 2012. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, And antifungal activities of some plants used as

folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. Turkish journal of boilogy, Pp 672-686.

OZENDA P., 2006. Les végétaux. Organisation et diversité biologique. 2ème édition. Dunod. Paris. 516p.

P

PENCHEV P.I, 2010. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat-Université de Toulouse.

PIERRE M, LIS M., 2007. Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1. 463p.

POUGHEON S et GOURSAUD J., 2001. Le lait caractéristiques physicochimiques In DEBRY G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6. 566 p.

Q

QUEZEL P., 2000. Taxonomy and biogeography of Mediterranean pines (*Pinushalepensis* and *Pinusbrutia*). In: Ecology, Biogeography and Management of *Pinushalepensis* and *P. Brutia* Forest Ecosystems in the Mediterranean Basin. Eds., Néeman G., Trabauds L., Backhuys Publishers, Leiden, Pp1-12.

R

REN W, QIAO Z, WANG H, ZHU L et ZHANG L., 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. Medicinal research reviews.23 (4). Pp 519-539.

RIBEIRO M.A, BERNARDO-GIL M.G et ESQUIVEL M.M., 2001. Melissa officinalis, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, Journal of Supercritical Fluids, 21 .Pp 51 –60.

ROUDAUT H et LEFRANCQ E., 2005. Alimentation théorique. Ed. DOIN, France.

ROSS P. R, MORGAN S et HILL C., 2002. Preservation and Fermentation: present and future. *Int. J. Food. Microbiol.* 79.Pp 3 – 16.

S

SAARNI-MANCHADO P, CHEYNIER V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions *Tec & Doc*, 398 p.

SCALBERT A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.

SOFOWOR., 2010. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique. Paris, France, Karthala, 378 p.

STALIKAS C. D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, Pp 3268–3295.

SUN H, CHEN L, WANG J, WANGB K, ZHOUA J., 2011. Structure–function relationship of the saponins from the roots of *Platycodongrandiflorum* for hemolytic and adjuvant activity. *International Immunopharmacology* 11. Pp 2047–2056.

T

TALA P.K., 2008. Cours d’Anatomie et Propriétés du bois. Département de Foresterie, Faculté d’Agronomie et des Sciences Agricoles, Université de Dschang, Cameroun.

TAWAHA K, ALALI FQ, GHARAIBEH M, MOHAMMAD M et EL-ELIMAT T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry* 104: 1372-1378.

THIEULIN et VUILLAUME 1967.Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait de produits laitiers et des œufs-revue générale des questions laitières 48 avenue, Président Wilson, Paris : 71-73. 388 p.

V

VIGNOLA C.L., 2002. Science et technologie du lait –Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34.600 p.

W

WALTHER B, SCHMID A, SIEBER R et WEHRMULLER K., 2008. Cheese in nutrition and health. Dairy Sci. Technol. 88, 389 – 405.

WALSTRA P, WOUTERS J. T. M., GEURTS T. J., 2006. Dairy science and technology. Ed. CRC taylor and francis Group, CLL. 756p.

WANG L, WELLERC.L., 2006.Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology. 17, Pp300-312.

WOLFF RL, MARPEAU AM. 1997. Δ^5 -olefinic acids in the edible seeds of nut pines (*Pinus cembroides edulis*) from the United States. Journal of the American Oil Chemists' Society 74: 613-614.

Z

ZELLER B., 2005. Le fromage de chèvre : spécificités technologiques et économiques. Thèse de doctorat. Ecole vétérinaire de Toulouse.11p

ZENZEN W., 2016. Utilisation du S.I.G pour l'analyse de la structure de la forêt d'Ouennougha dans la Wilaya de Bordj Bou Arréridj, mémoire, master en foresterie, univ. Tlemcen, 60p.

LES ANNEXES

ANNEXE 01 : Composition des milieux de culture, quantité suffisante pour 1L.

Tableau I: Milieu M.R.S (Man Rogosa Sharpe. pH = 5, 7

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1 mL
Phosphate dipotassique	02
Acétate de sodium	03
Citrate triammoniacale	02
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

Tableau II : Milieu M17 (pH = 7,1)

Composants	g/l
Tryptone	2.5
Extrait de viande	5
Extrait de levure	2.5
Peptone papainique de soja	2,5
Peptone pepsique de viande	5
Peptone de caséine	10
Acide ascorbique	0.5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19

Tableau III : Milieu VRBL (lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre. pH = 7,4)

Composants	g/l
Peptone	7
Extrait de levure	3
Lactose	10
Chlorure de sodium	5
Mélange de sels biliaires	1,5
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002

Tableau IV : Milieu Chapmen

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande de boeuf	01
Chlorure de sodium	75
Mannitol	2,5
Rouge de phénol	0.025
Agar	15

Tableau V : Milieu Muller-Hinton

Composants	g/l
Infusion de viande de bœuf	300
Hydrolysa de caséine	17,5
Amidon	11,5
Agar	17

Tableau VI : Milieu BHI (Bouillon cœur-cervelle. pH 7,4)

Composants	g/l
Infusion de cervelle de veaux	12,5
Infusion de coeur de boeuf	05
Peptone de gélatine	10
Glucose	02
Chlorure de sodium	02
Phosphatase di sodique	05

Tableau VII : Milieu Hektoen

Composants	g/l
Mélange de peptone	25
Lactose/ Saccharose	12
Salicine	01
Chlorure de sodium	02
Thiosulfate de sodium	01
Citrate d'ammonium	02
Citrate trisodique	1,25
Sels biliaires	1,5
Acide fuschique	0,025
Bleu de bromothymol	0,05

Tableau VIII : Milieu de Giolitti et Cantoni

Composants	g/l
Tryptone	10
Extrait de viande	05
Extrait de levure	05
Chlorure de l' lithium	05
Mannitol	20
Chlorure de sodium	05
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	03

Tableau IX : Milieu Litsky (pH 6,8)

Composants	g/l
Peptone	20
glucose	05
azide	0,2
Ethyl-violet	0,5
Chlorure de sodium	05
Hydrogénophosphate de potassium	2,7
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7

Tableau X : Milieu Rothe (pH 6,8)

Composants	g/l
Peptone	20
glucose	05
azide	0,5
Chlorure de sodium	05
Hydrogénophosphate de potassium	2,7
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7

Tableau XI : Gélose nutritive (pH=7)

Composants	g/l
Extrait de viande	01
Chlorure de sodium	05
Peptone	05

Tableau XII : Eau physiologique (ph=7)

Composants	g/l
Chlorure de sodium	09

ANNEXE 02

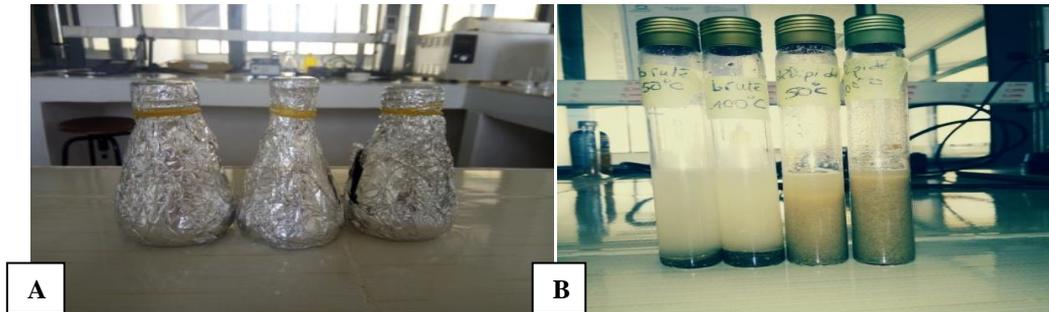
Evaluation sensorielle de fromages fabriqués avec les graines de *Pinus halepensis* Mill.

1/ COULEUR	Blanche	Jaune	Jaune pale
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
2/ ODEUR	Faible	Moyen	Fort
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
3/ GOUT ACIDE	Faible	Moyen	Fort
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
4/ GOUT SALE	Faible	Moyen	Fort
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
5/ TEXTURE FONDANTE	Absente	Faible	Moyenne
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
6/ TEXTURE GRANULEUSE	Absente	Faible	Moyenne
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C
7/ TEXTURE COLLANTE	Absente	Faible	Moyenne
Echantillon A
Echantillon B
Echantillon C

Quel est l'échantillon que vous préférez ?

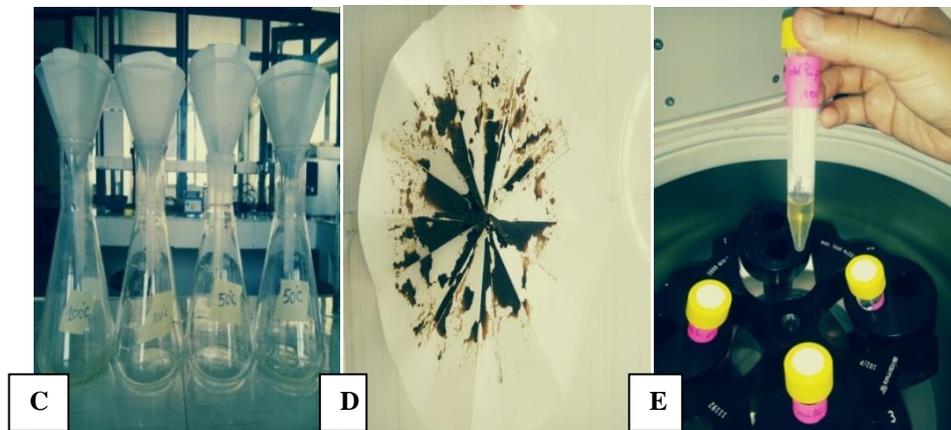
* Merci pour votre coopération *

ANNEXE 03



Photographie de la macération de la poudre des graines de *Pinus halepensis* Mill. ;

A : macération à l'éthanol, B : macération à l'eau



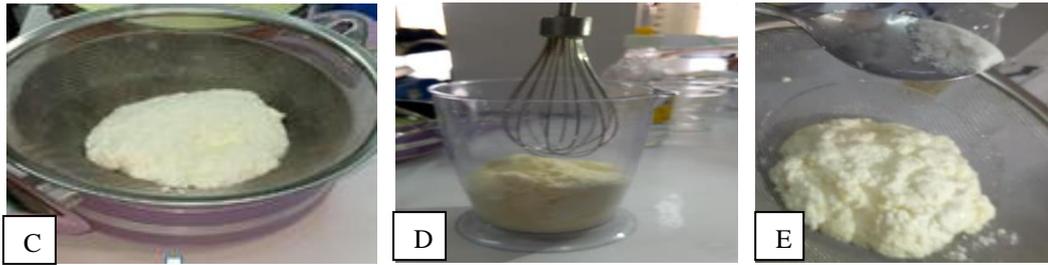
Photographie de la filtration et centrifugation des extraits des graines de *P. halepensis*

Mill après macération, A Filtration, D Centrifugation

ANNEXE 04



photographie de fabrication de fromage A- Le caillage, B- Le caillé obtenue



Photographie de fabrication de fromage A-égouttage, B-malaxage, C-salage



La conservation des fromages

ANNEXE 05

Tableau X : Récapitulatif des analyses de la qualité du lait cru utiliser pour la fabrication du fromage frais

Analyses à effectuer		Tests	Normes
Analyses physico-chimiques		Détermination de l'acidité titrable	18°D
		Epreuve de l'ébullition	Le lait frais ne coagule pas
		La lactofermentation (37°C)	Divers
Analyses microbiologiques		La réductase	Lait de bonne qualité ne coagule pas
	Dénombrement	Microorganismes aérobies	10 ⁵ germes/ml
		Coliformes fécaux	10 ² germes/ml
		Coliformes totaux	10 ² germes/ml
	Recherche	<i>Salmonella</i>	Abs/0,1ml
		<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² germes/ml
Antibiotiques		Absence/ml	

D : degré dornic

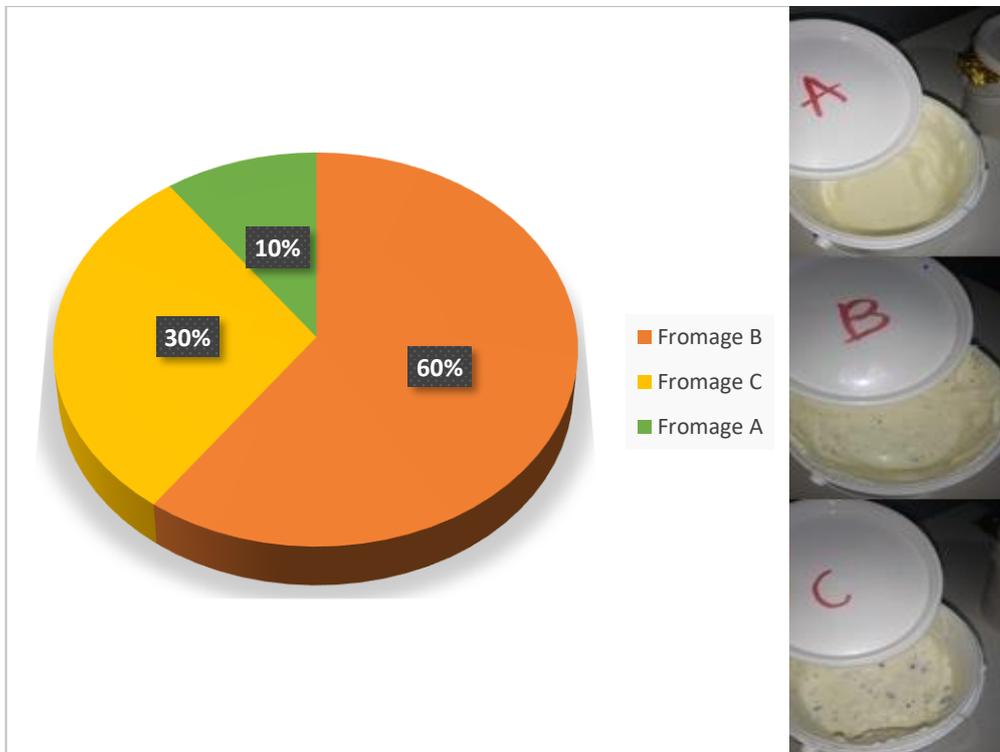
ANNEXE 06



Photographie des extraits éthanoliques



Photographie des extraits aqueux.



Choix préférentiel des fromages produits.

Résumé

Le pin d'Alep est un arbre qui appartient à la famille des *Pinaceae*. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle à des fins thérapeutiques à cause de sa richesse en composés actifs. Cela nous a conduits à l'extraction des composés phénoliques à partir de ses graines avec l'éthanol et l'eau, suivi d'une évaluation de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes.

Elaboration d'un fromage frais enrichi avec les graines de *Pinus halepensis Mill*, des tests sensoriels du fromage sont effectués. Les tests sensoriels montrent que le fromage élaboré c'est le fromage B, enrichi en poudre brute des graines de *Pinus halepensis Mill* qui est le plus apprécié par les sujets naïfs.

Les mots clés : Pin d'Alep, *pinaceae*, plante médicinale, composés phénoliques, activité antimicrobienne, fromage frais, tests sensoriels, fromage frais type B.

Abstract

The Aleppo pine is a tree that belongs to the *Pinaceae* family. It is a medicinal plant widely used in traditional medicine for therapeutic purposes because of its richness in active compounds. This led us to the extraction of phenolic compounds from its seeds with ethanol and water, followed by an evaluation of antibacterial activity.

Elaboration of a fresh cheese enriched with *Pinushalepensis Mill* seeds, sensory tests of the cheese are carried out. Sensory tests show that the cheese made is cheese B, enriched with raw powder of *P.halepensis Mill* seeds, which is the most appreciated by naive subjects.

Keywords: Aleppo pine, *pinaceae*, medicinal plant, phenolic compounds, antimicrobial activity, fresh cheese, sensory tests, type B fresh cheese.

الملخص

الصنوبر الحلبي هو شجرة تنتمي الى عائلة *pinaceae*. هي شجرة طبية تستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لأغراض علاجية بسبب غناها بالمركبات النشطة، مما أدى الى استخراج المركبات الفينولية من بذورها باستعمال الماء والايثانول متبوعا بتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا.

اعداد الجبن الطازج ببذور شجرة الصنوبر الحلبي متبوعا باختبارات ذوقية للجبن بعد التحضير، بحيث اظهرت نتائج الاختبار ان الجبن الغني بمسحوق بذور الصنوبر الحلبي هو الأكثر تقبلا من طرف الأشخاص.

الكلمات المفتاحية: الصنوبر الحلبي، *pinaceae* شجرة طبية، المركبات الفينولية، المضاد البكتيري، جبن طازج، اختبارات ذوقية، جبن نوع ب.