



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Belarbi Malika

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

**Effet de l'extrait éthanolique de Genévrier de Phénicie
(*Juniperus phoenicea*) incorporé dans le fromage blanc
réfrigéré sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et
*Escherichia coli***

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Dr. Becheur Mourad	MAA	Président
Dr. Allali Khadidja	MCB	Examineur
Mr. Houicher Abderrahmane	Pr.	Rapporteur
Mr. Djokhdem Laid	MAA	Co-promoteur

Promotion : Juin – 2021

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: بلعربي مليكة

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

تأثير المستخلص الإيثانولي للعرعر الفينيقي (*Juniperus phoenicea*) المضاف في الجبن الأبيض المبرد على نمو *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيد بشور مراد	استاذ مساعد "أ"	رئيسا
السيدة علالي خديجة	استاذة محاضرة "ب"	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	استاذ تعليم عالي	مقررا
السيد جخدم العيد	أستاذ مساعد "ا"	مقررا

الدفعة: جوان – 2021

Résumé

Nom et Prénom : Belarbi Malika

Thème : Effet de l'extrait éthanolique de Genévrier de phénicie (*Juniperus phoenicea*) incorporé dans le Fromage blanc réfrigéré sur la croissance *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Résumé :

Le présent travail a permis d'étudier l'effet de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* inoculées dans le fromage blanc durant son stockage réfrigère à 4°C. Le rendement en extrait éthanolique des parties aériennes de *J. phoenicea* est de 5% (m/m). De plus, les résultats de dénombrement des germes pathogènes dans le fromage blanc traité par l'extrait de la Genévrier Phénicie montrent une activité modérée de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* sur la croissance des bactéries *E. coli* et *S. aureus* durant la période de conservation à 4 °C, par rapport au témoin. Les résultats du pH ont montré une fluctuation des valeurs de pH dans les groupes traités et inoculés par les deux souches où les valeurs les plus faibles sont enregistrées dans le groupe traité et inoculé par *S. aureus*. Bien que les souches testées n'aient pas été complètement inhibées, l'extrait éthanolique a permis de réduire la prolifération de ces agents pathogènes d'origine alimentaire dans le fromage blanc. L'étude présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle met en évidence les avantages potentiels de l'utilisation de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* comme antimicrobien naturel dans les produits fromagers pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et améliorer la qualité des produits.

Mots-clés : Extrait éthanolique; *Juniperus phoenicea* ; pH ; *Escherichia coli* ; *Staphylococcus aureus* ; Fromage blanc

Name and Surname: Belarbi Malika

Theme: Effect of ethanolic extract of Phoenician Juniper (*Juniperus phoenicea*) incorporated in chilled white cheese on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Abstract:

The present work studied the effect of the ethanolic extract of *Juniperus phoenicea* on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* inoculated into white cheese during its refrigerated storage at 4 °C. The yield of ethanolic extract from the aerial parts of *J. phoenicea* is 5% (m / m). In addition, the results of enumeration of pathogenic bacteria in white cheese treated with the extract of *Juniper Phenicia* show a moderate activity of the ethanolic extract of *J. Phoenicea* on the growth of bacteria *E. coli* and *S. aureus* during the storage period at 4 °C, as compared with control. The pH results showed a fluctuation of the pH values in the groups treated and inoculated with the two strains where the lowest values were recorded in the group treated and inoculated with *S. aureus*. Although the strains tested were not completely inhibited, the ethanolic extract reduced the proliferation of these food-borne pathogens in white cheese. The study is of great interest to the food industry as it highlights the potential benefits of using ethanolic extract of *J. Phoenicea* as a natural antimicrobial in cheese products to control foodborne pathogens and improve product quality.

Keywords: Ethanolic extract; *Juniperus phoenicea*; pH; *Esherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; white cheese

الاسم واللقب: بلعربي مليكة

الموضوع: تأثير المستخلص الإيثانولي للعرعر الفينيقي (*Juniperus phoenicea*) المضاف في الجبن الأبيض المبرد على نمو *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*

ملخص:

أتاح العمل الحالي دراسة تأثير المستخلص الإيثانولي من *Juniperus phoenicea* على نمو *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المضاف في جبن الابيض أثناء التخزين المبرد عند 4 درجات مئوية. مردود المستخلص الإيثانولي من الأجزاء الهوائية من هو 5% (ك / ك). بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت نتائج تعداد الجراثيم المسببة للأمراض في الجبن المعالج بمستخلص العرعر نشاطاً معتدلاً للمستخلص الإيثانولي من *J.phoenicea* على نمو بكتيريا *S.aureus* و *E.coli* خلال فترة التخزين عند 4 درجة مئوية ، نسبة إلى الشاهد. أظهرت نتائج pH تذبذباً في قيم pH في المجموعات المعالجة والمُلقحة بالسلالتين حيث سجلت أقل القيم في المجموعة المعالجة والمزروعة بـ *S.aureus* على الرغم من أن السلالات المختبرة لم يتم تثبيطها تماماً ، إلا أن المستخلص الإيثانولي قلل من تكاثر مسببات الأمراض التي ينقلها الجبن الابيض. الدراسة ذات أهمية كبيرة لصناعة الأغذية لأنها تسلط الضوء على الفوائد المحتملة لاستخدام المستخلص الإيثانولي من *J.phoenicea* كمضاد طبيعي للميكروبات في منتجات الجبن للسيطرة على مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء وتحسين جودة المنتج .

الكلمات الرئيسية: المستخلص الإيثانولي؛ *Juniperus phoenicea* ؛ pH ؛ *Escherichia coli* ؛ *Staphylococcus aureus*؛ الجبن الابيض

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....	I
Dédicace.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des abréviations.....	V
INTRODUCTION.....	1

Partie I. Synthèse bibliographique**Chapitre I: Les Fromages**

1.1. Historique	4
1.2. Définition	4
1.3. Principaux composants du fromage.....	5
1.4. Différents types de fromage.....	5
1.5. Principe de la fabrication des fromages.....	5
1.6. Jben.....	6
1.6.1. Définition.....	6
1.6.2. Préparation de fromage frais.....	7
1.6.3. Microflore du J'ben.....	8

Chapitre II Intoxications alimentaires collectives

2.1. Généralités sur les intoxications alimentaires collectives.....	11
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2.1. Taxonomie.....	12

2.2.2. Habitat.....	13
2.2.3. Caractères bactériologiques.....	13
2.2.3.1Caractères morphologiques et biochimiques.....	13
2.2.3.2. Caractères culturels.....	13
2.2.4. Intoxication alimentaire Staphylococcique.....	14
2.3. <i>Escherichia coli</i>	15
2.3.1. Classification et taxonomie.....	15
2.3.2. Habitat d' <i>Escherichia coli</i>	16
2.3.3. Description bactériologique.....	16
2.3.3.1. Caractères culturels.....	16
2.3.3.2. Caractères biochimiques.....	16
2.3.4. Intoxication alimentaire <i>Escherichia coli</i>	17

Chapitre III : Extraits de plantes

3.1. Généralités sur les extraits de plantes.....	18
3.1.1. Les principaux composés actifs des plantes médicinales.....	18
3.1.2. Les terpénoïdes et stéroïdes.....	19
3.1.3. Les alcaloïdes.....	19
3.1.4. Les polyphénols.....	19
3.1.4.1. Flavonoïdes.....	19
3.1.4.2. Tannins.....	20
3.1.5. Techniques d'extractions.....	20
3.2. Genévrier de Phénicie (<i>Juniperus phoenicea</i>).....	21
3.2.1. Noms vernaculaires et classification.....	22

3.2.2. Description botanique.....	22
3.2.3. Aire botanique.....	23
3.2.4. Répartition en Algérie.....	23
3.2.5. Ecologie.....	24
3.2.6. Composition chimique et activités biologiques de <i>Juniperus phoenicea</i>	24
3.2.6.1. Composition chimique.....	24
3.2.6.2. Activités biologiques.....	25

Partie II : Etude expérimental

Chapitre IV : Matériel et méthodes

4 .1 . Objectif.....	26
4.2. Matériel végétal.....	26
4.3. Extraction éthanolique.....	27
4.5. Matériel biologique.....	30
4.6. Préparation du fromage.....	31
4. 7. Incorporation de l'extrait et l'inoculum dans le fromage blanc.....	33
4 .8. Mesure de pH.....	34
4 .9. Analyse bactériologique.....	34
4.9.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	34
4.9.2. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.9.3. Dénombrement des germes <i>Escherichia coli</i>	35
4.9.4. Calcul des charges bactériennes.....	36
4.9.5. Analyses statistiques.....	36

Chapitre V : Résultats et discussion

5.1. Le rendement en extrait éthanolique de <i>J. phoenicea</i>	37
5.2. Résultats du pH de fromage blanc réfrigérer traité par 0.5% d'extrait éthanolique de <i>J. phoenicea</i>	37
5.3. Résultats d'analyse bactériologiques.....	40
5.3.1. Dénombrement des <i>Escherichia coli</i>	40
5.3. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	41
5.4. Discussion.....	43
Conclusion et Perspectives	46
Références bibliographiques	47

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser se travail dans de meilleurs conditions.

Nos sincères remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre promoteur Monsieur Pr. Houicher Abderrahmane pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa patience, sa disponibilité, son aide et ses conseils.

J'adresse mes vifs remerciements au Dr. Djoukhdoum Laid, pour son aide et ses conseils.

Nous tenons à remercier les membres de jury :

Dr. Becheur Mourad pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Dr. Allali Khadidja pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont aussi à:

Pr. Yousfi M la directeur du laboratoire des Sciences Fondamentales, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Mes sincères remerciements vont également à Dr. Harathe M, pour le soutien et l'aide qu'ils ont su m'apporter dans laboratoire des Sciences Fondamentales.

Dr. Benramdhan T et tous nos enseignants, particulièrement les enseignants de la spécialité Sciences Alimentaires.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce

Merci à tous !

Dédicace

Je dédis ce travail :

A mes très chers parents qui m'ont encouragé et guidé

durant les moments les plus difficiles de ce long chemin, ma

mère Fatima Mokhtarie qui a été à mes côtés et m'a soutenu

durant toute ma vie ; et mon père Ahmed Belarbi qui a sacrifié

toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.

A mon chère : Abdelkader Belarbi

A mes chères sœurs : Karima , Masouda , Khadija, Fouzia , Asma , et à ma

petite sœur : Arbia .

A mes grands parents maternels.

A tout le reste de la famille : oncles, tantes, cousines et cousins.

A toutes familles : Koulal, Belarbi, Mokhtari, .Insolent

A toutes mes chères amies : Khadija, Karima.

mes amies et mes collègues d'étude de la spécialité agroalimentaire et contrôle de
qualité et

(Promotion 2020-2021)

Malika

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques des deux modes habituels de coagulation du lait	6
Tableau 02 : Résultats du pH de fromage blanc réfrigérer traité par 0.5% de l'extrait éthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i>	38
Tableau 03 : Résultats de la charge bactérienne de fromage blanc réfrigérer traité par 0.5% de l'extrait éthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i>	40

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : Schéma de la fabrication des produits laitiers traditionnels	8
Figure 2: <i>Juniperus phoenicea</i> , L.	23
Figure 3 : Localisation géographique de la zone d'Oued Morra, site de récolte de Genévrier de Phénicie	26
Figure 4 : La Genévrier de Phénicie (<i>Juniperus phoenicea</i>) séchée	27
Figure 5 : Macération de la poudre de <i>Juniperus phoenicea</i> dans l'éthanol absolu	28
Figure 6 : Filtration de l'extrait sur papier filtre Whatman N°1	28
Figure 7 : Evaporation de l'éthanol à 50°C dans un évaporateur rotatif de type Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000	29
Figure 8 : L'extrait brut de <i>Juniperus phoenicea</i> après évaporation	29
Figure 9 : Spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK)	30
Figure 10 : La présure de type CHY-MAX®	31
Figure 11 : Diagramme de fabrication du fromage blanc (J'ben)	32
Figure12 : Les étapes de l'incorporation de l'extrait et l'inoculum dans le fromage blanc	34
Figure 13 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales	35
Figure 14 : Extrait de la Genévrier de Phénicie	37
Figure 15 : La courbe de l'évolution du pH des différents groupes durant la période de stockage	39
Figure 16 : Aspect d' <i>Escherichia coli</i> sur milieu EMB	41
Figure 17 : Aspect de <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker	42

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
AA	Additif Alimentaire
AFNOR	Association Française de Normalisation
BHI BROTH	Brain Heart Infusion Broth
CA	Codex Alimentarius
DJA	Dose Journalière Admissible
EMB	Eosin Methylene Blue Agar
ET	Entérotoxine thermostables
FAO	Food and Agriculture Organization
IAC	Intoxications Alimentaires Collectives
UTSA	Utile en termes de sécurité alimentaire
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
TIC	Toxi-Infections Collectives

INTRODUCTION

Introduction

Le lait est un aliment de valeur nutritive très importante et cela par sa richesse en glucides, lipides, vitamines et sels minéraux. Il occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des Algériens et souvent consommé après transformation (Silait 2008). De ce fait, parmi les produits laitiers fermentés couramment consommés on trouve le fromage blanc ou Jben. Il est essentiellement fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre (Boujemaa et al., 2013). Sa fabrication est basée sur la fermentation spontanée (non contrôlée) du lait jusqu'à la coagulation suivie d'un barattage (Benkerroum et al., 2004). Le Jben est considéré comme l'un des dérivés laitiers les plus consommés en Algérie, et surtout dans les régions arides et semi-arides (Bencharif 2001). Néanmoins, ce produit agréable est un aliment qui constitue un milieu propice au développement de microorganismes dont certains peuvent être pathogènes. De plus, les conditions de production du Jben dont les règles d'hygiène ne sont pas respectées, peuvent engendrer la prolifération de microorganismes pathogènes, particulièrement, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*, qui peuvent entraîner des maladies infectieuses, des toxi-infections, des intoxications alimentaires et ou des troubles passagers chez les consommateurs (diarrhée, fièvre, gastro-entérites,...etc.) (Ahmed et al., 2010).

Staphylococcus aureus est l'une des bactéries pathogènes le plus courante liée aux produits fromagers, provoque généralement une intoxication humaine par l'ingestion d'une entérotoxine préformée dans les aliments. Elle n'est détruite ni par la pasteurisation du lait, ni au cours de l'affinage des fromages. Le nombre minimum de germes nécessaires à la production de suffisamment de toxines pour provoquer l'intoxication est évalué selon les auteurs à 5×10^5 ou 5×10^6 germes/g (de Souza et al, 2016). De plus, il est connu qu'*E. coli* survit dans le fromage conservé au réfrigérateur et se développe dans une large gamme de températures entre 10 et 45 °C, même en présence de bactéries lactiques comme levain. De plus, il a été rapporté que *Escherichia coli* O157:H7 passe d'un nombre primaire d'environ 10^5 CFU/g dans le fromage frais à un niveau final de 10^7 CFU/g, pendant la production de fromage blanc (Mehdizadeh et al, 2018 ; Diniz- Silva et al, 2019). En effet, l'importance et la nature des bactéries contaminant le Jben dépendent principalement de la matière première,

de l'état sanitaire de l'animal et de la nature des fourrages (Lebres et Hamza 2002), mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention, de la transformation et de la température de conservation (Robinson 2002).

En général, l'industrie alimentaire utilise les extraits de plantes comme les huiles essentielles pour rehausser le goût et colorer les aliments. Mais au cours des dernières années, l'intérêt pour le remplacement des additifs synthétiques par des substances naturelles comme bio-conservateurs, tels que les extraits bruts et les huiles essentielles efficaces et non toxiques, s'est développé (Amatiste et al, 2014). Diverses études se sont concentrées sur l'application d'extraits de plantes et d'huiles essentielles, y compris les composés phénoliques antimicrobiens dans les produits fromagers (Lin et al, 2019; Tayel et al, 2015, Kavas et al, 2015, Mojaddar Langroodi et al, 2020, Diniz-Silva et al. 2019 ; Maia et al, 2019). *Juniperus phoenicea* (Genévrier de Phénicie) ou «Arâar», est une plante médicinale et aromatique, appartenant à la famille des Cupressacées et poussant à l'état sauvage en Afrique du Nord (Ramdani et al., 2013). Leur emploi est souvent destiné à la médecine traditionnelle, à la parfumerie, à la droguerie et à l'industrie. Les effets inhibiteurs de ses extraits (huiles essentielles, extraits alcooliques et aqueux) contre un large éventail d'agents pathogènes d'origine alimentaire, en particulier *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, ont été rapportés dans des aliments, des milieux de culture et des bouillons à base d'aliments (Espina et al, 2013 ; Ait-Ouazzou et al, 2012 ; Angioni et al, 2003 ; Ozturk et al, 2010).

Dans ce contexte, L'objectif générale de ce thème de recherche concerne l'évaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la croissance de *S. aureus* et *E. coli* inoculées dans le fromage blanc durant son stockage réfrigère à 4°C. Ce travail comporte une étude bibliographique qui comprend trois chapitres :

- Des généralités sur les fromages, sur lesquelles s'est construit le travail,
- Une synthèse bibliographique sur les intoxications alimentaires collectives,
- Une description de la plante Genévrier de Phénicie.

Une partie expérimentale est consacrée au matériel et méthodes utilisés et au traitement des différents résultats obtenus ainsi que leur discussion. Enfin, ce travail est terminé par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I: Les Fromages

Chapitre I: Les Fromages

1.1. Historique

Le fromage de l'ancien français «fromage » du latin « formaticus» c'est à-dire fait dans une forme. La première occurrence de l'utilisation du fromage comme aliment est inconnue, les ethnologues tiennent preuve que l'homme connue depuis longtemps le phénomène de coagulation du lait depuis la découverte sur les rive de lac Neuchâtel (en suisse) (Gelais et al., 2002, Katz et Weaver, 2003). Certains facteurs ont été certainement nécessaires à la transformation du lait en fromage comme la chaleur, l'acidité et les sucs de l'estomac. Ainsi, des extraits d'estomac de plusieurs types d'animaux (moutons, chèvres, vaches), mais également des extraits de plantes (comme le chardon) ont été utilisés pour la préparation de fromages (Abi azar 2007).

1.2. Définition

Le fromage est défini par la FAO comme étant un produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir d'une matière d'origine exclusivement laitière : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse et babeurre ; utilisée seul ou en mélange et coagulée en tous ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23g/100g du fromage (Boughellout, 2007).

Selon le codex alimentarius : "Le fromage est le produit frais ou affiné, solide ou semi solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu par coagulation du lait grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés, et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation (Rouabhia et Messaoudi, 2017).

Le fromage peut être assimilé à une concentration des éléments majeurs du lait (protéines, matières grasses), réalisée par égouttage d'un coagulum obtenu par acidification et ou action d'une enzyme (le plus souvent la présure extraite de la caillette des jeunes bovins avant sevrage). La fabrication proprement dite comporte quatre phases : standardisation du lait, coagulation, égouttage et affinage (Romain et al., 2007 , Godfrey et West ,1996)

1.3. Principaux composants du fromage

Les matières premières sont du lait ou des produits obtenus à partir du lait et les ingrédients sont des cultures de bactéries lactiques inoffensives ou des bactéries productrices d'arômes et des cultures d'autres micro-organismes sans danger, des enzymes appropriés et inoffensifs, du chlorure de sodium (Saint et al., 2002).

1.4. Différents types de fromage

Les fromages sont classés en grandes catégories selon différents critères tels que l'espèce animale, la teneur en eau et la technologie de fabrication. Selon ce dernier critère, les fromages sont classés en sept grandes catégories (Hamada et Debbakh, 2014, Djafri et Djaout, 2015):

- Fromage frais ou pâte fraîche;
- Les pâtes molles à croûte lavée ou à croûte fleurie;
- Les pâtes persillées;
- Les pâtes pressées cuites ou non cuites;
- Les pâtes dures;
- Les pâtes filées;
- Le fromage fondu.

1.5. Principe de la fabrication des fromages

La transformation de la caséine joue un rôle dans l'élaboration de ces produits. Dans tous les cas, il y a coagulation de la caséine "caillage". Cette coagulation est suivie d'une dégradation, plus ou moins poussés (Tableau 01). Elle peut être obtenue de plusieurs façons (Guiraud, 1998).

Tableau 01 : Caractéristiques des deux modes habituels de coagulation du lait
(Desmazeaud, 1992)

	Coagulation par	
	Action des enzymes	Acidification
Processus biochimique	Action enzymatique (lactose non dégradé)	Fermentation lactique
Fermentation de la caséine	Transformation en para-caséine, séparation d'une partie non protéique	Pas de modification chimique de la protéine elle-même
pH	6,8	4,6
Composition du coagulum	Phospho-paracaséine de Caséine (déminéralisée) Calcium	Caséine (déminéralisée)
Nature de coagulum	Gel élastique imperméable	Gel friable sans cohésion
Coagulation	Rapide	Lente

1.6. Jben

1.6.1. Définition

Le « Jben » est le fromage frais le plus connu et consommé depuis fort longtemps aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain. Dernièrement, la consommation de ce produit s'est accrue suite à l'installation dans les villes d'un grand nombre de laiteries traditionnelles qui préparent le «Jben» à partir du lait cru selon des procédures souvent artisanales. A côté de ce secteur traditionnel, certaines unités laitières semi industrielles se sont aussi intéressées à la fabrication du «Jben», utilisant du lait soit cru, soit pasteurisé, et des procédures de préparation plus ou moins améliorées. De ce fait, il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes de préparation du «Jben», et par conséquent, plusieurs variétés de fromage frais sont commercialisées sous la dénomination populaire commune de "Jben" (Benkerroum et Tamime, 2004).

1.6.2. Préparation de fromage frais

A propos, le fromage Jben variété molle est produit selon un protocole traditionnel qui comprend la coagulation présure de lait cru entier de chèvre (Mennane et al., 2007). D'une manière générale, le fromage frais est fabriqué soit à partir du lait de vache ou du lait de chèvre. Le processus de fabrication nécessite trois grandes étapes essentielles : la maturation, la coagulation et l'égouttage (Randazo et al, 2009).

A. La maturation : c'est l'incubation du lait cru à température ambiante pendant Un temps variable de façon à favoriser la multiplication d'une flore lactique qui va jouer un rôle important dans l'acidification du lait. Cette maturation peut être spontanée ou provoquée par adjonction de levains. Le recours à des levains artificiels du commerce n'est cependant pas toujours une nécessité absolue, car le fermier producteur de lait à lui-même la possibilité de cultiver un levain naturel à partir de la flore contenue dans son propre lait (Randazo et al, 2009).

B. La coagulation : c'est une opération qui vise à coaguler le lait au moyen de la Présure (emprésurage) ou de toute autre enzyme coagulante. L'activité coagulante est déterminée par la force de présure, la température du lait et son acidité. Après l'emprésurage, le lait est abandonné au repos à température ambiante pendant 6 à 10 heures. Il va prendre en masse (caillage) avec une consistance plus ou moins ferme selon le degré d'acidité développé. En réalité, le coagulum est obtenu par deux modes de coagulation : la coagulation dite lactique et celle engendrée par l'action de la présure. Ces deux modes ont une action simultanée sur le lait avec cependant une prédominance plus ou moins marquée de l'un ou l'autre selon que le fromager souhaite obtenir une pâte à caractère plus présure ou à caractère plus lactique (Randazo et al, 2009).

C. L'égouttage : un des buts essentiels de cette opération est de régler la teneur en eau du fromage. Il permet l'élimination de la plus grande partie du sérum qui imprègne le coagulum. L'égouttage est amorcé dans des moules qui confèrent au fromage sa forme. La nature du gel influe sur la conduite de l'égouttage. Un gel lactique subit un égouttage spontané et le caillé a par conséquent une forte humidité. Cependant, un gel présure est un gel compact, solide ou l'égouttage ne peut avoir lieu qu'après certaines interventions telles des actions mécaniques de pression (Randazo et al, 2009)

Suivant le goût du fromager, le salage peut être fait. C'est une opération importante dans la fabrication des fromages. Elle a des effets multiples : elle améliore l'égouttage en le complétant, elle oriente et sélectionne le développement microbien et relève la saveur de la pâte (Benkerroum et Tamime, 2004).

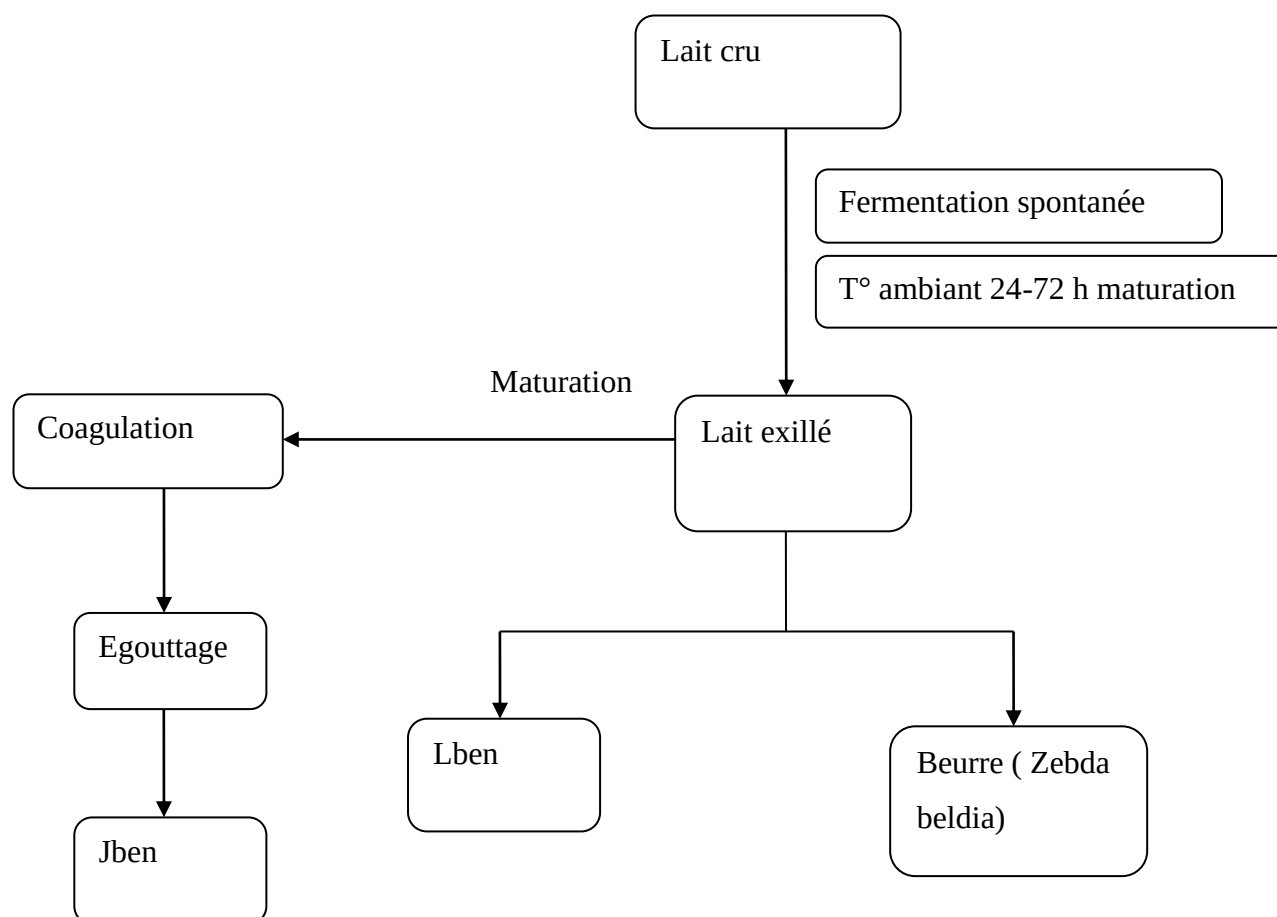


Figure 1 : Schéma de la fabrication des produits laitiers traditionnels (Benkerroum et Tamime, 2004).

1.6.3. Microflore du J'ben

A. Les microorganismes responsables d'altération

Ce sont des bactéries et des moisissures indésirables apportées par la contamination. Cette flore regroupe les bactéries thermorésistantes, les coliformes, les psychrotrophes, les levures et moisissures (Zergoune, 2015).

La flore d'altération causera des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture et réduira la vie de tablette du produit laitier. Parfois, certains microorganismes nuisibles peuvent aussi être pathogènes. L'un n'exclut pas l'autre (Kabir, 2015).

Les principaux genres identifiés comme flore d'altération sont *Pseudomonas* sp, *Proteus* sp, les coliformes soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les sporulées telle que *Bacillus* sp, et *Clostridium* sp, des bactéries psychrotrophes et Certaines levures et moisissures (Vignolo, 2002).

❖ Les bactéries thermorésistantes

Les composantes de cette flore sont: *Micrococcus*, *Microbactérium* et *Bacillus* dont l'espèce *cereus* produit une entéro toxine c'est la flore de contamination provenant le plus souvent de la machine à traire ou du tank et non détruite par la chaleur (Djoughri et Madani, 2015).

❖ Coliformes

Les coliformes sont les microorganismes servant d'indicateurs à la présence possible de contamination fécale (Becila, 2009). D'un point de vue technologique, certains coliformes sont lactiques et fermentent le lactose sur un mode hétéro fermentaire. De plus, ces bactéries élaborent diverses substances qui provoquent le gonflement précoce des produits laitiers dont le fromage. Un grand nombre d'entre elles étant les hôtes habituels de l'intestin des mammifères, leur présence dans le lait tout comme dans l'eau, est l'indice d'une contamination fécale. Cet indice est mis à profit dans l'examen de la qualité des produits (Djoughri et Madani, 2015).

❖ Bactéries psychrotrophes

Lors de leur développement dans le lait et les produits laitiers, les bactéries psychrotrophes (genre *Pseudomonas* principalement, mais également *Bacillus*) peuvent produire des lipases et protéases extracellulaires, généralement thermostables. Ces enzymes peuvent provoquer des défauts de goût dans les fromages (goût de rance, amertume) (Bouchakoure et Djaghlali , 2015).

❖ Bactéries butyriques

Les bactéries butyriques (*Clostridium tyrobutyricum*) peuvent se développer dans les fromages et donner des défauts de goût et d'ouverture « gonflement tardif » par fermentation butyrique (production d'acide butyrique et d'hydrogène) (Beuvier et Feutry, 2005).

❖ Levures et moisissures

-**Les levures** : bien que présentes dans le lait, leur action est minime. Certaines d'entre elles sont capables de fermenter le lactose en alcool (production de l'éthanol). On n'a pas identifié pour l'instant de levures pathogènes associées au domaine laitier. Il y a des levures qui participent à l'affinage de certains fromages et d'autres entrent dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés. On retrouve aussi dans le domaine laitier des levures nuisibles responsables de certaines dégradations détectées par des odeurs d'alcool, par un gonflement des emballages et du fromage dû à la production de gaz (Zergoune, 2015). Les levures associées au lait sont les espèces suivantes : *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* (Bourgeois et al, 1996).

Les moisissures : sans importance dans le lait liquide, elles intéressent un grand nombre d'autres produits laitiers. Elles se développent en surface, ou dans les parties internes aérées. Elles sont productrices de lipases et de protéases, dont on rencontre le *Penicillium* et le *Geotrichum* (Zergoune, 2015). Les moisissures liées aux produits laitiers sont les suivantes : *Geotrichum candidum*, *Sporendonema sebi*. Les mycotoxines sont des molécules produites dans les aliments par des moisissures et capables de provoquer de multiples effets toxiques (Bourgeois et al, 1996).

B. Les micro-organismes potentiellement pathogènes

Les bactéries pathogènes pour l'homme peuvent être présentes dans le lait cru, ou dans les produits laitiers qui en dérivent. Elles sont capables de provoquer des maladies chez les personnes qui consomment ces produits (Bouraoui, 2014).

La présence des micro-organismes pathogènes dans le lait peut avoir trois sources : l'animal, l'homme, et l'environnement (Senoussi, 2013).

Les bactéries les plus importantes de cette flore pathogène sont Souvent mésophiles et les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, et certaines moisissures (Tchamba, 2007). Leur origine est variée ; infection mammaire, matériel de traite, et ensilage. Elles présentent un danger pour le consommateur (Beldjilali, 2015).

Chapitre II Intoxications alimentaires collectives

Chapitre II Intoxications alimentaires collectives

2.1. Généralités sur les intoxications alimentaires collectives

La qualité microbiologique d'un aliment est un critère définissant l'acceptabilité d'un produit, d'un lot d'aliments ou d'un procédé sur la base de l'absence, de la présence ou du nombre de microorganismes et/ou de la quantité de leur toxine/métabolites, par unité(s) de masse, volume, surface ou lot (Afssa, 2008). Il existe plusieurs voies de contamination des aliments par les micro-organismes : les personnes, leurs vêtements, l'air, l'eau et les animaux. Ainsi deux types de contaminations importantes sont à distinguer : la contamination endogène et exogène.

La contamination endogène des denrées alimentaires d'origine animale est causée par les germes commensaux du tube digestif des animaux. Quant à la contamination exogène, les agents microbiens sont apportés dans les denrées initialement saines, au cours des diverses manipulations (préparation, transport, et stockage). Les accidents alimentaires peuvent ainsi être regroupés en infections, toxi-infections, intoxications et intoxications.

En cas d'infection, les micro-organismes vivants présents dans l'aliment provoquent des effets pathologiques variés par leur multiplication dans les entérocytes de l'intestin grêle et du colon. On parle de toxi-infection lorsque l'infection est suivie de la production des toxines protéiques ou glucido-lipido-protéiques. Les germes responsables des toxi-infections sont : *Salmonella sp*, *Clostridium perfringens*, *Shigella sp*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolytica*, *Campylobacter sp*, et *Listeria monocytogenes*.

Les intoxications alimentaires se produisent à la suite de l'ingestion des toxines préformées dans l'aliment. Les signes cliniques sont très variés : vomissements, diarrhées et douleurs abdominales. D'autres syndromes d'ordre neurologique, vasculaire et hématologique sont aussi observés. Les principaux agents en cause sont : *Staphylococcus aureus* et *Clostridium botulinum* (Tayou, 2007).

Les intoxications alimentaires interviennent à la suite de la consommation d'aliments contenant des substances toxiques. Les principaux agents sont l'histamine, le mercure, les mycotoxines (aflatoxines), les produits chimiques (additifs, pesticides,

antibiotiques, détergents et désinfectants), les sels métalliques tels que le cuivre, le zinc, le plomb (Diallo, 2010).

Dans les collectivités, on parle de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) qui est l'apparition au même moment d'au moins deux cas de symptômes similaires le plus souvent digestifs chez des individus ayant consommé le même repas (Diallo, 2010).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Les Staphylocoques sont de cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas irrégulier à la façon d'une grappe de raisin. *S aureus* un germe qui tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue des autres espèces de Staphylocoques. Chez l'homme environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Cette bactérie développe rapidement de résistance aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides (Avril et al., 2000 ; Nauciel et Vildé, 2005). Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des Staphylococaccae. On distingue ainsi des espèces à coagulase positive et des espèces à coagulase négative. (Fatet, 2004).

2.2.1. Taxonomie

Les staphylocoques ont été découverts par Pasteur et Koch en 1877 à partir du pus de furoncle et d'ostéomyélite. En 1881, Ogston faisait la première étude détaillée des staphylocoques et regroupait ces bactéries dans le genre *Staphylococcus*. En 1884, Rosenbach était capable d'isoler ces bactéries et de produire une culture pure. Il décrivait *Staphylococcus aureus* à cause de l'apparence jaune-orangée des colonies et montrait que *S. aureus* était responsable de furoncles et d'infections des plaies. La même année, Gram mettait au point une méthode de coloration des bactéries à partir du violet de gentiane : les staphylocoques étaient classés parmi les cocci à Gram positif (Corne, 2004).

Sur la base d'analyses des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la Classe des *Bacilli*, à l'ordre des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae* (Garrity et al., 2005). Le genre *Staphylococcus* dispose de plus d'une trentaine d'espèces divisées en deux groupes

selon leur aptitude à produire une coagulase. Actuellement six espèces de ce genre sont à coagulase positive *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi coagulans*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. aureus aureus* et *S. aureus aneroobius* (Lamprell, 2003 ; Al alam, 2008).

2.2.2. Habitat

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont ubiquitaires, peu exigeantes et capables de vivre dans de nombreux sites, essentiellement en saprophyte de l'environnement extérieur, mais aussi en commensal des épithéliums cutanés et muqueux des hommes et des animaux, L'homme constitue un réservoir de plusieurs espèces de staphylocoques, dont *Staphylococcus aureus*. La bactérie colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés (Wertheim, 2005).

2.2.3. Caractères bactériologiques

2.2.3.1 Caractères morphologiques et biochimiques :

Les staphylocoques apparaissent à l'examen microscopique comme des cocci à Gram positif, bactéries sphériques de 0,8 à 1 µm de diamètre, regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ils sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. Ces bactéries sont aéro-anaérobies, à métabolisme respiratoire et fermentaire, cultivant facilement en 24 heures sur milieux ordinaires. *Staphylococcus aureus* peut être aussi isolé sur milieu sélectif (milieu hypersalé de Chapman), utilisé pour les prélèvements plurimicrobiens. Les colonies sont convexes, lisses (smooth) de 1 à 4 mm de diamètre. De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré ou citrin, non diffusible (caroténoïde), et sont hémolytiques sur gélose au sang. Toutes les espèces du genre *Staphylococcus* sont catalase positive. L'espèce *S. aureus* est capable de fermenter le mannitol et de produire des enzymes extracellulaires (staphylocoagulase, ADNase) (Berche, 1989).

2.2.3.2. Caractères culturels

Staphylococcus aureus est un organisme anaérobie à catalase positive et facultative, qui se développe abondamment dans des conditions aérobies, à l'exception de *S. saccharolyticus*, qui est un véritable anaérobie (Bhuni, 2007), mais se développent rapidement dans des conditions aérobies. Ils peuvent fermenter les glucides et également provoquer une protéolyse par les enzymes protéolytiques extracellulaires. Ils sont des mésophiles avec une gamme de température de croissance de 7-48°C,

avec une croissance assez rapide entre 20 et 37°C. D'autres caractéristiques importantes de croissance sont leur capacité à se développer à une A_w relativement faible (0,86), un faible PH (4,8), et des concentrations élevées en sel et de sucre de 15% et en présence de NO_2 (Ray et al., 2013).

2.2.4. Intoxication alimentaire Staphylococcique

Elle est provoquée par *Staphylococcus aureus* qui est une bactérie sphérique, aéro anaérobie facultative à Gram positif. Elle sécrète des enterotoxines thermostables. Les troubles apparaissent brutalement, 2 à 3 heures après l'ingestion et ne sont pas accompagnés de fièvre. Les signes digestifs et généraux sont très marqués, parfois impressionnants (pouls rapide, chute de tension, hypothermie, vomissements incoercibles, diarrhée importante, etc.) rappelant un empoisonnement. Ils ne durent que quelques heures.

Les aliments responsables sont rarement contaminés à l'origine. Cependant le lait de chèvre ou de vache peut être contaminé dans le cas de mammites staphylococciques de l'animal. Dans la majorité des cas, la contamination des aliments est due à des manipulateurs présentant des lésions cutanéo-muqueuses ou porteurs de germes (Balma, 1989). L'intoxication alimentaire Staphylococcique (intoxication) est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes dans le monde. L'ingestion d'une dose inférieure à 1 g peut provoquer des symptômes d'intoxication et cette quantité est atteinte lorsque la population de staphylocoques atteint des valeurs supérieures à $>10^5$ UFC/g d'aliments (Silva et al., 2012).

Les toxines agissent rapidement et la maladie peut se déclarer dans les 30 minutes suivant la consommation d'aliments contaminés, bien que l'apparition typique se produise généralement dans les 1 à 6 heures après avoir mangé. Une fois les toxines éliminées de l'organisme, les symptômes s'atténuent (Batt et al., 2014).

De nombreux aliments riches en protéines, les aliments intensivement transformés, les aliments avec une faible croissance des bactéries apparentées et les aliments avec un abus de température sont tous liés à la gastro-entérite staphylococcique (Ray et al., 2013).

Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les maladies alimentaires staphylococciques sont la viande, le poisson, les produits laitiers non pasteurisés (fromages) et les charcuteries (sandwiches, canapés).

2.3. *Escherichia coli*

C'est en 1885 que le pédiatre allemand Théodore *Escherich* isole et décrit pour la première fois le bacille *Bacterium coli*, fréquemment présent dans les selles des nourrissons. En 1919, en hommage aux travaux d'*Escherich*, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli*. Elle appartient à la famille des entérobactéries, c'est un bacille Gram-négatif, oxydase- négative, anaérobie facultatif, possédant des flagelles péritriches (Jean et al., 1992).

Escherichia coli est considéré comme un indicateur d'une contamination fécale, sa présence fournit une indication sur l'éventuelle contamination de l'aliment par des bactéries pathogènes d'origine digestive (ex. *E. coli* O157: H7) (Federighi, 2005).

Les souches d'*Escherichia coli* sont rarement pathogènes, à l'exception de certaines souches qui causent des diarrhées dans les pays en voie de développement, ou elles touchent surtout les enfants, ces bactéries infectent également les voyageurs venant de pays industrialisés (Naucliel et Vildé, 2005). *Escherichia coli* est un commensal normal de l'intestin de l'homme et de l'animal (Goubau et Pellegrims, 2000).

2.3.1. Classification et taxonomie

Le genre *Escherichia* est un membre typique de la famille Enterobacteriaceae, ordre Enterobacteria, classe Gammaproteobacteria, phylum Proteobacteria (Tang et al., 2014). La détermination des sérotypes est le premier système qui a permis, dans une certaine mesure, de différencier les souches pathogènes des souches commensales. Par la suite des propriétés de virulence, directement ou indirectement reliées au pouvoir pathogène des *E. coli* ont été reconnues.

La classification la plus utilisée par les microbiologistes est fondée en grande partie sur les travaux de Kauffman (1947) et se base sur la détermination du :

- Séro groupe : identifié par rapport aux antigènes somatiques O. Plus de 180 sérogroupes O d'*E. Coli* sont actuellement connus.

- Sérotype : identifié au sein du séro groupe par rapport aux antigènes d'autres structures présentes à la surface des bactéries (Vimont, 2007).

2.3.2. Habitat d'*Escherichia coli*

Comme l'ensemble des espèces des entérobactéries, *Escherichia coli* est une bactérie ubiquiste, mais elle est isolée généralement de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud (Greatest et Thorre., 1994). En microbiologie alimentaire, elle est classiquement utilisée comme indicateur de la contamination fécale de l'eau potable, l'eau de baignade et des produits alimentaires. Dans les laboratoires d'analyses médicales cette espèce reste la plus isolée des matériaux pathologiques (Frithz et al., 2015).

2.3.3. Description bactériologique

2.3.3.1. Caractères cultureux

Sur le milieu gélosé, l'*E. coli* donne généralement des colonies lisses, brillantes, régulières, atteignent 2 mm de large et le bouillon devient trouble de façon homogène; c'est la forme S (smooth). En principe, les souches ayant subi plusieurs repiquage donnent des colonies rugueuses, sèches, irrégulières, de teinte mate et donnent en bouillon l'aspect grumeleux, c'est la forme R (rough). Les colonies s'observent avec des souches déficientes dans certain de leurs chaîne métabolique (Belamri, 2010).

L'*E. coli* produit des colonies similaires à celles de Salmonelles et de Shigelles, mais ces derniers ne fermentent pas le lactose. Sur gélose au sang, certaines espèces d' *E. coli* peuvent être hémolytiques (Avril et al., 1992; Geo et al., 2004).

2.3.3.2. Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques de l'espèce d '*E.coli* sont:

- positifs pour : indole, ONPG et manitol
- positifs de façon moins constante: LDC, ODC, sorbitol (les souches 0157 :H7, EHEC sont le plus souvent sorbitol (-) et décarboxylases (+), production de gaz lors de l'attaque du glucose.

- négatifs : inositol, urée, TDA, VP, gélatinase citrate de simmons. Les souches d '*E.coli* Enteroinvasives ont souvent une faible activité métabolique (Avril et al., 1992).

2.3.4. Intoxication alimentaire *Escherichia coli*

Escherichia coli appartient au groupe des coliformes, d'origine fécale et peut être responsable d'intoxications à cause d'un développement abondant. Elle possède les propriétés classiques des entérobactéries: Gram négatif, catalase positive, oxydase négative, anaérobie facultative et bâtonnet court (Guiraud, 1998)

Ce sont des gastro-entérites dues à des souches entéropathogènes d'*Escherichia coli* (*E. coli*) qui est un hôte normal du tube digestif, mais qui devient pathogène dans certaines conditions. Ces germes provoquent des troubles graves (diarrhée violente, nausées, vomissements), 12 heures après l'ingestion du repas chez le jeune qui peut en succomber. Chez l'adulte, des céphalées sont en plus observées. Les aliments dangereux sont les produits laitiers manipulés ainsi que les viandes (Abdoulaye, 1988). Les colibacillooses proviennent principalement de la mauvaise hygiène des mains (Abdoulaye, 1988).

La dose infectieuse pour les *E. coli* appartenant aux sérogroupe O157 est très minime, estimée moins de 100 organisme, contrairement aux infections aux *E. coli* entéropathogènes qui elles ont le soin d'un inoculum de $>10^8$ organismes pour produire une infection expérimentale chez des adultes (Law, 2000)

Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les maladies alimentaires *Escherichia coli* sont produits laitiers non pasteurisés (fromages), eaux de boisson non traitées, viandes, légumes mal lavés.

Chapitre III :

Extraits de plantes

Chapitre III : Extraits de plantes

3.1. Généralités sur les extraits de plantes

Les extraits naturels issus des plantes médicinales et aromatiques possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir médecine, pharmacie et cosmétologie. L'extraction des principes actifs à partir de la matière végétale, notamment le cas des polyphénols est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques (Mahmoudi et al., 2013), elle dépend de leur structure chimique, de la méthode d'extraction, de la granulométrie et du temps de macération (Levizou et al., 2004).

La plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau (80/20, v/v) (Macheix et al., 2005). La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins (Garcia-Salas et al., 2010). Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols (Koffi et al., 2010).

3.1.1. Les principaux composés actifs des plantes médicinales

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires, classés selon leurs voies biosynthétiques et leurs caractéristiques structurales (Daayf et Vincenzo, 2008). Le profil chimique des composés secondaires varie énormément et est considéré comme résultat des pressions évolutives auxquelles sont soumises les différentes espèces de plantes. On classe généralement ces différents composés en deux groupes selon la voie de biosynthèse, les composés phénoliques d'un côté et les composés azotés comme les alcaloïdes, les glycosides et les terpénoïdes de l'autre (Sauvion et al., 2013). Cependant, on peut aussi les diviser en quatre groupes :

- ✓ Les terpénoïdes et stéroïdes : Comme les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les saponines, les limonoïdes, les cucurbitacines, les cardénolides, les caroténoïdes, les phytoecdystéroïdes ;

- ✓ Les alcaloïdes ;
- ✓ Les composés phénoliques : Comme les acides phénoliques, les flavonoïdes (Incluant les tanins), les quinones) ;
- ✓ Les glycosides : Incluant les glucosinolates et les glycosides cyanogéniques (Sauvion et al, 2013).

3.1.2. Les terpénoïdes et stéroïdes

Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes de carbone. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne ainsi que dans les divers modes d'assemblages (Hopkins, 2003).

Les terpénoïdes se classent en fonction du nombre d'unités d'isoprène qui les constituent. (Sauvion et al, 2013).

3.1.3. Les alcaloïdes

Ce sont des bases organiques possèdent souvent deux ou plusieurs atomes d'azote dans la molécule. La majorité des alcaloïdes dériveraient des acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, la lysine et l'ornithine. D'autres éléments peuvent introduire également dans la structure moléculaire des alcaloïdes et en particulier des groupes méthyle et acétyle, des unités en C5 et C10 (isoprène, monoterpène), des dérivés de l'acide cinnamique et des composés phénoliques. Parmi ces composés la nicotine et la colchicine (Richter, 1993).

3.1.4. Les polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par les plantes et constituent un groupe important de substances naturelles présentes dans le règne végétal (Massaux, 2012).

Les termes «phénol» et «polyphénol» peuvent être définis chimiquement comme les substances qui possèdent un cycle aromatique portant un (phénol) ou plus (polyphénol) a un substituant hydroxyle (Daayf et Vincenzo, 2008).

3.1.4.1. Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont

omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata et al., 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao et al., 2004)

3.1.4.2. Tannins

Le terme tannin utilisé depuis l'Antiquité par l'Homme, pour designer les composés d'origine végétale responsables de la transformation des peaux animales fraîches en cuir imputrescible et peu perméable, cela en formant des complexes stables avec le collagène (Bennick, 2002; Ribéreau-Gayon, 1968). Ainsi, les tannins sont considérés comme étant des composés phénoliques ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton et qui ont la propriété de précipiter les alcaloïdes et les protéines (Ribéreau-Gayon, 1968).

3.1.5. Techniques d'extractions :

a. Extraction par macération : C'est une méthode traditionnelle, couramment employée et qui consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant, avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteur incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction...etc (Spigno et Defaveri, 2007 ; Budic-letoc et al., 2005).

b. Extraction au soxhlet : L'extracteur de Soxhlet permet le traitement des solides (matière végétale) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps en verre de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose (matière pénétrable pour le solvant) remplie de matière végétale. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant (Herzi, 2013).

c. Hydrodistillation : Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait, la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (Lucchesi, 2005).

d. Hydrodistillation assistée par ultrason : Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les micro-cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines cellulodiques. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation des constituants des huiles essentielles. Dans certains cas, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées. L'utilisation des ultrasons pendant l'hydrodistillation est vaine. Une unité d'hydrodistillation équipée d'une fontaine d'ultrasons peut produire plus vite des points d'ébullition, mais ne dégonflent pas les bulles. Par conséquent, les ultrasons ne sont pas une bonne option pour les procédés par ébullition.

3.2. Genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea*)

La signification exacte du mot latin *phoenicea* est pourpre, l'espèce *Juniperus phoenicea* doit son nom à la couleur rouge de ses baies et pas à son province d'origine; donc l'espèce aurait dû s'appeler genévrier rouge. *Juniperus phoenicea* (genévrier de Phénicie, "Araar") est une plante appartenant à la famille des cupressacées. C'est un arbre branchu pouvant atteindre 8 mètres de hauteur, possédant un tronc court qui peut atteindre 2 mètres de circonférence (Menaceur, 2015).

Cette espèce est monoïque, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante. A maturité, les fruits sont bruns-rouges et luisants. Elle devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive (son bois est très recherché comme combustible et fournit un charbon très apprécié) (Le Floc'k, 1983).

3.2.1. Noms vernaculaires et classification:

Selon Quezel et Santa (1962) et Quezel et Gast (1998), les noms vernaculaires de Genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea*) sont les suivants :

En Arabe : Ar'ar'.

En Français : Genévrier rouge, Genévrier de Phénicie.

En Anglais: Phoenician Cedar,Berry Bearing Cedar .

En Kabyle: taqa (tawrirt plus rarement)

D'après Quezel et Santa (1962), la classification botanique de la plante *Juniperus phoenicea*, L, est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Gymnospermes

Ordre : Pinales

Famille : Cupressacées

Genre : *Juniperus*

Espèce : *Juniperus phoenicea*

3.2.2. Description botanique

Généralement, les peuplements de genévriers de Phénicie sont constitués par des arbustes de 1 à 3 m de hauteur mais pouvant atteindre cependant jusqu'à 8 à 10 mètres, notamment sur les Hauts Plateaux (Quezel et Gast ,1998). Les feuilles sont presque toutes squamiformes, en écailles très petites et courtes, à bords cartilagineux finement denticulés, serrées contre les rameaux. Les ramilles sont lisses au toucher (Cassan et al ,2009). Les cônes ayant l'apparence de baies, par soudure des écailles entre elles, ils sont brun rouge brillant à maturité (au bout de 2 ans), d'environ 6-10mm de diamètre.les graines sont 6 à 9 par cônes (figure 02). Le genévrier de phénicie n'est pas dioïque mais généralement monoïque (Botineau, 2015). La

floraison a lieu en hiver-printemps. Les parties utilisées sont les feuilles et les fruits de baies (Molino, 2005).



Figure 2: *Juniperus phoenicea*, L. (Quezel et Gast, 1998)

3.2.3. Aire botanique :

C'est une espèce méditerranéenne que l'on trouve en France (littoral méditerranéen et Alpes), dans les trois pays de l'Afrique du Nord, en Cyrénaïque. En Afrique du Nord il couvre 450.000 hectares dont 290.000 en Algérie. Le genévrier de Phénicie recule de plus en plus dans l'Atlas Saharien et sur le versant du sud du Grand-Atlas sous l'action du climat désertique ; mais surtout sous celle de l'homme et des troupeaux (Boudy, 1952).

3.2.4. Répartition en Algérie :

On le rencontre sur le versant saharien du Haut-Atlas et sur le Jbel Sarhro où il recule sous l'action conjuguée de l'homme et du climat. En dépit de sa taille réduite (il dépasse rarement huit mètres), le genévrier de Phénicie joue un rôle important quoique méconnu dans l'économie montagnarde: grand pourvoyeur de bois de feu, de perches de construction, de bois de service; parfois même de fourrage foliaire... Les perchettes de genévrier assemblées en couches tressées forment l'armature des terrasses de terre dans bien des maisons berbères (Boudy, 1952).

3.2.5. Ecologie :

Le genévrier de Phénicie est essentiellement xérophile, mais non thermophile comme *Thuya*. De toutes les essences forestières c'est elle qui résiste le mieux à l'aridité (dunes, montagnes du sud). Il est d'une rusticité et d'une vigueur physiologique remarquables. En altitude sa limite inférieure est le littoral, et sa limite supérieure est de 2.400 m. Sa distribution est sous la domination du facteur climatique. Il se contente en montagne sèche de 250 mm d'eau. Il est indifférent à la nature du sol et pousse aussi bien sur les sables des dunes que sur les terrains calcaires les plus secs. Sa régénération s'effectue partiellement par rejet mais surtout par semis naturels. Les graines germent difficilement et restent longtemps dans le sol ; pour assurer la régénération par semis, il faudra donc une longue période, 20 à 25 ans au moins (Boudy, 1952).

3.2.6. Composition chimique et activités biologiques de *Juniperus phoenicea* :

3.2.6.1. Composition chimique

Les investigations chimiques réalisées sur *J. phoenicea* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen, telles que l'Espagne, le Portugal et la Grèce (Adams et al., 1996 ; Cavaleiro et al., 2000), La Corse (Rezzi et al., 2001), La Tunisie (Bouzouita et al., 2008 ; Nasri et al., 2001 ; Medini et al., 2006), l'Egypte (Afifi et al., 1992 ; El-sawi et al., 2007) et l'Arabie saoudite (Dawidar et al., 1991) La Libye (Hamad MAH & Aisha MRA, 2017) l'Algérie (Menaceur et al., 2013 ; Dane et al., 2015) ont indiqué que le constituant majeur dans ses huiles est le : α -pinène, qui présente plusieurs activités biologiques : il est antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédatif, herbicide, insectifuge, et aromatisant (Duke, 1998). Suivi des monoterpènes oxygénés tels que, α -terpinyl acétate, δ -3-carène, myrcène, α -phellandrène et β -phellandrène

Des études phytochimiques ont montré que l'espèce contient également, des acides gras, et des minéraux (Nasri et al., 2010), de la résine, des tanins, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des stérols et triterpènes (Medini et al., 2013 ; Alzand et al., 2014 ; El-Sawi et al., 2014) et des glucides, notamment, trois phenylpropanes glycosides (juniperosides, rosarin et skimmin) et deux dérivés furanones glucoside (psydrin et phoenicéine) (Aboul-El et al., 2005).

3.2.6.2. Activités biologiques

Les résultats d'Aboul-Ela et al. (2005) ont montré un effet anti hépatotoxique des extraits aqueux des baies de *Juniperus phoenicea* testés sur des rats. De plus, les effets inhibiteurs de ses extraits (huiles essentielles, extraits alcooliques et aqueux) contre un large éventail d'agents pathogènes d'origine alimentaire ont été signalés dans les aliments, les milieux de croissance et les bouillons à base d'aliments (Espina et al, 2013 ; Ait-Ouazzou et al, 2012 ; Angioni et al, 2003 ; Ozturk et al, 2010). L'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* a montré aussi un effet anti appétant intéressant contre un insecte des denrées stockées *Tribolium confusum* (Bouzouita et al., 2008)

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Partie II : Etude expérimental

Chapitre IV : Matériel et méthodes

4.1 . Objectif

L'objectif de la présente étude était d'évaluer l'effet de l'extrait éthanolique de la Genévrier de phénicie (*Juniperus phoenicea*) à une concentration de 0.5% sur la charge des germes pathogènes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) inoculés dans le fromage blanc durant son stockage à 4°C.

4.2. Matériel végétal

Les parties aériennes (feuilles, rameaux et baies) de la plante *Juniperus phoenicea* ont été récoltées durant le mois de Février 2021 dans la région Oued Morra entourant la ville d'Aflou, wilaya de Laghouat (Figure 3). Le matériel végétal est séché à la température ambiante (<30°C) et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré pendant un mois (Figure 4). Après le séchage, le matériel végétal a été broyé jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, puis la poudre a été récupérée dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction éthanolique.



Figure 3 : Localisation géographique de la zone d'Oued Morra, site de récolte de Genévrier de Phénicie (Google Map, 2021)



Figure 4 : La Genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea*) séchée (**Photo originale, 2021**)

4.3. Extraction éthanolique

Un kilogramme d'échantillon sec de *Juniperus phoenicea* a été macéré dans 5 L de l'éthanol absolu (99.94%, 1:5, m/v) pendant 24 h (Figure 5) à la température ambiante. L'extrait a été filtré sur papier filtre Whatman No.1. Après filtration, du charbon actif a été ajouté au filtrat (10 g de charbon actif/50 g de matériel végétal) pour absorber la chlorophylle et diminuer la coloration verte de l'extrait, puis, le charbon actif a été immédiatement retiré de l'extrait avec du papier filtre Whatman n°1 (Figure 6). Ensuite, l'éthanol a été évaporé dans un évaporateur rotatif (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000) à 50°C (Figure 7), et le résidu a été pesé et traité avec les radiations UV-light (30 W, 50 cm distance de radiations) pendant 30 min pour réduire la flore naturelle existante. Enfin, le résidu a été stocké dans un flacon à 4 °C jusqu'à son utilisation (Figure 8).



Figure 5 : Macération de la poudre de *Juniperus phoenicea* dans l'éthanol absolu (**Photo originale, 2021**)



Figure 6 : Filtration de l'extract sur papier filtre Whatman N°1 (**Photo originale, 2021**)



Figure 7 : Evaporation de l'éthanol à 50°C dans un évaporateur rotatif de type Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4000 (Photo originale, 2021)

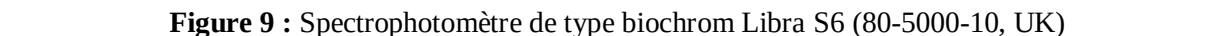


Figure 8 : L'extract brut de *Juniperus phoenicea* après évaporation (Photo originale, 2021)

Le rendement en extrait éthanolique a été calculé par la formule suivante :

R (%) = (le poids du ballon avec l'extrait brut – le poids du ballon vide)/poids de l'échantillon×**100** (Kemassi, 2014).

Les souches bactériennes de référence testées dans cette étude sont *Staphylococcus aureus* ATCC25923 et *Escherichia coli* ATCC25922 obtenues du Laboratoire Vétérinaire Régional de Laghouat (LVRL). *S. aureus* et *E. coli* ont été stockées à -80°C dans du bouillon BHI 10% de glycérol ajouté comme agent cryogénique. Une culture fraîche a été préparée en transférant une boucle de culture dans du BHIB, puis en l'incubant pendant 24 h à 35°C . Les cultures de *S. aureus* et *E. coli* ont été repiquées, respectivement sur des boîtes de BHI agar et EMB de levine agar, puis incubées à 35°C pendant 48 h. Pour obtenir une suspension de travail, l'inoculum a été préparé à partir des cultures récentes dans l'eau physiologique (0.9%), ajusté à la densité de 0.5 McFarland à l'aide d'un spectrophotomètre biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK) à une longueur d'onde de 620 nm afin d'obtenir une concentration finale approximative de 10^7 UFC/ mL (Figure9).



4.6. Préparation du fromage

Le fromage blanc à pâte molle (J'ben) utilisé dans cette étude a été fabriqué traditionnellement à partir du lait de vache cru entier de petit mélange dans une ferme rurale de la zone de daya de la commune de Laghouat, durant le mois de février 2021. Le procédé de fabrication de fromage est illustré dans la Figure 11. Tout d'abord, le lait a été chauffé à une température de 65 °C pendant 30 min et rapidement refroidi à une température inférieure ou égale à 4 °C. Ensuite, le lait est caillé à 45 °C en ajoutant la présure de type CHY-MAX® (Plus/Ultra/Extra, dosage: 30 à 60 IMCU/l, Danemark) (Figure 10). Après approximativement 12 heures de coagulation, le fromage a subi un égouttage qui a duré environ 24 heures. Le lactosérum a été retiré et le fromage a été emballé immédiatement et stockés à 4 °C.



Figure 10 : La présure de type CHY-MAX® (Photo originale 2021)

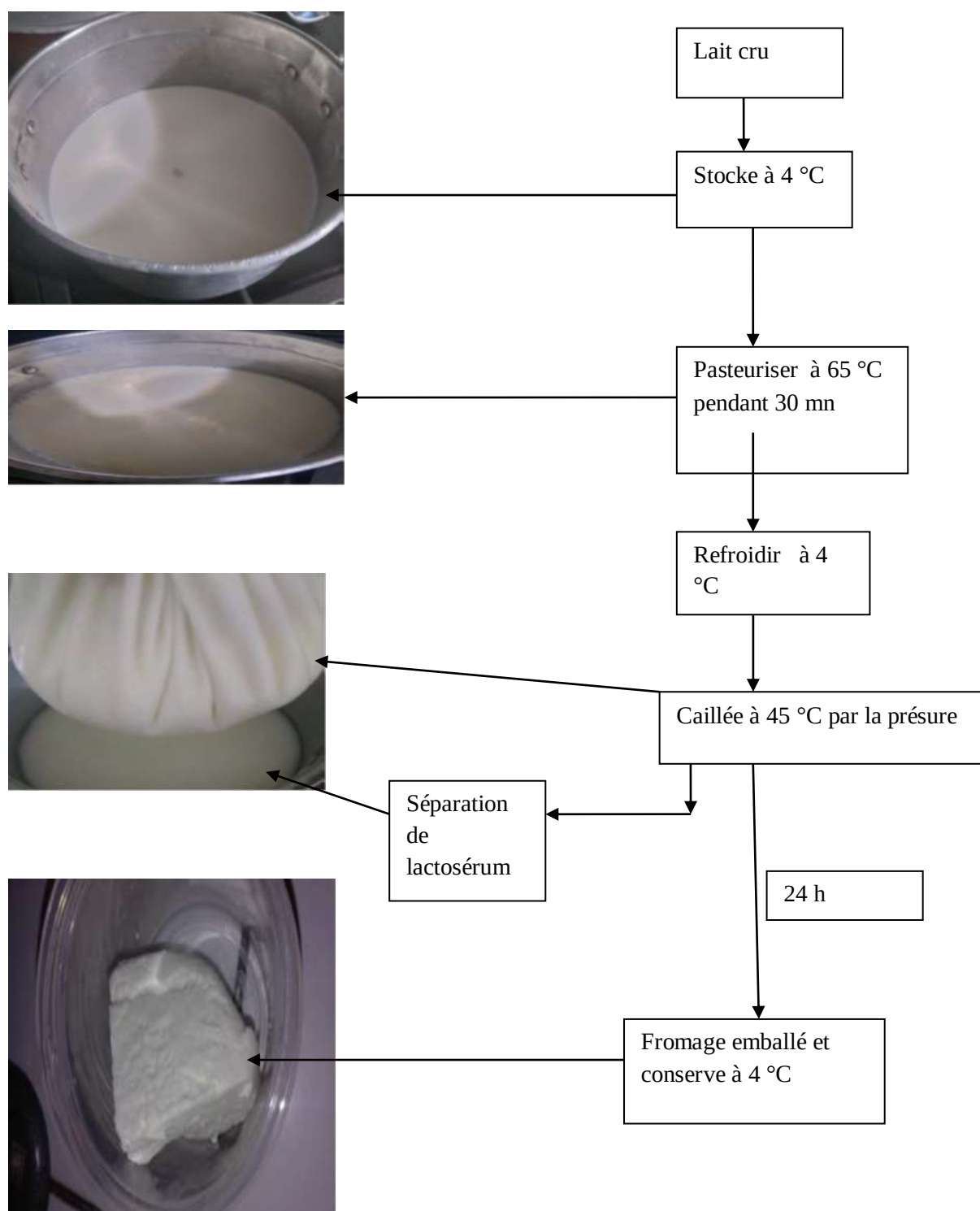


Figure 11 : Diagramme de fabrication du fromage blanc (J'ben) (Photo originale 2021)

4. 7. Incorporation de l'extrait et l'inoculum dans le fromage blanc

Huit cent grammes (800 g) de fromage blanc, précédemment préparés, ont été pesés dans une boîte stérile. Ensuite, le fromage a été coupé en morceaux uniformes d'environ 10 ± 0.1 g pour les analyses bactériologiques et la mesure du pH. Des échantillons de fromage ont été répartis au hasard en quatre groupes distincts dans des barquettes en polystyrène: deux témoins et deux groupes traités. Pour les groupes traités, les morceaux de fromage ont été traités par immersion dans 500 ml d'eau distillée stérile additionnée de 0.5% (m/v) d'extrait éthanolique de *J. phoenicea* pendant 4 minutes à 25 °C (Zhang, 2017). Notons que, la concentration 0.5% (m/v) d'extrait de plante a été choisie dans cette étude sur la base des tests préliminaires, donnant le meilleur aspect et L'absence d'odeur et de couleur dans le fromage. Les échantillons de fromage ont ensuite été inoculés séparément par 0.1 ml de suspensions bactériennes de 10^7 UFC/ml de populations de *S. aureus* ou *E. coli* selon la répartition suivante (Figure 12) :

- **Témoin 1:** groupe inoculé par *E. coli*;
- **Groupe 1:** groupe inoculé par *E. coli* et traité par 0.5% d'extrait éthanolique de *J. phoenicea*;
- **Témoin 2:** groupe inoculé par *S. aureus*;
- **Groupe 2:** groupe inoculé par *S. aureus* et traité par 0.5% d'extrait éthanolique de *J. phoenicea*.

Notons que, la concentration finale approximative des groupes inoculés est de 10^5 UFC/g de fromage. Tous les groupes ont été conservés dans le réfrigérateur à une température de 4 °C pendant 120 heures.



Figure12 : Les étapes de l'incorporation de l'extrait et l'inoculum dans le fromage blanc (**Photo originale 2021**)

4 .8. Mesure de pH

Le pH était mesuré à l'aide d'une électrode de pénétration de type aiguille (EUTECH Instruments, Germany) enfoncée dans la pâte de fromage. La mesure de pH est répétée trois fois pour chaque groupe durant la période expérimentale.

4 .9. Analyse bactériologique

4.9.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Les groupes destinés aux analyses bactériologiques sont préparés en pesant au moyen d'une balance de précision une quantité de 10 g du fromage blanc, prélevé avec une spatule stérile. Ensuite, la quantité préalablement pesée (10 g) est homogénéisée avec 90 mL d'eau physiologique stérile pendant 2 minutes. Cette suspension constitue alors la dilution mère qui correspond à la dilution 1/10 ou (10^{-1}). A l'aide d'une pipette stérile, un millilitre de la suspension mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement et introduit dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on prépare de la même

procédure pour les autres dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} (Guiraud, 2003). Tous les tubes sont agités soigneusement par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex (Bourgeois et Leveau, 1991). Dans ce cas, nous disposons de cinq dilutions décimales à partir desquelles les milieux de cultures serontensemencés (Figure13).



Figure 13 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales (Photo originale 2021)

4.9.2. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Le milieu Baird Parker a été utilisé pour la recherche et le dénombrement des staphylocoques. Ce milieu est additionné de jaune d'œuf (élément nutritif et révélateur enzymatique) et de Tétracycline de potassium (indicateur de noircissement des colonies) qui est souvent le milieu le plus favorable à la sélection et la différenciation des staphylocoques à partir des produits alimentaires, selon la méthode décrite par AFNOR : N F-V-08-014. L'ensemencement a été effectué par l'étalement en surface de 0.1 ml de chaque dilution décimale à la surface de la gélose sans toucher les bords de la boîte. Ensuite, les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 h à 48 h. Dans la gélose Baird-Parker, les colonies typiques de *S. aureus* sont d'une couleur noire brillante avec une zone claire distincte dans la gélose après la période d'incubation.

4.9.3. Dénombrement des germes *Escherichia coli*

Le milieu utilisé pour le dénombrement des germes *Escherichia coli* est le milieu EMB de Levine. L'ensemencement a été effectué par l'étalement en surface de 0.1 ml de chaque dilution décimale à la surface de la gélose sans toucher les bords de la boîte. Ensuite, les

boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 h. Après incubation, les colonies sont toutes dénombrées sur les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies. Dans la gélose EMB, les colonies typiques d'*E. coli* sont d'une couleur verte avec éclat métallique avec une zone claire distincte dans la gélose après la période d'incubation.

4.9.4. Calcul des charges bactériennes

Selon le JORADP N° 68 (2014), le nombre N des microorganismes dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée partir des deux dilutions successives, a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1n2) d}$$

Ou :

N : Nombre de microorganismes (ou UFC) présents dans 1g d'échantillon pour essai ;

$\sum C$: Somme des colonies comptées sur l'ensemble des boîtes retenues ;

V : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n1 : Nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n2 : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution ;

d : Taux de dilution correspondant la première dilution retenue.

4.9.5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type, calculés à partir des données obtenues de trois répétitions expérimentales. Les données ont été réalisées par le test de student t à l'aide de logiciel Microsoft Excel (Excel, 2007). Les différences sont considérées significatives au seuil de 5% ($p < 0.05$) entre les groupes traités et ses témoins. Toutes les Analyses statistiques et les figures ont été réalisées avec le logiciel Microsoft Excel.

Chapitre V : Résultats et discussion

Chapitre V : Résultats et discussion

5.1. Le rendement en extrait éthanolique de *J. phoenicea*

L'extrait éthanolique obtenu à partir de la plante *J. phoenicea* est de couleur miel ou caramel et d'odeur de Genévrier (Figure 14). De plus, le rendement en extrait de la partie aérienne de *J. phoenicea* est de 5% (m/m).



Figure 14 : Extrait de la Genévrier de Phénicie (photo originale, 2021)

5.2. Résultats du pH de fromage blanc réfrigérer traité par 0.5% d'extrait éthanolique de *J. phoenicea* :

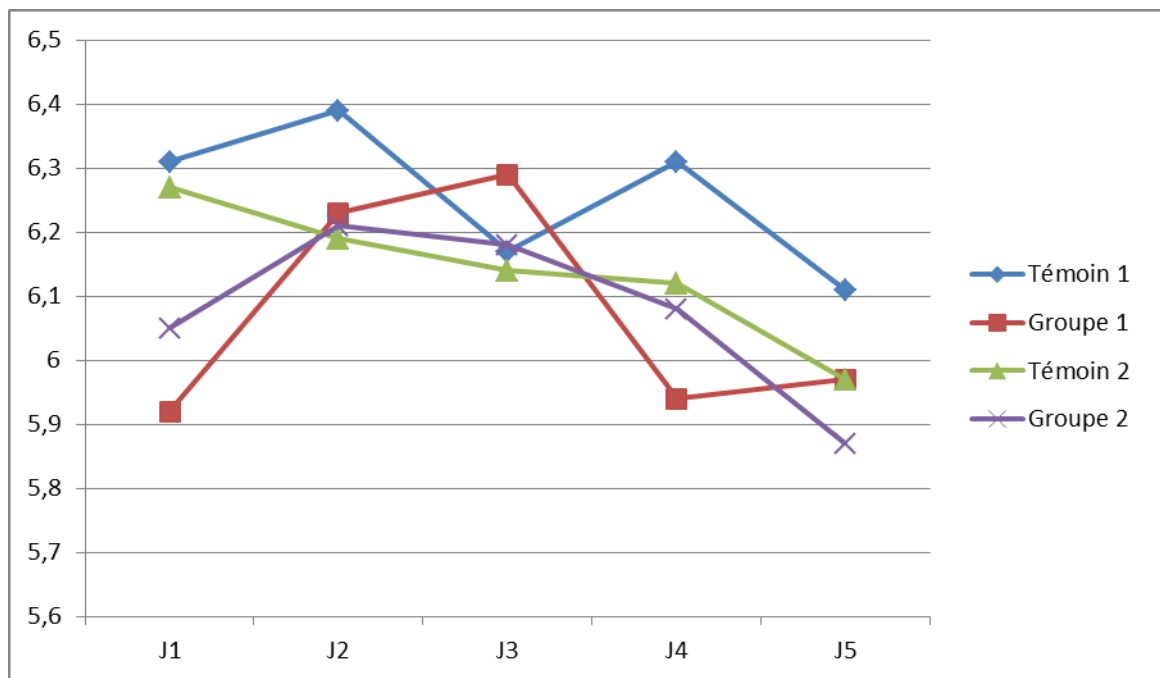
Nous remarquons dans le tableau 02 une fluctuation des valeurs de pH dans le groupe inoculé par *E. coli* où la valeur du pH du témoin était de 6,31 supérieure à celle du groupe traité (5,92). Les valeurs du pH ont augmenté le deuxième jour dans les deux groupes pour revenir à diminuer durant le reste de la période de conservation.

Tableau 02 : Résultats du pH de fromage blanc réfrigéré traité par 0.5% de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea*

Microorganismes	Groupes	pH ^a				
		Temps de stockage				
		J1	J2	J3	J4	J5
<i>E. coli</i>	Témoin 1	6,31±0,33	6,39±0,10	6,17±0,03	6,31±0,06	6,11±0,07
	Groupe 1	5,92±0,10	6,23±0,06	6,29±0,02	5,94±0,02	5,97±0,005
	P (probabilité)	0.13	0.07	0.0102	0.0005	0.03
	Signification	NS	NS	*	***	*
<i>S. aureus</i>	Témoin 2	6,27±0,12	6,19±0,02	6,14±0,03	6,12±0,08	5,97±0,06
	Groupe 2	6,05±0,08	6,21±0,12	6,18±0,04	6,08±0,02	5,87±0,05
	P (probabilité)	0.06	0.79	0.21	0.56	0.1
	Signification	NS	NS	NS	NS	NS

^aValeurs sont exprimés en moyenne ± écart (n=3); Témoin 1: (groupe inoculé par *E. coli*/4 °C) ; Groupe 1: (groupe inoculé par *E. coli* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique/4 °C) ; Témoin 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* /4 °C) ; Groupe 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique /4 °C). NS: différence non significative. * : p < 0,05 : différence significative. **: p < 0,01 : différence hautement significative.***: p < 0,001 : différence très hautement significative

Pour les groupes inoculés par *S. aureus*, on note une diminution continue du pH dans le groupe témoin durant la période de conservation, où la valeur du pH du témoin était de 6,27 supérieure à celle du groupe traité (6,05). Cependant, les valeurs du pH ont augmenté le deuxième jour dans le groupe traité pour revenir à diminuer durant le reste de la période de conservation (Figure 15), enregistrant une valeur de 5.87 au 5^e jour de stockage. Notons que le groupe traité et inoculé par *S. aureus* a présenté des valeurs de pH la plus faibles par rapport autres groupes expérimentaux.



Témoin 1: (groupe inoculé par *E. coli*/4 °C) ; Groupe 1: (groupe inoculé par *E. coli* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique/4 °C) ; Témoin 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* /4 °C) ; Groupe 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique /4 °C).

Figure 15 : La courbe de l'évolution du pH des différents groupes durant la période de stockage

5.3. Résultats d'analyse bactériologiques

Les résultats de dénombrement des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* inoculés dans le fromage blanc et traité par l'extrait de *J. phoenicea* sont présentés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Résultats de la charge bactérienne de fromage blanc réfrigéré traité par 0.5% de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea*

Microorganismes	Groupes	Temps de stockage				
		J1	J2	J3	J4	J5
<i>E.coli</i>	Témoin 1	6,78 ^a ±0,24	7,34±0,09	7,52±0,03	7,43±0,05	7,50±0,06
	Groupe 1	7,14±0,18	6,47±0,03	7,13±0,02	7,44±0,02	7,35±0,02
	P (probabilité)	0.11	0.00009	0.0001	0.59	0.013
	Signification	NS	***	***	NS	*
<i>S.aureus</i>	Témoin 2	5,93±0,06	6,61±0,22	6,55±0,05	6,74±0,26	6,83±0,06
	Groupe 2	6,07±0,18	6,32±0,01	6,54±0,01	6,25±0,05	6,21±0,03
	P (probabilité)	0.29	0.09	0.75	0.03	0.00007
	Signification	NS	NS	NS	*	***

^aValeurs sont exprimés en moyenne ± écart (n=3); Témoin 1: (groupe inoculé par *E. coli*/4 °C) ; Groupe 1: (groupe inoculé par *E. coli* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique/4 °C) ; Témoin 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* /4 °C) ; Groupe 2: (groupe inoculé par *Staphylococcus aureus* et traité par 0,5% d'extrait éthanolique /4 °C). NS: différence non significative. * : p < 0,05 : différence significative. **: p < 0,01 : différence hautement significative.***: p < 0,001 : différence très hautement significative

5.3.1. Dénombrement des *Escherichia coli*

La figure 16 montre l'aspect des colonies d'*Escherichia coli* obtenus sur milieu EMB, et qui sont de forme ronde et lenticulaire en surface. Dans la gélose EMB, les colonies typiques d'*E. coli* sont d'une couleur verte avec éclat métallique avec une zone claire distincte dans la gélose après la période d'incubation.

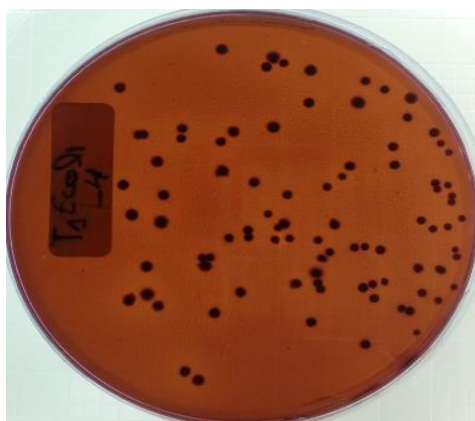


Figure 16 : Aspect d'*Escherichia coli* sur milieu EMB (Photo originale, 2021)

Le tableau 03 montre les résultats de dénombrement d'*Escherichia coli* dans le fromage blanc traité par l'extrait de la Genévrier Phénicie. Au premier jour, la charge initiale d'*E. coli* dans le groupe témoin est égale à 6,78 Log UFC/g et qui augmente progressivement durant le temps de stockage réfrigéré. Le traitement par l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* a montré une réduction hautement significative ($p < 0,001$) de la charge d'*E. coli* dans le fromage blanc au 2^e et 3^e jour de conservation, par rapport au témoin, et cette réduction est de 0.9 et 0.4 Log UFC/g, respectivement. Cependant, aucun effet de cet extrait n'a été détecté au 1^e et 4^e jour de conservation. Notons qu'une légère diminution ($p < 0,05$) de la charge d'*E. coli* a été enregistrée dans le groupe traité au dernier jour de stockage réfrigéré, par rapport au témoin, montrant l'effet modéré de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* sur la croissance de la bactérie *E. coli* inoculée dans le fromage blanc.

5.3. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Dans la présente étude, les colonies typiques de *S. aureus* sur milieu Baird Parker sont rondes avec une couleur noire brillante avec une zone claire distincte et de taille moyenne (Figure 17).

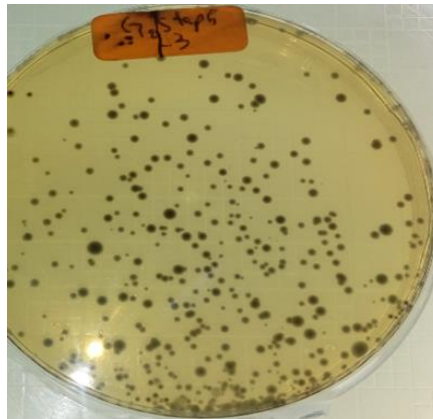


Figure 17 : Aspect de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker (**Photo originale, 2021**)

Le tableau 03 montre les résultats de dénombrement de *S. aureus* dans le fromage blanc traité par l'extrait de *J. phoenicea* et conservée pendant 120 h à 4°C. Au premier jour, la charge initiale de *S. aureus* dans le groupe témoin est égale à 5,93 Log UFC/g et qui augmente progressivement durant le temps de stockage réfrigéré. Ces résultats indiquent également que la croissance de *S. aureus* dans le groupe témoin était toujours supérieure à celle de groupe traité tout au long de la période de stockage. Il faut noter qu'aucun effet de cet extrait n'a été détecté sur la croissance des *S. aureus* durant les 72 heures de stockage réfrigéré. Cependant, le traitement par l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* a montré une réduction significative ($p < 0,05$) de la charge de *S. aureus* (réduction de 0.5 Log UFC/g) dans le fromage blanc au 4^e jour de conservation, tandis qu'une réduction hautement significative ($p < 0,001$) a été enregistrée au dernier jour de conservation (réduction de 0.6 Log UFC/g), par rapport au témoin, indiquant l'effet modéré de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* sur la croissance de la bactérie *S. aureus* inoculée dans le fromage blanc.

5.4. Discussion

Dans la présente étude, le rendement en extrait éthanolique des parties aériennes de *J. phoenicea* est de 5% (m/m). Le rendement d'extraction obtenu dans la présente étude était bien inférieur à celui rapporté par Menaceur et al (2013) et Ennajar et al (2009), qui ont enregistré respectivement 32% et 35.4% d'extrait éthanolique de feuilles de *J. Phoenicea*. Dans d'autres travaux, Amalich et al (2016) et Dane et al (2015) ont trouvé 16.6 % et 20.98 % d'extrait méthanolique des feuilles de *J. Phoenicea* et de rameaux feuillés, respectivement. L'extraction éthanolique semble la plus efficace avec un rendement de 16.20% pour un échantillon récolté en Turquie (Oktay et al., 2003) et de 14.57% pour des échantillons récoltés dans la région d'El Harrach (Menaceur, 2015). Ces deux valeurs sont largement supérieures par rapport à celle dont l'extraction est faite à l'eau (10.95%) (Menaceur, 2015). Ce dernier a constaté que la même plante provenant du Pakistan a fourni un rendement de 15.63% lorsque l'extraction est faite par l'éthanol qui est largement supérieur à notre rendement. Hayouni et al., (2007) ont trouvé que le rendement d'extraction obtenu à partir des feuilles de *J. phoenicea* est supérieur à celui obtenu à partir des fruits de la même espèce. D'après Hayouni et al., (2007), la nature de la matière première utilisée détermine la différence entre les rendements des extraits obtenus par deux méthodes d'extraction, et non pas le solvant utilisé dans l'extraction. Cependant, la variation des rendements est attribuée à la polarité des différents composés présents dans la feuille car les rendements les plus élevés ont été obtenus à partir des solvants polaires (Jayaprakasha et al., 2001). En général, le pourcentage de rendement d'extraction dépend principalement de la procédure d'extraction, en particulier de la polarité des composés extraits, de la température utilisée pour l'extraction et du ratio d'extraction de solvant et d'échantillon (Dane et al, 2015).

Dans la présente étude, une fluctuation des valeurs de pH ont été enregistrées dans les groupes étudiés durant toute la période de conservation. De plus, le groupe traité et inoculé par *S. aureus* a présenté des valeurs de pH la plus faibles par rapport autres groupes expérimentaux. Le pH pendant la fabrication du fromage est un paramètre critique du contrôle de la qualité car ce processus de fermentation provoque une diminution du pH qui atteint généralement 5.1 à 5.5, pour développer les caractéristiques organoleptiques du produit et inhiber en combinaison avec le sel la

multiplication des microorganismes pathogènes. L'effet du pH sur l'activité antimicrobienne des extraits de plantes n'est pas clairement élucidé. Cependant, certains auteurs ont signalé un effet plus important des extraits de plantes lorsque le pH était bas et qui a été attribué à la solubilité et à la stabilité accrues de ces composés à faible pH (Davidson et al., 2005), ce qui est en accord avec nos résultats. Juven et al. (1994) ont rapporté que les composés actifs phénoliques sensibilisent la membrane cellulaire de *S. aureus* et de *Salmonella Typhimurium*, et, lorsque la saturation des sites d'action se produit, il y a un dommage important et un effondrement soudain de l'intégrité de la cellule microbienne. Ils ont mentionné qu'à des valeurs de pH faibles, par exemple la molécule de thymol est principalement non dissociée et peut mieux se lier aux régions hydrophobes des protéines membranaires et se dissoudre dans la phase lipidique de la membrane.

Dans la présente étude, les résultats de dénombrement d'*E. coli* et de *S. aureus* montrent l'effet modéré de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* sur la croissance de ces bactéries inoculées dans le fromage blanc. Le potentiel antimicrobien de l'extrait de *J. Phoenicea* dans cette étude était principalement lié à leur contenu diversifié en substances bioactives, comme les polyphénols et les flavonoïdes. L'utilisation des extraits éthanolique de *J. phoenicea* dans des matrices alimentaires est souvent limitée en raison de considération de goût et d'arôme. L'efficacité de ces substances se diminue lorsqu'elles sont ajoutées à des matrices alimentaires complexes par rapport aux milieux microbiologiques. L'ajout de l'extrait éthanolique de *J. phoenicea* à un film comestible en concentrations de (0.25% et 0.5%) avait un effet positif sur la prolongation de la durée de conservation du fromage, et la bactérie la plus sensible était *S. aureus* (Shan et al., 2011 ; Tayel et al, 2015 ; Kavas et al, 2015). Nos résultats sont conformes aux études précédentes réalisées sur des souches uniques ou un cocktail de souches de *S. aureus* et *E. coli* (Shan et al., 2011 ; Tayel et al, 2015 ; Kavas et al, 2015) dans d'autres types de fromage. Des études *in vitro* ont montré l'efficacité antimicrobienne de l'extrait de *J. phoenicea* contre ces agents pathogènes (Elmhawi et al, 2015 ; Ghouti et al, 2018 ; Hayouni et al, 2007 ; Ait-Ouazzou et al, 2012 ; Angioni et al, 2003) où *S. aureus* présentait une sensibilité plus élevée à l'extrait de *J. phoenicea* par rapport à *E. coli*. Ces auteurs ont rapporté que la résistance la plus élevée d'*E. coli* pourrait être due à la complexité de sa membrane

externe, qui fournit une surface hydrophile capable d'agir comme une barrière à la pénétration des constituants de l'extrait de plante (Diniz-Silva et al, 2019).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a permis d'étudier l'effet de l'extrait éthanolique de *Juniperus phoenicea* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* inoculées dans le fromage blanc durant son stockage réfrigère à 4°C. Le rendement en extrait éthanolique des parties aériennes de *J. phoenicea* est de 5% (m/m). De plus, les résultats de dénombrement des germes pathogènes dans le fromage blanc traité par l'extrait de la Genévrier Phénicie montrent une activité modérée de l'extrait éthanolique de *J. Phoenicea* sur la croissance des bactéries *E. coli* et *S. aureus* durant la période de conservation à 4 °C, par rapport au témoin..

Bien que les souches testées n'aient pas été complètement inhibées, l'extrait éthanolique a permis de réduire la prolifération de ces agents pathogènes dans le fromage blanc frais. Une telle réduction de croissance des bactéries pathogènes pourrait notamment être utile en termes de sécurité alimentaire. Même si leur utilisation dans le domaine agroalimentaire est loin d'être évidente actuellement, ces résultats mettent en évidence les avantages potentiels de l'utilisation de cet extrait comme antimicrobien naturel dans les produits fromagers. Cependant, une future utilisation de l'extrait de *J. Phoenicea* comme additif alimentaire nécessite non seulement des enquêtes toxicologiques mais également des enquêtes réglementaires afin de fixer la dose journalière admissible (DJA) et les limites de tolérance de cet extrait dans les produits alimentaires.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- Tester d'autres méthodes d'extractions et leurs influences sur la composition chimique et les activités biologiques des extraits de *J. Phoenicea*.
- Approfondir l'analyse de la composition chimique des différents extraits éthanoliques de *J. Phoenicea*, afin d'identifier les composés chimiques responsables de leurs activités.
- Tester l'effet de l'extrait éthanolique de *J. phoenicea* sur la croissance des autres germes pathogènes responsables des toxi-infections collectives comme *Listeria* et *Salmonella*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- Abdoulaye A. 1988. Contribution à l'étude de l'hygiène dans la restauration collective au centre des oeuvres universitaires de Dakar (COUD). Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 26.uc.Sciences, 11(4) ,240-247p
- Abi azar R. ;(2007).Complication des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus. 196p. thèse doctorat. Agroparistech
- Aboul-Ela M.,El-Shaer N.,El-Azim T.A,2005,Chemical constituents and antihepatotoxic effect of the berries of *Juniperus phoenicea* Part II. Natural Produc.Sciences, 11(4), 240-247p
- Adams, R.P ., Barrero, A.F., Lara, A. (1996) : Comparisons of the leaf essential oilsof *Juniperus phoenicea*, *J.phoenicea* subsp. eu-mediterranea Lebr. et Thiv. And *J.phoeniceavar. turbinata* (Guss) Parl. J. Essent. Oil Res. 8 :367-371.
- Afifi M.S. et al., 1992. Essential oils of *Thuja occidentalis*, *Thuja orientalis*. *Cupressus sempervirens* and *Juniperus phoenicea* from the Mansoura. J. Pharm. Sci., 8, 37-46.
- Ahmed AI., Mohammed AA., Faye B., Blanchard L.et Bakheit SA., (2010).Assessment of quality of camelmilk and gariss, north Kordofan State,Sudan.Research Journal of Animal and Veterinary Sciences,5(1):P18-22.
- Al alam, D., 2008. Impact de l'interaction entre les cellules épithéliales et bronchiques et *Staphylococcus aureus* sur le chimiotactisme des lymphocytes T dans la mucoviscidose. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université de Reims (France), 164p.
- Avril J-L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. (2000). Bactériologie clinique. 2ème Edition, Ellipses, Paris. 602p.
- Avril JL, Dabernt H, Denis F, Montot H. Bactériologie clinique. Paris: Elipses; 1992.
- Alzand K.I., Aziz D.M., Tailang M, 2014, Isolation, structural elucidation and biological activity of the flavonoid from the leaves of *Juniperus phoenicea*. World Journal of Pharmaceutical Research, 3(10). 951-965p

- Amatiste S, Daniele Sagrafoli, Giuseppina Giacinti, Giulia Rosa, Virginia Carfora, Nicla Marri, Andreana Tammaro, Emanuela Bovi, Remo Rosati. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. *Italian Journal of Food Safety* 2014; volume 3:1696
- Amalich S, K. Fadili, Fahim M., EL Hilali F., Zaïr T.. Polyphenols content and antioxidant power of fruits and leaves of *Juniperus phoenicea* L. From Tounfite (Morocco). *Mor. J. Chem.* (2016) 177-186
- Angioni A, Barra A, Russo M T., Coroneo V, Dessiä Sa, Cabras P, 2003. Chemical Composition of the Essential Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3073-3078
- Balma L., 1989. Contribution à l'étude de l'hygiène de la restauration collective commerciale moderne dans la région de Dakar Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 39.
- Batt C A. & Tortorello M. (2014). *Encyclopedia Of Food Microbiology*. 2eme Edition, Elsevier Ltd Unless Stated, Amsterdam, 3248.
- Becila A. (2009). Préventions Des Altérations et Des Contaminations microbiennes des aliments. Mémoire du diplôme de post graduation. Université Mentouri Constantine. Pp 30-33.
- Bencharif A., (2001). Stratégies des acteurs de la filière lait en Algérie : états des lieux et problématiques. *Options Méditerranéennes Série B. études et recherches* 32 :p25-45.
- Benkerroum N. et Tamine AY., (2004). Technology transfer of some more occantraditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrialscale, areview. *Food microbio*, p21-399-413.
- Benkerroum, N. and Tamime, A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben, smen) to small industrial scale. *Food Microbiolternational*, 44: 643–651
- Bennick A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, pp: 184-196
- Berche .P, Gaillard.J.L.Simonet .M, 1989 : Bactériologie, les bactéries des infections humaines. Flamario médecine-France, 230-245 .

- Beuvier E. Feutry F. (2005). Bases microbiologie. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Pp 05.
- Bhunia A K. (2007). Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms And Pathogenesis. Springer Science Et Business Media LLC, USA, 276.
- Botineau, M. (2015). Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques. Ed Lavoisier. France., 128-129
- Bouchakour E.K. Djaghlali S. (2015). Etude comparative entre trois types de lait de vache (Lait entier, lait demi – écrémé et le lait écrémé) pasteurisé. Mémoire de master. Université Djilali bounaama.
- Boughelout H., 2007 : Coagulation du lait par la pepsine de poulet. Mémoire magister, sciences alimentaires option Biochimie et Technologies Alimentaire : Institut de la Nutrition de l’Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), 82 pages.
- Boujema E., Belkhou R., Oualilalami A. et Bennani L., (2013). Caractérisation microbiologique et physicochimique du lait cru et de ses dérivés traditionnels Marocains (Lben et Jben). Les technologies de laboratoire, Volume 8, p33.
- Bourgeois C.M. L’arpent J.P. (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Lavoisier. Paris. Pp 432-704.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. Zucca J., (1996). Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Techniques et documentation Lavoisier. Paris.
- Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. & Chaabouni M.M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l’huile essentielle de Juniperus phoenicea. J.Soc.Chim .Tunis., 10, 119-125.
- Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. & Chaabouni M.M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l’huile essentielle de Juniperus phoenicea. J.Soc.Chim .Tunis., 10, 119-125.
- Bouraoui A. (2014). Intérêt de fabrication de fromage analogue. Mémoire master. Institut supérieur de biotechnologie de Monastir en Tunisie.

- Budic-letoc, I., Lovric, T., Pezo, I., Klujzuric, J.G. (2005). Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1): 47-53.
- Cavaleiro C. et al., 2000. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinate* from Portugal. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 1175-1183.
- Corne, P., 2004. *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques et Chimiques de la Santé. Université de Montpellier (France), 116p.
- Cuvelier, C., 2002. Infections de l'intestin grêle. *Acta Endoscopica* 32, 157-166.
- Daayf, F., & Vincenzo, L. (2008). *Récent Advances in Polyphenol Research*. Ed Blackwell Publishing .USA, 2-22-23-68-74-233.
- Dane, Y.; Mouhouche, F.; Canela-Garayoa, R.; Delpino-Rius, 2015. A. Phytochemical analysis of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L. and *Tetraclinis articulate* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab. J. Sci. Eng.*
- Dane Y, Mouhouche F, Canela-Garayoa R, Delpino-Rius A. (2015). Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arab J Sci Eng*
- Da Silva N., Taniwaki M H ., Janqueira V C., Silveira N., Da Nascimento M., Abeilar R., Gomes R. (2012). *Microbiological Examination Methods Of Food And Water. A Laboratory Manual* et CRC Press, 484.
- Davidson M P., Sofos J N., Branen A.L. (2005). *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Food science and technology, 143.
- Dawidar A.M., Ezmirly S.T. & Abdel-Mogib M., 1991. Sesquiterpenes and diterpenes from *Juniperus phoenicea* L. *Pharmazie*, 46, 472-473.
- Desmazeaud M.J. (1992). Les bactéries lactiques; recherche et application industrielle en agro-alimentaire. Colloque APRIA du 12-13 septembre 1992, Caen, France.

- de Souza G.T, Rayssa Julliane de Carvalho , Jossana Pereira de Sousa , Josean Fechine Tavares , Donald Schaffner , Evandro Leite de Souza , Marciane Magnani. Journal of Food Protection, Vol. 79, No. 2, 2016, Pages 246–252
- Diallo M. L. 2010. Contribution à l'étude de la qualité bactériologique des repas servis par Dakar Catering selon les critères du groupe SERVAIR Thèse : Méd. Vét. : Dakar ; 7.
- Diniz-Silva, H.T., Brandão, L.R., de Sousa Galvão, M., Madruga, M.S., Maciel, J.F., Leite de Souza, E., Magnani, M., Survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Escherichia coli* O157:H7 in Minas frescal cheese made with oregano and rosemary essential oils, Food Microbiology, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103348>.
- Djafri N. et Djaout F. (2015), Evaluation de la qualité microbiologique et physicochimique de fromages frais de fabrication industrielle ou artisanale, pp02
- Djouhri K. Madani S.(2015). Etude microbiologique d'un produit laitier fermenté traditionnel (J'ben) : isolement et identification des bactéries lactiques. Mémoire de master. Université Kasdi Merbah. Ouargla.
- Duke J.A., 1998. Phytochemical database. Beltsville, MD, USA : Beltsville Agricultural Research Center.
- Edenharder R., et Grünhage D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research. 540, 1–18.
- Elmhdwi MF, Attitalla IH, Khan BA (2015) Evaluation of Antibacterial Activity and Antioxidant Potential of Different Extracts from the Leaves of *Juniperus Phoenicea*. J Plant Pathol Microb 6: 300. doi:10.4172/2157-7471.1000300
- El-Sawi S.A., Motawae H.M. & Ali A.M., 2007. Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. Afr. J. Tradit. Complementary Altern. Med., 4(4), 417-426.

- El-Sawi S.A., Motawae H.M., Sleem M.A.-F., El-Shabrawy A.-R.O., Sleem A., Ismail MA.-N, 2014, Phytochemical screening, investigation of carbohydrate contents, and antiviral activity of *Juniperus phoenicea* L. growing in Egypt. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants*. 20(1), 83-91p
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, Romdhane M. Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils and Various Extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *Journal of Food Science*—Vol. 74, Nr. 7, 2009.
- Espina L, García-Gonzalo D, Laglaoui A, Mackey BM, Pagán R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int J Food Microbiol*. 2013 Jan 15;161(1):23-30.
- Fatet P. (2004). Les staphylocoques dans l'industrie laitière. *GDS Info* 2004/2005 l'action sanitaire ensemble. pp :34-35.
- Federighi, M. (2005). *Bactériologie Alimentaire compendium d'hygiène des aliments*. 2ème Edition, Economica. 292 p.
- Frithz, C. A., Pellino C., AFlagler M. J., Strasser J. E., and A Weiss A. 2015. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infect. Immun.*, 79:1329-1337.
- Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. et Fernández-Gutiérrez A. (2010). Phenolic compound. Extraction systems for fruit and vegetables samples. *Molecules*. Vol. 15. pp 8813-8826.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2005. The Revised Road Map to the Manual in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed. II. vol. 2. Springer (New York), 159–220.
- Gelais ST-D.Tirrard-coller P., Belanger G., Draapeau R., Couture R.,(2002). *Le fromage In Science et technologies du lait transformation du lait* par Vignola Carole L. presse internationale polytechnique. 349-413pp
- Geo FB, Janet SB, Stephen AM. *Medical microbiology*. Middle East Edition; 2004.
- Goubau P. et Pellegrims E .2000. *Repères en microbiologie*, Edition Garant. P :391.

- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Série Agroalimentaire. Dunod. Paris. pp. 94-140-652.
- Greatores N., Thorme G. 1994. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1375-1377.
- Hamada I. Debbakh H., (2014), Synthèse bibliographique sur la microflore du fromage, pp 04.
- Hamad MAH & Aisha MRA. 2017. Separation and Identification the Speciation of the Phenolic Compounds in Fruits and Leaves of Some Medicinal Plants (*Juniperus phoenicea* and *Quercus coccifera*) Growing at Al-Gabal Al-Akhder Region (LIBYA). *Indian J of Pharmaceutical Education and Research.*; 51(3)Suppl:S299-303.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, vol.105, n.3, p.1126-1134.
- Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de docteur. Université de toulouse.
- Hopkins, W.G. (2003). Physiologie végétale .Ed De Boeck .Bruxelles .France, 268 -283.
- Juven B. J., Kanner, J., Schved, F., and Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:626–631.
- Jean L. A., Henry D., François D., Henri M. (1992). bactériologie clinique 2ème édition, pp152-159, 507p
- Kabir A. (2015). Contrainte de la production laitière en Algérie et Evaluation de la qualité des laits dans l'industrie laitière (Constats et perspective). Thèse de doctorat. Université Ahmed Ben Bella. Oran.
- Katz H., Weaver W.W., (2003). Encyclopedia of food and culture. Volume 1: Acceptance to food politics. 718p. Charles Scribner's Sons. New York.
- Kavas N, Gökhan Kavas & Derya Saygili (2015): Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli*

O157:H7 and *Staphylococcus aureus*, *CyTA - Journal of Food*, DOI: 10.1080/19476337.2015.1109001

- Kemassi, 2014.- Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphorbiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) et de *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional) sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae) thèse de doctorat en Écologie Saharienne et Environnement, université de Kasdi Merbah-Ouargla, 264 p.
- Koffi E., Sea T., Dodehe Y., Soro S. (2010). Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *J. Animal & Plant Sci.* Vol. 5. pp 550-558.
- Lamprell, H., 2003. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université de Bourgogne (France), 79p.
- Lebres A.D. et Hamza A., (2002). Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des laits et produits laitiers », Institut Pasteur d'Algérie.
- Levizou E., Petropoulou Y. et Manetas Y. (2004). Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of co-extracted phenolics. *Photosynthetica*. Vol. 42. pp 295-297.
- Lin L, Yulei G, Haiying C. 2019. Moringa oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers for food packaging against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on cheese. *Food Packaging and Shelf Life* 19 (2019) 86–93
- Lucchesi M.E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : Chimie. Université de la Réunion.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allmand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses Polytechniques et universitaires. Romandes*. 192p.

- Mahmoudi S., Khali M., Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) *Revue, Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 09. pp. 35-40.
- Mainil, J. (2003). Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: Franchissement des muqueuses et propriétés invasives. *Annales de médecine vétérinaire*, 147,159–171.
- Maia, D.S.V., Haubert, L., dos Santos Soares, K. *et al.* *Butia odorata* Barb. Rodr. extract inhibiting the growth of *Escherichia coli* in sliced mozzarella cheese. *J Food Sci Technol* 56, 1663–1668 (2019).
- Massaux, C. (2012). Polyphénols : des alliés pour la santé. 149.
- Medini H. et al., 2006. Composition and variability of the essential oils of the leaves from *Juniperus phoenicea* L. from Tunisia. In: Acte du séminaire international « Les plantes à parfum, aromatiques et médicinales », SIPAM, Tunisie.
- Medini M., Elaissi A., Khouja M.L., Chemli R, 2013. Phytochemical screening and antioxidant activity of *Juniperus phoenicea* ssp. *phoenicea* L. extracts from two Tunisian locations. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1(2), 77-82p
- Mehdizadeh T, Narimani R, Mojaddar Langroodi A, Moghaddas Kia E, Neyriz-Naghadehi M. 2018. Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* essential oil and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* O157 stability in the Iranian probiotic white-brined cheese. *J Food Saf.* 2018;e12476
- Menaceur F, Benchabane A, Hazzit M & Baaliouamer A. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian *Juniperus phoenicea* L. Extracts. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3:1, 87-96, DOI: 10.1080/22311866.2013.782754
- Menaceur F. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et biologique de l'érigeron, du fenouil commun, de la lavande et du genévrier, Doctorat Thèse, Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach –ALGER Département Sciences Agronomiques.126-127.

- Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., Elyachoui, M. 2007. Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2,23–27.
- Molino, P. (2005), A guide to médicinal plants in North Africa, Ed IUCN, Espagne., 141. Nikolova M., & Dzhurmanski, A. (2009). Evaluation of Free Radical Scavenging Capacity Of Extracts From Cultivated Plants. Biotechnology. EQ, 23.
- Mojaddar Langroodi A, Tooraj M, Lalezar M, Moslem N N. Lactobacillus acidophilus and Anethum graveolens essential oil in Iranian cheese against *Escherichia coli* O157:H7. Flavour Fragr J. 2020;00:1–7.
- Mukohata Y., Nakabayashi S., et Higashida M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. Journals in Biochemistry. 85: 215–218.
- Nasri N, Tlili N, Elfalleh W, Cherif E, Ferchichi A, Khaldi A, Triki S (2011). Chemical compounds from Phoenicia Juniper berries (*Juniperus Phoenicea*). Nat. Prod. Res. 25(18): 1733-42
- Nauciel C., Vildé J-L. (2005). Bactériologie médicale. 2ème edition, Masson. Paris. p272.
- Oztürk M, Tümen İ, Uğur A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. J Sci Food Agric. 2011 Mar 30;91(5):867-76.
- Tayel AA, Hussein H, Sorour NM, El-Tras WF. Foodborne Pathogens Prevention and Sensory Attributes Enhancement in Processed Cheese via Flavoring with Plant Extracts. Journal of Food Science. 80, 2015.
- Quezel, P ., & Gast, M. (1998). Genévrier ., Encyclopédie berbère.. Gauda – Girrei, (20) 3016-3023.
- Quezel ,P.& Santa,S. (1962).-Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.Tome 1 .Ed.CNRS,Paris.

- Ramdani M, Lograda T, Silini H, Zeraib A, Chalard P, et al. Antibacterial activity of Essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, MediPoeia, 2013, 3, pp.022-028.
- Randazo, C.L., Caggia, C. and Neviani, C.L.E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods*, 78: 1–9
- Ray B. & Bhunia A. (2013). *Fundamental Food Microbiology*. 5^{ème} Edition, Taylor Et Francis Group, Boca Raton, 577.
- Rezzi S. et al., 2001. Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *Turbinata* from Corsica. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 179-188.
- Ribéreau–Gayon P. (1968). Notion générale sur les composés phénoliques. In « Les composés phénoliques des végétaux », Ed.: Dunod, pp: 1-27.
- Richter G. (1993). *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*. Ed.: Française, ISBN: 2-88074-231-5, pp: 317-339.
- Robinson R. K., (2002). *Dairy microbiology hand book. The microbiology of milk and milk products*. Third edition. Edition John Wiley and sons, INC. New York. 780p.
- Romain J, Croguennec T., Schuck P. et Brule. G., "Science des aliments Volume 2 Technologie des produits alimentaires ". Edition Technique et Documents Paris. (2007) , 449p.
- Rouabhia M.E.H. et Messoudi S., 2017 : Comparaison entre trois recettes du fromage à pâte molle type Camembert. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du ingénieur d'état , Nutrition, Alimentation et Technologie Agro-alimentaire, Université Constantine -1- Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A) , 54 pages
- Saint –Gelais D., Tirard – Collet P., 2002. Le fromage., 349-394.
- Sauvion, N., Calatayud, P.A., Thiery, D., Marion-Poll, F. (2013). Interactions insectes-plantes Ed IRD, Quae. Institut de recherche pour le développement .Marseille. France, 218-220.
- Senoussi A. (2013). Caractérisation microbiologique de la peau de chèvre utilisée dans la fabrication du fromage traditionnel Algérien « Bouhezza ». Mémoire de magister. Université Constantine.

- Silait, Salon international du lait (2008). Acte du 1^{er} salon international du lait et de ses dérivés du 27 au 29 mai 2008 Alger.
- Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208.
- Shan Bin, Yi-Zhong Cai, John D. Brooks, and Harold Corke. 2011. Potential Application of Spice and Herb Extracts as Natural Preservatives in Cheese. *J Med Food* 14 (3) 2011, 284–290
- Tang, Y. W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J. 2014. *Molecular medical microbiology*. Academic Press. 2^{ème} édition. P: 2216.
- Tayou F. M. 2007. Etude de l'hygiène dans la restauration commerciale moderne à Dakar Thèse : Méd. Vét : Dakar ; 26.
- Tchamba C.N. (2007). Caractérisation de la flore lactique des laits fermentés artisanaux au Sénégal: cas de la zone des Niayes. Thèse de doctorat. Université Cheikh ANTA DIOP de Dakar. Pp16.
- Tsimogiannins D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science Emerging Technologies*. 7, 140-146.
- Vignolo C.L. (2002). *Science et technologie du lait*. Canada. p600.
- Vimont, A. (2007). Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) .Thèse de Doctorat en Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bern Yao L.H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., et Chen S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Food for Human Nutrition*. 59, 113-122.
- Zergoune F. (2015). La sélection des souches des bactéries lactiques protéolytiques isolées à partir d'un produit laitier fermenté artisanale à basse de lait de vache « j'ben ». Mémoire de master. Université Kasdi Merbah. Ouargla.
- Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 5 (12):751–62. and E – Lyon, 34.

Site web

AFSSA, 2008. Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale. [En ligne] Accès internet:<http://www.anses.fr/Documents/SANT-Ra-MethodeRisque.pdf> page consultée le 18/02/2014)