



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULATION

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE

LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA

Faculté des sciences

Département de biologie moléculaire et cellulaire

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER Académique

Option

Biochimie appliquée



*L'optimisation de l'extraction des enzymes végétaux à
partir de la plante *Silybum marianum* (Chardon marie)*

Présenté par:

* Ghazal Roumaïssa

* Laouar Kenza

Soutenu le : 07/07/2019

Jury de soutenance :

Président : M. Abaidia A. (M.A.A) Université Abbes Laghrouour – Khenchela

Examineur : Dr. Fellous S. (M.C.B) Université Abbes Laghrouour – Khenchela

Encadreur : M. Boussaa A. (M.A.A) Université Abbes Laghrouour – Khenchela

Année Universitaire :2018 /2019

Remerciement

*Avant tout je remercie **Dieu** le tout puissant, le Miséricordieux,
de m'avoir*

donnée le courage, la force, la santé et la persistance

Mes sincères remerciements

*A monsieur **BOUSSAA ABDELHALIM**, pour la confiance
qu'il m'a accordée et la
sympathie qu'il m'a témoigné. Je le remercie également pour
l'honneur qu'il me
fait en encadrant ce mémoire.*

*A monsieur **ABAIDIA ABDELGHAFOUR***

D'avoir accepter de présider ce jury.

*A monsieur **SAMIR FELLOUS** mon examinateur.*

A tous les Enseignants qui ont contribué à ma formation.

Au personnel de laboratoire pédagogique.

*Enfin, je remercie, tous ceux qui ont contribué de près et de loin
à la réalisation de ce travail.*



Dédicace

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail :
A celui qui a été toujours Mon support dans cette vie, celui qui
me donne le
courage éclatant pour continuer à chaque fois que j'ai
l'impression de reculer...
papa que DIEU vous protège
A celle qui était et qui restera mon soutien dans cette vie, à
celle qui ma
renseigné comment aimer DIEU ; comment fait apparaitre le
succès et la
prospérité du sein du mal et des problèmes...à vous maman, que
DIEU vous
protège et vous donne la pleine santé et le plein bonheur du
monde, de joie et d'attestations.*

*A Ma sœur, je vous réserve
toujours une place dans mon cœur et mes pensées.*


A mes amies, Hadjer Mebrouki, Amira Talbi.

Et tous mes Amis sans exception.

A tout les étudiants d'université de khanchela.

*A tout mes familles sans exception surtout ma grande père Amor
Bouchana*

Roumaissa



Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que Je dédie :

A mes très chers parents,

Tout d'abord et spécialement à ma chère mère qui aurais été fière de ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte maman, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Que le Dieu l'accueil dans son vaste paradis.

Amon très agréable père, qui s'est tant sacrifié pour moi et pour assurer mon bien être.

J'espère que je suis à la hauteur de ce qu'il attend de moi.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue Vie.

Mon frère et Mes sœurs

Brahim, Madiha, Sameh, aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie me comble de bonheur. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

À tous les membres dela famille

Laouar, petits et grands.

Tout la promotion 2017 Biochimie Appliquée Sans exception.

Kenza



Résumé

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Partie I : Etude bibliographique

Introduction générale.....01

Chapitre I : Etude botanique de *Silybum marianum*

I.1.Généralités.....03

I .2. Systématique.....04

I .3. Nomenclatures.....04

I .4. Origine et habitat04

I .5. Description Botanique de la plante05

I .6. Description morphologique.....05

a. Tiges.....05

b. Feuille.....06

c. Fleurs06

d. Racines.....07

e. Graine.....07

I .7. Climat et sol.....08

I .8. Croissance du chardon-Marie.....08

I .9. Les composants chimiques.....09

I .10. Les activités de chardon Marie.....12

a. Activité antioxydante12

b. Activité hépatoprotectrice12

c. Activité anti-inflammatoire.....14

d. Activité immunomodulatrice	14
e. Activité antifibrotique	15
f. Activité anticancéreuse	15
I.11. Les Effets	16
a. Effet neuroprotecteur	16
b. Effet cardioprotecteur	16
c. Effet biliaire	16
d. Effet antiviral.....	16
e. Effets antitumoraux et anticarcinogènes	17
f. Effet préventif protecteur	17
g. Effets secondaires, contre-indications, toxicité.....	19

Chapitre II : Fabrication de fromage frais

I. le lait.....	20
I.1. Définition.....	20
I.2. Composition du lait.....	20
I.3. Caractéristiques physico-chimiques du lait.....	21
II. Le fromage.....	22
II.1.Définition.....	22
II.1.1. Le fromage frais.....	22
II.1.1.1.Classification du fromage frais.....	22
II.1.1.2. Généralités sur la fabrication du fromage frais.....	23
1. Préparation du lait avant la fabrication du fromage frais	23
2. Technologie de fabrication du fromage frais	24
II.1.2.Transformation du lait en fromage	25
II.1.2.1.La coagulation du lait.....	26
a. La coagulation enzymatique	26

b. La coagulation par les extraits des plantes.....	27
c. La coagulation par la présure7.....	27
II.1.2.2. Egouttage	27
II.1.2.3. Salage	28
II.1.2.4. Affinage.....	28
III. Caractéristique de fromage.....	29
IV. Situation de la filière lait en Algérie.....	30
V. Les fromages traditionnels les plus connu en Algérie.....	31
V.1. Lben.....	31
V.2. Jben.....	32
V.3. klila.....	33
V.4. Bouhezza.....	33
V.5.Ighounane.....	33
V.6. Takammart.....	34
V.7. Aghoughlou	34
V.8. Mechouna	34
V.9. Aoules	34

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthode

I. 1. Matériel végétal	35
I. 2. Extraction des coagulants végétaux	35
I. 2. 1. Extraction par macération	35
I.2.2. Extraction par le trichlorure d'acide acétique (TCA)	35
I.3. Dosage des phénols totaux	36

I.4. Dosage des flavonoïdes	36
I.4. Dosage des flavonoïdes	36
I.5. Dosage des tannins condensés	36
I.6. Etude de l'activité enzymatique coagulante	36
I.6.1. Détermination de force coagulante	37
I.7. Etude des aptitudes antioxydante	37
I.7.1. Etude de l'activité antioxydant totale	37
I.7.2. Etude de l'activité anti radicalaire	38
I.7.3. Etude de l'activité réductrice	38
I.8. Optimisation de l'extraction des enzymes coagulantes	39
I.9. Analyse statistique	39

Chapitre II : Résultat et discussion

I. Dosage spectrophotométrique	40
I.1. Dosage des poly-phénols totaux	40
I.1.1. Dosage des poly phénols totaux	40
I.1.2. Dosage des flavonoïdes	41
I.1.3. Dosage des tannins condensés	42
I.1.4. Dosage des protéines	43
I.1.5. La force de coagulation du lait (F)	43
I.2. Evaluation de l'activité biologique in-vitro	44
I.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le radical libre diphenyle-picrylhydrazyle (DPPH)	44
I.2.2. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)	46

I.2.3. Activité antioxydante totale	48
II. Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction.....	49
II.1.Résultats de la réalisation de la matrice des essais	49
II.2.Résultats d'ajustement du modèle	51
II.3.Etude de l'effet des variables explicatives sur les réponses.....	52
1. Effet de la température sur les réponses étudiées	52
2. Effet du temps sur les réponses étudiées	52
3. Effet du rapport L/S sur les réponses étudiées	52
II.4.Etablissement des équations polynomiales de deuxième degré	52
II.5.Analyse des surfaces de réponse.....	53
II.6.Résultats de validation du model	56
Conclusion générale	57
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 01 : Composition globale du lait de vache	20
Tableau 02: Caractéristiques physicochimiques du lait de vache	21
Tableau 03 : Les variables explicatives et leurs niveaux.....	39
Tableau 4: Matrice d'expérience et les réponses associées.....	50
Tableau 5: Résultats d'ajustement du model et les effets des variable indépendantes sur les réponses.....	51
Tableau 6: Résultats de validation du model.....	56

Listes des figures

Figure 01 : <i>Silybum marianum</i> (photo original).....	03
Figure 02 : Distribution de <i>Silybum marianum</i> dans le Mediterranean et l'Europe.....	05
Figure 03 : Tige de chardon Marie (photo originale).....	06
Figure 04 : Feuille de chardon marie (photo originale).....	06
Figure 05 : Fleurs de chardon Marie (A : fraîches, B : sèches).....	07
Figure 06 : Racine de chardon marie (photo originale).....	07
Figure 07 : Graines de chardon Marie : A : libres B : attachés avec leurs aigrettes.....	08
Figure 08 : des principaux constituants de la silymarine.....	10
Figure 09 : Schéma présente les différentes étapes de préparation des produits laitiers traditionnels Algérien.....	31
Figure 10 : Teneurs en phénols totaux des extraits de fleur de <i>S. marianum</i>	40
Figure 11 : Teneurs en Flavonoïdes des extrait des fleur de <i>S. marianum</i>	41
Figure 12 : en tannin des extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	42
Figure 13 : Teneur moyenne en protéine de l'extrait des fleurs de <i>S. marianum</i>	43
Figure 14 : Résultat de la force de coagulation du lait par les 3 extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	44
Figure 15 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH des deux extraits de <i>S. marianum</i>	45
Figure 16 : IC50 de l'acide ascorbique et des extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	46
Figure 17 : Pouvoir réducteur du fer des extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	47
Figure 18 : EC50 de l'acide ascorbique et des extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	48
Figure 19 : L'activité antioxydante totale des extraits des fleurs de <i>S. marianum</i>	49
Figure 20 : Représentation tridimensionnelle des modèles polynomiales de deuxième degré Rendement avec température et ration L/S	53

Figure 21 : l'effet des variables indépendantes sur la réponse Y_2	54
Figure 22 : la variation des valeurs de l'activité anti radicalaire en fonction des variables indépendantes.....	55
Figure 23 : la variation des valeurs de Bradford en fonction des variables indépendantes.....	56

Liste des abréviations

ATP : Adénosine triphosphate

DPPH : Diphényle-picrylhydrazyle

EAA : Equivalent d'acide ascorbique

EAG : Equivalents d'acide gallique

EC : Equivalent de quercétine

EC : Equivalents de catéchine

FAO : Food and Agriculture Organisation

FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power

HepG2 : Virus de l'hépatite B négatif ; p53 intactes

Hep3B : Virus de l'hépatite B positif ; p53 mûri

IC50 : La concentration d'inhibition à 50 %

LT : Lymphocyte T

MCF7 : Cellules de cancer du sein

MGLA : Matière grasse laitière anhydre

PHE105-MET106 : Liaison phénylalanine méthionine

PIIINP : Peptide pro collagène III N-terminal

Radiations UV : Radiation ultraviolette

S. marianum : Silybum marianum

TCA : Acide trichloracétique

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and a 3D effect. The scroll is unrolled in the center, with the text 'Introduction générale' written on it in a black serif font.

Introduction générale

Pendant des siècles, les gens ont utilisé des plantes pour guérir et prévenir les maladies (**Raskin et al., 2002**). La plupart des plantes médicinales sont récoltées dans la nature. La culture de ces plantes est nécessaire pour garantir leur disponibilité pour l'industrie, ainsi que pour les personnes associées aux systèmes de médecine traditionnels. En cultivant des herbes, des techniques traditionnelles et biotechnologiques de sélection des plantes peuvent être appliquées au niveau génétique pour améliorer le rendement et l'uniformité, et pour modifier la puissance. Les méthodes conventionnelles de sélection végétale peuvent améliorer les caractéristiques tant agronomiques que médicinales (**Canter et al., 2005**).

Cette plante possède des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. (**Teixeira da Silva, 2004**).

La région méditerranéenne, en dépit de sa localisation dans une zone tempérée loin de la biodiversité des hotspots "points chauds", possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde et une biodiversité de première importance avec beaucoup de plantes d'intérêt thérapeutique (**Myers, 2000**).

L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire d'utilisation traditionnelle des plantes. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques. (**Quézel et Santa, 1963**).

La plante *Silybum marianum* (chardon marie) est une plante médicinale algérienne. Cette dernière est une plante annuelle ou bisannuelle de la famille des Asteraceae, endémique de la région méditerranéenne (**Beniston et Beniston, 1984**).

En fait, la préparation d'une pâte alimentaire artisanale connue sous le nom de «Djben » par coagulation du lait à l'aide d'extraits de fleurs de *S. marianum* reconstitue une technologie originale spécifique de certaines régions Algériennes. Or cette pratique traditionnelle faisant partie du patrimoine culinaire du pays est en train de se perdre et mériterait d'être étudiée en vue d'une meilleure adaptation au marché et au consommateur d'aujourd'hui.

Pour développer ou optimiser les processus, de nombreuses entreprises utilisent des approches statistiques, telles que la méthodologie de surface de réponse, dans leur

département de recherche afin d'obtenir la meilleure combinaison de facteurs (température, temps, ration) qui rendra la meilleure caractéristique d'un produit (Nwabueze, 2010).

L'objectif de cette étude est d'optimiser les conditions de coagulation du lait (présure végétale) avec une analyse physicochimique et sensoriel des produits optimisé.

. Dans ce contexte et notamment dans le cadre de notre recherche qui est l'étude des plantes médicinales, notre choix était basé sur la détermination de quelques propriétés biologiques de la plante *Silybum marianum* et la collecte des informations sur la richesse en principes actifs (flavonoïdes, tanins, protéine, poly-phénol....), et pour tester l'activité antioxydante (DPPH, FRAP, TAC...) et l'activité coagulante.

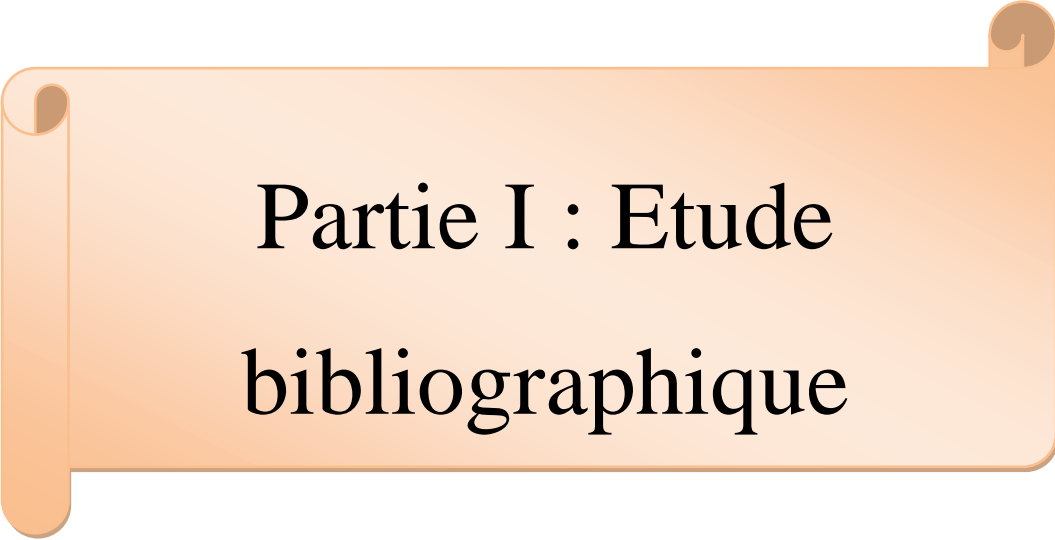
Ce travail est scindé en deux parties :

La première partie consacrée à l'étude bibliographique est divisé en deux chapitres :

1. Présentation et description botanique abordée de l'espèce étudiée (*S. marianum*).
2. Généralité sur le lait et le fromage frais et la coagulation du lait à partir des fleurs des *S. marianum*.

La deuxième partie est une étude expérimentale composée de 3 volets :

1. Dosage spectrophotométrique :
 - Dosage de poly-phénol, flavonoïdes, protéine, tannin.
 - Activité antioxydante (DPPH, FRAP, TCA).
2. l'optimisation par plans d'expériences.
3. Une conclusion synthétisera l'ensemble des résultats obtenus et évoquera les limites et les perspectives notre travail.

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring rounded corners and a shadow. The scroll is unrolled in the center, with the text positioned on the flat surface.

Partie I : Etude
bibliographique



Chapitre I

1. Généralités

Silybum marianum L. Gaertner, également connu comme chardon-Marie, lait béni chardon, chardon marial, chardon marie, ou chardon de sainte marie, est une plante annuelle ou bisannuelle de la famille des Asteraceae. Originaire du sud de l'Europe et en Asie, mais s'est répandu dans le monde entier. Chardon-Marie, dans sa forme native, est considéré comme une mauvaise herbe. Pourtant, la plante présente de nombreux avantages pour la santé, et c'est la raison pour laquelle, actuellement, le chardon-Marie est cultivé comme plante médicinale. Cette plante est non seulement l'un des plus cultures médicinales importantes en Europe, mais est également l'une des cultures importantes Amérique du Nord (**Karkanis et al., 2011**). Les produits dérivés de cette plante sont très populaire; ils sont sécuritaires, bien tolérés et ne causent pas d'effets secondaires (**Csupor et al., 2016**). Depuis quelques années, les suppléments de chardon-Marie sont régulièrement classés parmi les produits les plus vendus, et cette tendance continuer car ses propriétés hépato-protectrices sont uniques (**Smith et al., 2015**).



Figure 1. *Silybum marianum* (photo original)

2. Systématique

Selon Deysson, 1979 ; Anonyme, 1984 ; Guignard, 1998 ; Spichigeret *al*, 2000, la systématique du chardon-Marie est comme suit :

- Embranchement : Phanérogames.
- Sous-embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida.
- Ordre : Asternales.
- Famille : Asteraceae.
- Sous-famille : Tubuliflores.
- Genre : *Silybum*.
- Espèce : *Silybum marianum*(L) Gaerthn

3. Nomenclatures

a. Nom vernaculaire français : chardon marie, chardon argenté, chardon Notre-Dame , chardon marbré, épine blanche, lait de notre dame, Silybe de marie.

b. Nom vernaculaire arabe : chouk el djemel, Bou – Zeroual, Haçoub, lichlich, chouk.

c. Nom vernaculaire berbère : Ttaoura, Douj-n'ilour man.

4. Origine et habitat

Le chardon-Marie est originaire du Cachemire (Inde), de l'Europe méridionale, de la Russie méridionale, de l'Afrique du Nord et de l'Asie mineure. Il a été introduit dans la plupart des régions d'Europe, d'Amérique du Nord et du Sud et d'Australie méridionale et cultivé principalement dans des sols rocheux secs de pays européens, Australie, Canada, Chine, Amérique du Nord et du Sud comme plante médicinale.

En Algérie *Silybum marianum* est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la

Steppe, le sud de l'Atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides (Quézel et Santa, 1963).

En générale *Silybum marianum* habite dans champs, terrains incultes, décombres, bord des routes, commun partout dans le Tell. (Beniston,1984).

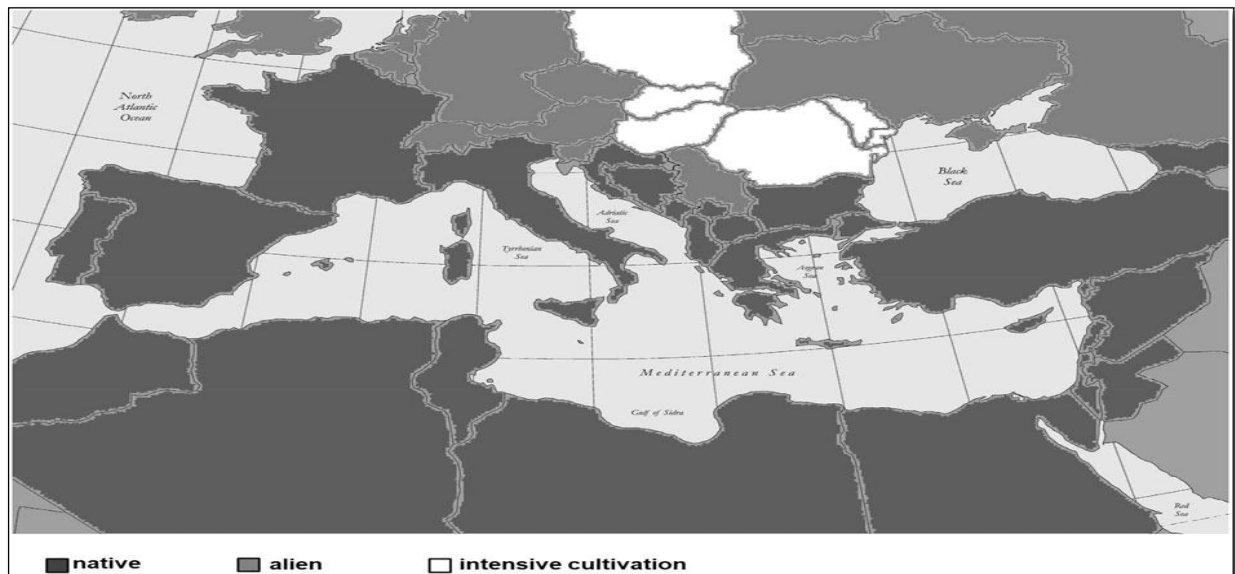


Figure 2: Distribution de *Silybum marianum* dans le Méditerranéen et l'Europe.

(Moayedi Esfahani et al., 2015)

5. Description Botanique de la plante

Plante généralement bisannuelle, à tiges non-ailées, atteignant environ 1.50m de haut. Feuilles vertes tachées de blanc, les basales grandes, pétiolées, découpées en lobes à bordes dans épineux, les supérieures réduites et embarrassantes, à bords moins découpés, mais très épineux

Fleurs toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6 cm de diamètre .Involucre à nombreuses bractées, dont la plupart sont pourvues d'une forte épine atteignant jusqu'à 5 cm. Corolle dentée de couleur pourprée. 5 étamines formant un tube autour du style. Fruits: akènes à aigrette. (Beniston,1984).

Les graines sont noires, luisantes plus ou moins marbrées de jaunes. (Abdelkader Beloued,2003).

6. Description morphologique

a. Tiges

Le chardon-Marie a une tige de 40–200 cm de haut, glabre ou légèrement duveteuse, dressée et ramifiée (Montemurro et al., 2007) dans la partie supérieure de la plante.



Figure3 : Tige de chardon Marie (photo originale)

b. Feuille

Les feuilles basales sont alternes, grandes et glabres avec des marges épineuses. Les feuilles peuvent mesurer 50–60 cm de long et 20–30 cm de large. Les veines blanches comme du lait constituent une caractéristique distinctive du chardon-Marie (Gresta et al., 2007). Les feuilles de la tige sont plus petites.



Figure4 : Feuille de chardon marie (photo originale)

c. Fleurs

Elles sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6cm de diamètre, dont la plupart sont pourvues d'une forte épine atteignant jusqu'à 5cm et se réfléchissant vers l'arrière (Guittonneau et Huon, 1983 ; Caremes, 1990). La corolle est dentée de couleur pourprée, 5 étamines formant un tube autour du style (Guignard, 1998).



Figure5 : Fleurs de chardon Marie **A** : fraîches **B** : sèches

d. Racines

La plante est caractérisée par une racine pivotante, forte, longue, épaisse et fibreuse (Sindel, 1991 ; Vincent, 1999-2000).



Figure6 : Racine de chardon marie (photo originale)

c. Graine

Les graines sont des akènes de 5–8 mm de long, avec un long Pappus blanc et une couleur allant du noir au brun. Le poids de 1000 graines de chardon-Marie est de 28 à 30 g (Andrzejewski et al., 2011). Chaque capitule produit environ 190 graines, avec une moyenne

de 6350 graines par plante (**Dodd, 1989**). Dans le sol, les semences peuvent rester viables jusqu'à neuf ans (**Sindel, 1991**). Les graines montrent peu ou pas de dormance.



Figure7 : Graines de chardon Marie : **A**: libres **B** : attachés avec leurs aigrettes

7. Climat et sol

Le chardon-Marie est très adaptable à de nombreuses conditions de croissance (**Andrzejewski et al., 2011**) ont signalé que dans une région où les précipitations totales pendant la période de croissance du chardon-Marie étaient de 180 mm, les rendements en graines de chardon-Marie variaient de 550 à 1680 kg ha⁻¹ et les niveaux de silymarine de 13,3 à 35,4 kg ha⁻¹. Les plantes de chardon-Marie développent un système racinaire fort et peuvent donc être cultivées dans des sols légers avec des déficits en eau périodiques.

Le chardon-Marie est cultivé avec succès sur différents types de sol, des sols sableux aux sols argileux beaucoup plus lourds. Le chardon-Marie tolère une large gamme de pH, mais pousse bien dans les sols de pH compris entre 5,5 et 7,6 (**Andrzejewski et al., 2011; Haban et al., 2009; Hadi et al., 2008**) avec suffisamment de nutriments et salinité de 15 DS m⁻¹, et produit des graines riches en principes actifs. Par conséquent, cultiver le chardon-Marie dans un sol moins fertile et dans des conditions de salinité modérée pourrait être important non seulement pour servir de culture de couverture contre l'érosion du sol, mais également pour produire des semences d'une plus grande valeur à des fins médicinales (**Ghavani et Ramin, 2008**).

8. Croissance du chardon-Marie

En tant que plante sauvage, le chardon-Marie est une plante herbacée annuelle à bisannuelle. Plante (**Gresta et al., 2007**). En Méditerranée, ont signalé que l'émergence des plantes au début hiver et forme de grandes rosettes à partir de 20 à 250 cm taille plus tard grandi. En culture, le chardon-Marie est cultivé comme un annuel. Le chardon-Marie peut compléter un cycle de vie annuel s'il peut germer tôt dans la saison de croissance. Le modèle de croissance

de *Silybum* peut être divisé en quatre étapes : germination, période de croissance, floraison et la maturité de la graine. La première étape comprend la germination et établissement ; la seconde, la croissance végétative ; le troisième, floraison, pollinisation et fertilisation ; et le quatrième, croissance et remplissage des graines.

La phase végétative peut être divisée en deux étapes : la rosette stade et élongation de la tige. La germination a lieu à la fin de l'automne et printemps ; la floraison se produit quand il reçoit un stimulus de basses températures. La plante produit alors des graines et meurt. Chardon-Marie hiverne sous forme de rosette. Au stade de croissance de la rosette, la tige reste comprimée et proche de la surface du sol. Comme floraison est initiée, la tige s'allonge en produisant une tige de fleur dressée. Les fleurs se forment d'avril à mai. Les graines sont mûres en juillet. (**Montemurro et al., 2007**).

9. Les composants chimiques

Les effets thérapeutiques du chardon-Marie sont liés à la présence de groupe de composés, classés comme flavonolignanes, communément appelés silymarine. Le terme, silymarine, a été introduit à l'origine par (**Wagner et al., 1965**) décrire le mélange contenant quatre flavonolignanes: silybine, isosilybine, silychristine et silydianine. Plus tard, le mélange a été résolu en isomère silychristine, silydianine et deux groupes de flavonolignanes dia stéréo isomères, silybine A et silybine B ainsi que et de l'isosilybine A et de l'isosilybine B (**Kim et al., 2003**). Les isosilybines A et B sont des régi isomères de silybine A et B, respectivement.

Les structures chimiques de six composés sont illustrées à la figure :

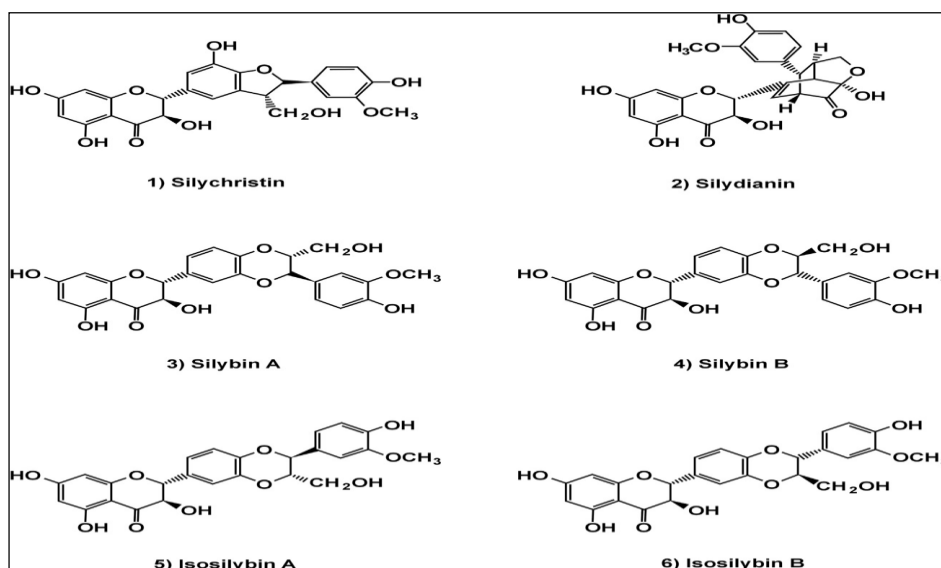


Figure 8: Structures des principaux constituants de la silymarine.

De nos jours, le terme silymarine est utilisé pour indiquer un extrait standardisé obtenu à partir de graines de *Silybum marianum*. En général, l'extrait est normalisé à une concentration de 70% e80% de flavonolignanes. Silybine A et B est son principal composant, qui comprend 50% e70% de silymarine. Graines matures de *S. marianum* ne contient pas moins de 1,5% à 2% de silymarine et 20% à 35% Les acides gras.

*Principaux composants des grains

*Flavonolignanes (1,5 à 3 %), dont le mélange, isolé en 1968 et baptisé « silymarine », est essentiellement localisé dans la partie corticale. Les composants de la silymarine sont des chromanones particulières, qui résultent de la cycloaddition d'un alcool phénylpropanique sur une 2-phényl-chromanones (2,3-dihydroflavo-nol = taxifoline). On distingue :

*silybine : constituant majoritaire, qui est un benzodioxane, mélange diastéréoisomérique

*silydianine :(oxatricycloécène)

*silychristine et isosilychristine : à structure dihydrobenzofuranique ;

–Autres composés : présents dans la variété à fleurs blanches : des dérivés dépourvus de l'hydroxyle en 3 : la silandrine (3-désoxyiso-silybine), la silymonine (3-désoxysilydianine).

•Flavonoïdes : quercétol, taxifoline, ériodyctiol, chrysoériol, naringine, kaempféroldihydro-kaempférol, apigénol, naringétol ...

- Dérivés phénoliques : 5,7-dihydroxychromones, alcool dihydrodicoumarilyle.
- Huile grasse : (20 à 30 %), concentrée en acides gras insaturés : acides linoléique (60%) oléique (30 %) et palmitique (9 %).
- Tocophérol ou vitamine E (0,038 %).
- Stérols : cholestérol, stigmasterol, sitostérol...
- Divers composés : bétaine, tyramine, histamine, polyènes, protéines et mucilages. (**Carillon; Charrié; Cieur; Saigne, 2017**)

10. Les activités de chardon Marie

a. Activité antioxydant

Il a été rapporté que la silymarine agissait comme un excellent antioxydant, piégeant les radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène) et inhibant la peroxydation des lipides, protégeant ainsi les cellules contre le stress oxydatif. Il augmente les systèmes de défense antioxydants non enzymatiques et enzymatiques des cellules impliquant une réduction du glutathion, du superoxyde dismutase et de la catalase. Il peut protéger le foie, le cerveau, le cœur et d'autres organes vitaux contre les dommages oxydatifs en empêchant la peroxydation des lipides et en reconstituant les niveaux réduits de glutathion. La silibinine présente des propriétés protectrices de la membrane et peut protéger les constituants du sang contre les dommages oxydatifs (Das *et al.*, 2008; Kshirsagar *et al.*, 2009).

b. Activité hépatoprotectrice

L'utilisation de graines de chardon-Marie comme agent de protection du foie remonte à 1AD. L'activité antioxydant est l'un des facteurs importants de l'hépatoprotection.

- **Potentiel anti-hépatotoxique :** La silymarine protège les cellules du foie contre de nombreuses hépatotoxines chez l'homme et chez l'animal. Certains champignons (par exemple, *Amanita phalloides*, le champignon de la coupelle mortelle et *A. virose*) contiennent deux toxines, la phalloïdine et l'a-amanitine, qui détruisent la membrane cellulaire des hépatocytes et bloquent la synthèse des protéines hépatiques, entraînant de graves lésions du foie et la mort.

La silymarine prévient efficacement ces deux effets en bloquant les sites de liaison de la toxine et en augmentant la capacité de régénération des cellules du foie. La silibinine s'est révélée être une mesure efficace contre les dommages au foie si elle était administrée par voie intraveineuse dans les 24 heures suivant l'ingestion de champignon. Dans une étude, 60 patients présentant une intoxication grave par *Amanita* ont été traités avec des perfusions de 20 mg / kg de silibinine avec d'excellents résultats, ne montrant aucun décès chez les patients traités. La silymarine est souvent utilisée comme traitement de soutien en cas d'intoxication alimentaire due à des champignons (Desplaces *et al.*, 1975; Vogel *et al.*, 1984).

La silymarine offre également une protection du foie contre les lésions hépatiques induites par la tétracycline, la D-galactosamine et le thallium, ainsi que par l'estolate d'érythromycine,

l'amitryptiline, la nortryptiline et l'hydroperoxyde de tert-butyle des hépatocytes néonataux. Il réduit les dommages au foie dus à un traitement prolongé à la phénothiazine ou au butyrophénone. La silibinine inhibe de manière significative l'atteinte hépatique induite par la concanavaline A. Il fournit également une héparoprotection contre les intoxications par la phalloïdine, l'halothane, le thioacétamide, l'acétaminophène et le tétrachlorure de carbone, et protège le foie contre les lésions ischémiques, la surcharge en fer et les radiations (**DerMarderosian, 2001; Kshirsagar et al., 2009**).

La silymarine est utilisée pour le traitement de plusieurs maladies du foie caractérisées par une nécrose dégénérative et une déficience fonctionnelle, y compris des troubles chroniques du foie. La Commission allemande E approuve l'utilisation de la silymarine dans le traitement des maladies du foie, y compris l'hépatite A, la cirrhose alcoolique et l'hépatite d'origine chimique (**Barceloux, 2008**).

- **Maladie alcoolique du foie / cirrhose :** Le métabolisme de l'éthanol implique la formation de radicaux libres, entraînant un stress oxydatif dans le foie. La silymarine s'oppose avec succès à la cirrhose alcoolique, ses mécanismes antioxydants et hépatoprotecteurs rétablissant les paramètres biochimiques normaux du foie. La silymarine améliore également la cytolysabilité chez les patients atteints de cirrhose en activité. Cependant, l'utilisation de la silymarine est déconseillée dans la cirrhose décompensée (**Ferenci et al., 1989**).
- **L'hépatite :** Chez les patients atteints d'hépatite virale aiguë, la silymarine raccourcit la durée du traitement et montre une amélioration des taux sériques de bilirubine et de foie sérique. Les valeurs biochimiques sont rétablies plus rapidement à la normale chez les patients traités par la silymarine. Dans le traitement de l'hépatite chronique active, le traitement à la silymarine améliore les tests de la fonction hépatique. Une amélioration histologique est observée chez les patients atteints d'hépatite chronique traités avec la silymarine. Elle provoque une rémission stable de l'hépatite alcoolique, normalisant les paramètres biochimiques du foie (**Magliulo et al., 1978**).
- **Fibrose hépatique :** La fibrose hépatique peut entraîner un remodelage de l'architecture hépatique, entraînant une insuffisance hépatique, une hypotension portale et une encéphalopathie hépatique. La conversion de cellules étoilées hépatiques en myofibroblastes est considérée comme un événement central de la

fibrogenèse. Le traitement à la silymarine inhibe nettement ce processus chez les patients atteints de fibrose hépatique et présente un potentiel antifibrotique (Kshirsagar et al., 2009).

- **Régénération des tissus du foie :** La silymarine stimule la régénération du tissu hépatique en augmentant la synthèse des protéines dans le foie lésé. Dans des expériences in vivo et in vitro menées sur des rats dont une partie de l'organe (le foie) a été prélevée, la silibinine entraîne une augmentation significative de la formation de ribosomes et de la synthèse de l'ADN, ainsi qu'une augmentation de la synthèse des protéines. Fait intéressant, l'augmentation de la synthèse des protéines est induite par la silibinine uniquement dans les foies blessés et non dans les foies en bonne santé (Kshirsagar et al., 2009).

c. Activité anti-inflammatoire

Les graines de chardon-Marie et son extrait actif, la silymarine, ont des effets anti-inflammatoires et anti-arthritiques en raison d'excellentes propriétés anti-oxydantes, des radicaux libres épurateurs agissant en tant qu'agents pro-inflammatoires. La silymarine s'est avérée plus efficace dans les cas d'arthrite en développement que dans l'arthrite développée. La silymarine et la silibinine entravent le processus inflammatoire en inhibant la migration des neutrophiles et l'inhibition des cellules de Kupffer. Ils inhibent également la formation de médiateurs inflammatoires, en particulier de prostaglandines et de leucotriènes (en inhibant la voie de la 5-lipoxygénase) et de la libération d'histamine par les basophiles. Par conséquent, les graines de chardon-Marie peuvent posséder des activités antiallergiques et antiasthmatiques (Fiebrich et Koch, 1979; Dixit et al., 2009).

d. Activité immun-modulatrice :

L'activité immunomodulatrice de la silymarine chez les patients atteints d'une maladie du foie peut également être impliquée dans son action hépatoprotectrice. Il a été démontré que la silymarine protège les rongeurs expérimentaux de l'immunosuppression induite par les rayons ultraviolets (Meeran et al., 2006). La silibinine inhibe l'activation des LT humains et des leucocytes polymorphonucléaires humains. La silymarine inhibe de manière significative les médiateurs inflammatoires, l'expression des molécules du complexe d'histocompatibilité et les lésions des cellules nerveuses. L'administration à long terme améliore l'immunité en augmentant le nombre de LT et d'interleukines et en réduisant tous les types

d'immunoglobulines. La silymarine pourrait être utile dans le développement d'un adjuvant thérapeutique dans lequel l'immunosuppression est requise, y compris les maladies auto-immunes et infectieuses (**DerMarderosian, 2001; Das et al., 2008**).

e. Activité antifibrotique

La capacité de la silymarine à bloquer la fibrose hépatique a été démontrée pour la première fois dans une étude chez le rat soumis à une occlusion complète des canaux biliaires.¹⁹ Cette action a ensuite été démontrée dans une étude ouverte, étude non contrôlée de 998 patients présentant une maladie du foie due à divers facteurs, notamment: abus d'alcool, hépatite B ou C chronique active, drogues et exposition à des produits chimiques.²⁰ Utilisation de 140mg de silymarine (équivalent à environ 60 mg de silibinine) trois fois par jour pendant trois mois ont conduit à une réduction significative du peptide pro-collagène III amino-terminal (PIIINP), un marqueur de fibrose. Chez 19% des patients, cette mesure était revenue à la normale attendue pour une personne en bonne santé.

f. Activité anticancéreuse :

La silymarine et ses composés isolés montrent *in vitro* et *in vivo* une action large sur la prévention et la progression de divers cancers. En plus de leurs propriétés antioxydants et anti-inflammatoires, leur action est médiée par des mécanismes interférant avec les processus de signalisation, prolifération, apoptose, transition épithéliale amésenchymale, invasion, métastase ou angiogénèse et, peut-être en partie, par modulation du système immunitaire.

***Potentialisation de la cytotoxicité de certains traitements anticancéreux**

La silymarine et des composés isolés augmentent l'efficacité de certains traitements anticancéreux en potentialisant leur cytotoxicité tout en réduisant simultanément, parfois, leur toxicité sur les tissus sains. Des études réalisés *in vitro* sur différents types cellulaires montrent une synergie de la silymarine avec divers anticancéreux (témozolide, étoposide, irinotécan dans le gliome, doxorubicine dans le cancer du sein). On constate également un effet synergique additif au niveau de la réponse de cellules cancéreuses de vessie en associant la silybine à une thérapie photo dynamique. Par ailleurs, la silybine peut se révéler active sur des cellules cancéreuses résistantes à certains traitements *in vivo*, comme à l'erlotinib dans le Cancer du poumon non à petites cellules. Dans le cadre d'une approche holistique, en complément d'une prise en charge anticancéreuse, l'utilisation du Chardon-Marie est

reconnue parmi les plantes les plus bénéfiques, notamment selon la liste du (Clinical practice committee of the society of integrative medicine) (**Carillon; Charrié; Cieur; Saigne-Soulard, 2017**).

11. Les Effets

a. Effet neuroprotecteur

La silymarine s'est avérée utile dans la prévention et le traitement des processus neurodégénératifs et neurotoxiques en raison de ses effets antioxydants. La silymarine peut protéger efficacement les neurones dopaminergiques contre la neurotoxicité induite par les lipopolysaccharides dans le cerveau (**Wang et al., 2002**).

b. Effet cardioprotecteur

Pendant le traitement du cancer, l'utilisation de certains agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine est limitée par la cardiotoxicité, connue pour être induite par le stress oxydatif et l'induction de l'apoptose. La silibinine a des propriétés cardioprotectrices du fait de ses actions antioxydantes et protectrices de la membrane (**Chlopeikova et al., 2004**).

c. Effet biliaire

La silymarine subit une circulation entérohépatique excessive, ce qui permet une boucle continue entre l'intestin et le foie. Il empêche la perturbation de la sécrétion de bile, augmentant ainsi la bile sécrétion et l'excrétion de cholate et de bilirubine (**DerMarderosian, 2001**).

d. Effet antiviral

Bien que la silymarine n'affecte pas la réplication virale, elle joue un rôle bénéfique dans le traitement de l'hépatite virale. Par son action inhibitrice sur les processus inflammatoires et cytotoxiques induits par le virus infection. La silibinine inhibe fortement la croissance des deux virus HepG2 (virus de l'hépatite B négatif; p53 intactes) et les cellules Hep3B (virus de l'hépatite B positif; p53 mûri), avec relativement plus de Graines de chardon-Marie en bonne santé cytotoxicité dans les cellules Hep3B, associée à l'induction de l'apoptose. Silymarine aussi a montré une activité inhibitrice contre d'autres virus dans différentes lignées cellulaires (**Das et al., 2008**).

e. Effets antitumoraux et anticarcinogènes

La silymarine inhibe significativement la croissance tumorale et provoque également la régression des tumeurs établies. Il est associé à une efficacité *in vitro* antiproliférative, pro-apoptotique et anti-angiogénique chez tumeurs de la prostate. Silymarine pendant la phase de promotion de la 4-nitroquinoléine-1-oxyde induite la tumorigenèse de rat exerce une activité chimio-préventive contre les cellules épidermoïdes de la langue carcinome. Les effets chimiopréventifs et anti-cancérogènes du cancer de la silymarine sur le long terme modèles de tumorigenèse chez l'animal et dans les cellules de carcinome de la prostate, du sein et du col utérin humaines également rapporté. Le traitement par la silibinine entraîne une inhibition hautement significative des deux cellules croissance et synthèse de l'ADN, avec perte de viabilité cellulaire dans le cas de cellules de carcinome cervical (**Das et al., 2008; Dixit et al., 2009**).

Il est bien démontré que l'immunosuppression induite par la lumière ultraviolette et le stress oxydatif jouent un rôle important dans l'induction des cancers de la peau. Administration topique ou alimentaire de la silymarine à la peau de souris empêche la photo carcinogénèse en induisant significativement l'apoptose, et augmentation de l'activité de la catalase et induction de la cyclo-oxygénase et de l'ornithine décarboxylase activité. Des résultats similaires sont également obtenus dans d'autres cancers de la peau induits par la chimie des modèles. Prévention de l'immunosuppression et du stress oxydatif induits par la lumière ultraviolette par la silymarine peut être associée à la prévention de la photo carcinogénèse (**Katiyar et al., 1997**). La silibinine induit de manière significative une inhibition de la croissance, un arrêt du cycle cellulaire modéré et une forte mort cellulaire apoptotique dans les cellules de carcinome du poumon humain à petites cellules et non à petites cellules. Silibinine inhibe la croissance des cellules cancéreuses de la prostate humaine *in vitro* et *in vivo*. Silymarine et silibinine ont de puissants effets anti-angiogénèse sur la lignée cellulaire du cancer du côlon et sont efficaces contre la carcinogénèse vésicale induite par un produit chimique chez la souris et le carcinome hépatocellulaire chez le rat (**Das et al., 2008**).

f. Effet préventif protecteur

L'effet préventif protecteur de la silymarine vis-à-vis de l'induction tumorale a été mis en évidence dans le cancer de la peau provoqué par des radiations UV ou chimiquement induit. L'application locale de silybine montre un effet préventif sur la formation de tumeurs

cutanées induites chimiquement chez la souris, grâce à la stimulation des mécanismes cytoprotecteurs endogènes, suppression du stress oxydatif et dérégulation de l'activation de médiateurs pro-inflammatoires et de la carcinogénèse. On observe également un effet préventif vis-à-vis d'une tumeur de la prostate chimiquement induite. L'effet antiprolifératif de la silymarine observé *in vitro* sur de nombreux types cellulaires humains (prostate, sein, ovaire, poumon, peau, côlon, foie, rein...) se traduit par une perte de la viabilité cellulaire, une inhibition de la croissance des cellules tumorales par inhibition de voies de signalisation (Notch, Wnt/LRP6...) impliquées dans les processus d'autophagie et d'apoptose, la prévention de l'apparition de métastases. Administrées *in vivo* par voie orale chez l'animal sur différents modèles de cancers (sein, colorectal, mélanome, prostate...), la silymarine ou la silybine reproduisent ces effets avec une réduction du volume des tumeurs, une diminution de l'expression de bio-marqueurs de prolifération ou d'angiogénèse tumorale, parfois une prolongation de la survie. La silymarine interfère avec l'expression de régulateurs du cycle cellulaire et de protéine impliquée dans l'autophagie ou l'apoptose et intervient donc dans la modulation de l'équilibre entre survie et mort cellulaire. Au niveau moléculaire, différents mécanismes pro-apoptotiques ont été mis en évidence:

- Mort cellulaire par autophagie *via* un dysfonctionnement mitochondrial ROS-dépendant (Réduction du potentiel de membrane) et libération de cytochrome C.
- Déplétion en ATP liée à la stimulation de l'expression d'une protéine pro-apoptotique (cellules de cancer du sein MCF7).
- Suppression de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B, AP-1 et STAT3 (silybine et dérivé 2,3-déhydrosilybine sur cellules tumorales baso-cellulaires murines ou mélanomes) Par inhibition de l'activité kinase de (MEK)-1/2 et RSK-2 et blocage des voies de signalisation médiées par ces kinases.
- Augmentation du taux de protéines pro-apoptotiques (Bax), activation des caspases 9 et 3 (pro-apoptotiques) et diminution des taux de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x1) *in Vitro* dans des cellules de cancer de l'ovaire, de mélanome humain, ou du pharynx.
- Sur cellules Hep-2 de cancer laryngé, la silybine induit l'apoptose *via* une réaction de stress oxydatif (production de radicaux libres oxygénés dans les cellules) et par régulation négative de l'expression de survivine. (Carillon; Charrié; Cieur; Saigne-Soulard, 2017)

g. Effet secondaires, contre-indications, toxicité

1. Toxicité : aucune toxicité aiguë, subaiguë ou chronique connue (même après administration de 20 g/kg de silymarine per os chez la souris).

Le Chardon-Marie est considéré comme non toxique aux doses généralement préconisées.

Pour rappel, la silymarine est prioritairement excrétée par la bile sous forme de sulfo- et glucuroconjugués (20 à 40 % en 24 heures) et par le rein (3 à 7 %) sans aucune accumulation.

2. Effets secondaires et contre-indications selon l'approche clinique intégrative :**► Effets secondaires**

- Rares troubles gastro-intestinaux légers : nausées, diarrhées légères et passagères.
- Possible réaction d'hypersensibilité chez les sujets allergiques aux Astéracées, œdème, prurit.

► Contre-indications

- La plante est contre-indiquée chez les sujets allergiques aux Astéracées.
- On ne doit pas l'utiliser en phase aiguë de migration d'un calcul biliaire

(Carillon; Charrié; Cieur; Saigne-Soulard, 2017)



Chapitre II

I. Le lait

I.1 Définitions

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β carotènes. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre.

En 1909, le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes, comme étant le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum. (**Goursaud, 1985**)

La réglementation européenne réserve la dénomination "lait" exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ou soustraction. S'ils ne proviennent pas de l'espèce bovine, l'origine du lait et des produits laitiers doit être spécifiée : lait/fromage de chèvre, lait/fromage de brebis. (**David et Forte, 1998**)

I.2 Composition du lait

La composition du lait est caractérisée par une grande complexité dans la nature et la forme de ses composants ; ceux-ci sont particulièrement adaptés aux besoins nutritionnels et aux possibilités digestives du jeune animal qui y trouve tous les éléments nécessaires à sa croissance (**Cayot et Lorient, 1998**).

Les principales compositions du lait sont : Les lipides (triglycérides), les protéines (caséines, albumines, globulines), les glucides essentiellement le lactose, les sels (sels d'acide phosphorique, sels d'acide chlorhydrique, etc.) (**Larpen, 1997**). Et il contient également des anticorps, des hormones et peut parfois contenir des résidus d'antibiotiques (**Vilain, 2010**).

Tableau 1 : Composition globale du lait de vache (**Vignola, 2002**)

Constituants Majeurs	Variation limites (o/o)	Valeurs moyennes (o/o)
Eau	85.5 – 89.5	87.6
Matières grasses	2.4 – 5.5	3.7
Protides	2.9 – 5.0	3.2
Glucides	3.6 – 5.5	4.6
Minéraux	0.7 – 0.9	0.8
Constituants mineurs	Vitamines, enzymes, Pigments	Cellules diverses, gaz

D'autres constituants sont présents mais en quantité minime. Cependant, certains d'entre eux, du fait de leur activité biologique, revêtent une grande importance. Ce sont :

- Les enzymes : peroxydase, catalase, phosphatase.
- Les vitamines : facteurs A, D, C, B1, B2, B6, B12...etc.
- Les nucléotides
- Les lécithines : phosphate, lipide
- Les éléments cellulaires : cellules épithéliales, leucocytes...etc.

Outre, ces constituants, le lait renferme aussi des micro-organismes en quantité variable suivant l'état de santé de la femelle laitière, de l'hygiène de la traite et des manipulations diverses subies par le fermier (Alais, 1984)

I.1.1 Caractéristiques physico-chimiques du lait :

Le lait est un liquide blanc mat, légèrement visqueux, dont la composition et les caractéristiques physico-chimiques varient sensiblement selon les espèces animales, et même selon les races (Rahali et Ménard, 1991 ; Soryal et al., 2004).

Tableau2 : Caractéristiques physicochimiques du lait de vache (FAO, 1998).

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Energie (Keal/Litre) (MJ/Litre)	701	587-876
	2930	2454-3662
Densité du lait entier à 20c°	1.031	1.028-1.033
Densité du lait écrémé	-	1.036
Densité du la matière grasse	-	0.954-0.96
PHà20c°	6.6	6.6-6.8
Acidité titrable (Dornic)	16	15-17
Point de congélation (c°)		(-0.520)-(-0.550)
Viscosité du lait entier à 20c °(centipoises)	2.2	-
Viscosité du lait entier à 25°c (centipoises)	1.8	1.6-2.1
Viscosité du lait écrémé à 20°c (centipoises)	1.9	-
Point d'ébullition	-	100.17-100.15

II. Le fromage

II.1 Définition

La dénomination « fromage » est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir de matières d'origine exclusivement laitière, utilisées seules ou en mélange, et coagulées en totalité ou en partie avant égouttage ou élimination partielle de l'eau (**décret n°88-1206 du 30/12/1988**).

Un fromage est un aliment obtenu à partir de lait coagulé ou de Produits laitiers comme la crème puis d'un égouttage suivi ou non de fermentation et éventuellement d'affinage (fromage affinés). IL est fabriqué à partir de lait de vache principalement mais aussi de brebis, de chèvre ou de bufflonne. Le lait est acidifié, généralement à l'aide d'une culture bactérienne, une enzyme, la présure, ou un substitut comme acide acétique ou du vinaigre est ensuite adjointe afin de provoquer la coagulation et former le lait caillé et le petit- lait. Certains fromages comportent de moisissure soit sur la croûte externe, soit à l'intérieur, soit sur la croûte et à l'intérieur (**Majdi, 2009**).

II.1.1 Le fromage frais

Le fromage frais est un fromage à pâte molle non affiné qui possède un goût crémeux ou acide peu prononcé, issu d'une culture à base d'acide lactique et de bactéries spécifiques. Le fromage frais est facile à tartiner et à mélanger à d'autres aliments (**Vignola, 2002**).

II.1.1.1 Classification du fromage frais

Les fromages frais présentent une grande diversité selon le degré d'égouttage du coagulum et la teneur en matière grasse du lait mis en œuvre.

D'après Schaw. (1986) les fromages frais sont caractérisés par :

- un caillé non pressé et une teneur élevée en eau ;
- une faible sensation acide ;
- une durée de conservation courte ;
- un produit à consommer sans période de maturation (**Mahaut et al., 2000**).

Selon le mode d'égouttage il existe deux catégories de fromages frais :

- Les fromages blancs moulés en faisselle ou fromage type « compagne » : issus d'un égouttage lent. Ils se caractérisent par une texture hétérogène en morceaux et ils sont généralement moulés à la louche.

- Les fromages blancs battus : issus d'un égouttage rapide, ils présentent une texture lisse et onctueuse, ils peuvent être additionnés de sucre, de sel, de fruits, d'épices ou d'herbes aromatiques (**Poillot, 2010**). Ils subissent des cisaillements mécaniques qui homogénéisent la pâte, ce qui a pour effet de rendre la texture plus lisse, tels que le fromage blanc, les petits suisses, et le demi-sel (**Goudédranche et Camier-Ca, 2001**).

II.1.1.2 Généralités sur la fabrication du fromage frais

Les étapes de la fabrication du fromage frais sont :

1. Préparation du lait avant la fabrication du fromage

Le lait est refroidi dès la traite dans des cuves réfrigérées. Généralement, les traites de 2 à 3 jours y sont accumulées et conservées à 3-4 °C.

Pour préparer le lait sur les plans microbiologique et physicochimique, plusieurs opérations sont effectuées (**Sindic et al., 2006**).

1.1. Filtration et refroidissement du lait à la réception

La filtration du lait s'effectue au moyen des filtres qui permettent de retenir les impuretés du lait (**Dossou et al., 2006**).

Le lait subit ensuite un refroidissement à environ 4°C, cette opération a pour but de conserver la qualité du lait et de ralentir la prolifération des espèces bactériennes présentes, essentiellement la flore mésophile lactique, responsable de l'acidification du lait et la flore pathogène (**Goudédranche et Camier-Ca, 2001**).

Après le refroidissement, le lait est stocké au maximum pendant 18 à 24h à 4°C à l'usine pour empêcher sa détérioration hygiénique et nutritionnelle.

1.2. Le chauffage du lait

En fabrication fromagère, le lait subit une thermisation à une température de 60 à 65°C, au moyen d'un échangeur à plaques, dans le but de réduire le nombre des germes totaux (**Vignola, 2002**).

1.3. Standardisation et écrémage

En industrie laitière, la standardisation consiste à produire le lait avec une teneur en matière grasse définie. L'opération se fait en deux étapes, dans la première, il y a séparation

de la crème et du lait écrémé par une centrifugeuse à disque (écrémeuse). La force centrifuge permet, en même temps, la clarification du lait. Il y'aura ainsi un circuit lait écrémé et un circuit crème qui vont être mélangés ensemble à nouveau (**Vignola, 2002**).

1.4. Pasteurisation du lait

Le lait standardisé en matière grasse subit un traitement thermique intense à 95 °C pendant 1 à 5 min à l'aide des pasteurisateurs à plaques, afin d'améliorer la qualité technologique du produit fini par destruction des germes hétéro fermentaires indésirables ainsi que la qualité hygiénique par élimination des pathogènes (**Mahaut et al., 2000**).

2. Technologie de fabrication

2.1. Coagulation

La coagulation est à dominance acide, elle est obtenue en induisant une forte acidification grâce à un ensemencement par des bactéries lactiques dont la prolifération est favorisée en ajustant la température à l'optimum de développement (18 à 28°C) et en prolongeant le temps d'incubation. Dans le même but une enzyme coagulante (la présure) est ajoutée, mais son rôle est limité en raison de la faible concentration utilisée (1 à 5 ml/ 100 l de lait) et de la température peu favorable à son utilisation (**Eck et Gillis, 2006**). Une quantité de chlorure de calcium en solution est ensuite ajoutée, afin de réduire le temps de floculation et d'accroître la fermeté du coagulum. Le coagulum est ensuite brassé dans la cuve de maturation (**Gouedranche et Camier-Ca, 2001**).

Durant la coagulation, le pH influence sur le temps de floculation et la fermeté du gel. Lorsque le pH est abaissé au-dessous du pH du lait, le temps de floculation devient plus court et le gel plus ferme. En revanche à $\text{pH} > 7$, l'enzyme coagulante sera inactivée, il n'y a plus de coagulation (**Eck et Gillis, 2006**).

2.2. Traitement thermique

Le coagulum subit un traitement thermique à 55°C. Ce traitement a pour but de favoriser les réactions dans le coagulum et de favoriser l'expulsion du sérum.

2.3. L'égouttage

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

2.4. Refroidissement

Le caillé maigre obtenu est collecté dans une gouttière, il est pompé vers un refroidisseur où sa température est abaissée de 28 °C à 4 °C, il peut être conditionné directement où être enrichi en matières grasses au niveau d'un mélangeur de crème pasteurisée (**Eck et Gillis, 2006**).

2.5. Traitement de la crème fraîche

La crème fraîche séparée du lait écrémé est pasteurisée à 90°C pendant 10 sec dans une changeur à plaques, elle va être ensuite additionnée au caillé maigre (**Goudédranche et Camier-Ca, 2001**).

2.6. Conditionnement

L'emballage est nécessaire pour protéger le fromage contre la contamination par des microorganismes et de la mauvaise odeur de l'environnement. Il a pour rôle aussi d'éviter la perte d'humidité.

Le conditionnement et l'emballage sont réalisés sur des lignes industrielles classiques afin d'éviter les chocs thermiques (**Jeantet et al., 2008**).

II.1..2 Transformation du lait en fromage

La transformation du lait en fromage se fait, généralement, en quatre étapes principales : la **coagulation**, l'**égouttage**, le **salage** et l'**affinage**. Selon le lait initial et les paramètres technologiques mis en œuvre au niveau de ces étapes, une grande variété de fromages peut être obtenue (**Agioux, 2003**).

- La coagulation : modification physico- chimique entraînant la formation d'un gel sous l'action d'acide lactique et/ou enzymes.
- L'égouttage : séparation d'une partie de lactosérum conduit à l'obtention du caillé.
- Le salage : incorporation du sel.

- L'affinage : transformation biochimique du caillé sous l'action des enzymes (**Brule et coll, 1997**).

II.1..2.1 La coagulation du lait

La coagulation du lait constitue une forme ancestrale de conservation des protéines, de la matière grasse ainsi que d'une partie du calcium et du phosphore, dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans presque toutes les régions du globe (**Abiazar, 2007**), en industrie fromagère, le procédé choisi pour la coagulation à un large effet sur la texture du produit fini (**Herbert et al., 1999**).

a) La coagulation enzymatique du lait

La coagulation enzymatique est assurée par un grand nombre d'enzymes protéolytiques, d'origine animale, végétale ou microbienne, ayant la propriété de coaguler le lait. Il faut aussi tenir compte de leur grande activité protéolytique non spécifique supplémentaire qui leur permet d'hydrolyser les caséines α et β avec libération de peptides (**Mietton, 1995**).

Si cette hydrolyse est trop élevée, il peut en résulter une baisse du rendement fromager, une texture molle et l'apparition de goûts anormaux. La présure est une enzyme protéolytique provenant de la caillette du veau non sevré. Cette enzyme correspond à deux fractions actives: l'une mineure (20 %), constituée par la pepsine ; l'autre majeure (80 %), est représentée par la chymosine qui est le coagulant le plus utilisé (**Eck, 1997**). En pratique, la coagulation du lait peut se caractériser par trois paramètres : le temps de floculation, la vitesse de raffermissement et la fermeté maximale du gel (**Cayot et al., 1998**). Plusieurs facteurs peuvent les influencer. Le temps de prise est inversement proportionnel à la concentration d'enzyme utilisée. Par contre, si on ajoute plus de présure au lait de fromagerie, le taux de raffermissement et la fermeté du gel augmentent. La température influe aussi sur la coagulation. En effet, au-dessous de 10°C, la gélification ne se produit pas ; entre 10 et 20°C, la coagulation est lente ; entre 30 et 42°C, elle est progressive et au-dessus de 42°C elle diminue, pour disparaître à 55°C (**Daviau et al., 2000**). Le pH, lorsqu'il descend au-dessous du pH du lait, le temps de prise est plus court, le taux de raffermissement augmente et le gel devient plus ferme et atteint un maximum entre 5,8 et 6,0. En revanche, à des pH supérieurs à 7,0, il n'y a plus de coagulation.

b) La coagulation par les extraits de plantes

La coagulation du lait peut venir de pratiques que l'on retrouve dans le monde entier, par l'emploi, non pas d'acide lactique ou d'enzymes animales, mais d'extraits végétaux (Froc, 2001). Il existe, dans divers pays, des plantes susceptibles de fournir des enzymes ayant la propriété de coaguler le lait. D'une façon générale, ces diverses préparations végétales ont donné des résultats assez décevants en fromagerie car elles possèdent le plus souvent une activité protéolytique très élevée et produisent des fromages amers (Lo Piero et al., 2002).

En Algérie l'utilisation des fleurs du chardon, de l'extrait de l'artichaut, des graines de citrouille, ou de la sève du figuier sont des pratiques connues pour la production du Jben traditionnel (Mouzali et al., 2006).

c) La coagulation par la présure

La présure (mélange de chymosine et de pepsine) est un extrait liquide ou pâteux provenant de la macération des caillettes des jeunes ruminants dans une saumure à 10% de NaCl. La chymosine est la principale enzyme de coagulation du lait présentée dans la présure. C'est une protéase acide, sécrétée sous forme de pro enzyme inactive appelée pro chymosine. L'activation de la pro enzyme en chymosine se fait spontanément dans la caquette aux pH inférieurs à 5,0 par hydrolyse de l'extrémité N-terminale de la molécule (Mahaut et al., 2000). La coagulation, provoquée par une enzyme, la présure, résulte d'un processus en trois phases. Une phase primaire ou enzymatique au cours de laquelle la caséine κ est hydrolysée spécifiquement (liaison phénylalanine méthionine (PHE105-MET106) pour former la paracaseïne et le caséine macro peptide (CMP) constitué de 65 acides aminés. Une phase secondaire pendant laquelle les micelles de caséine, dont la charge est modifiée après hydrolyse de la caséine κ , s'agrègent pour former le gel appelé caillé. Une fois le gel obtenu, la coagulation se poursuit en une phase tertiaire d'organisation et de réticulation du gel mettant en jeu les liaisons intermoléculaires, dénommée phase de durcissement en fromagerie (Ikonen, 2000).

II.1.2.2. Egouttage

L'égouttage est un phénomène dynamique qui se caractérise par la quantité de lactosérum éliminé durant le temps. En effet, il fixe les caractéristiques physiques (pH...) et chimique du caillé et par conséquent l'affinage du fromage (Weber, 1997).

Le processus d'égouttage est lié à des facteurs directs correspondant à des traitements de types mécanique et thermique, des facteurs indirects (acidification et coagulation enzymatique) et des facteurs liés à la matière première (richesse en caséine laitière, en protéines solubles et en matière grasse) (**Ramet, 1987 et 1997**).

II.1..2.3 Salage

L'incorporation de chlorure de sodium dans le fromage a trois rôles majeurs (**Gelais et al., 2002**) :

- Le drainage de la phase aqueuse libre du caillé et la formation de la croûte,
- L'action directe ou par (activité de l'eau) sur le développement des micro-organismes et l'activité des enzymes et, donc, sur la phase d'affinage.
- Action sur les micro-organismes directement en fonction de leur halo tolérance (résistance au sel),

Le Salage est réalisé, essentiellement avec du chlorure de sodium, selon deux méthodes :

- Salage à sec par saupoudrage superficiel, frottage ou incorporation dans la masse du caillé,
- Salage en saumure par immersion dans une solution de chlorure de sodium saturée.

La différence de concentration entre la phase aqueuse du fromage et la saumure provoque une diffusion du sel dans la pâte et une migration inverse de la phase aqueuse vers la saumure (**Payne et Morison, 1999., Simal et al., 2001**). En fin de salage, le sel se trouve concentré dans les couches superficielles du fromage et migre jusqu'au cœur du fromage (en raison d'un gradient de concentration) pendant l'affinage.

Les cinétiques de transfert du sel au moment du saumurage sont dépendantes de la perméabilité, du rapport surface/volume et du pH du caillé, et également de la température, du pH, et de l'agitation de la saumure (**Mahaut et al., 2000**).

Le salage représente une étape importante non seulement pour la formation de la croûte et le goût salé des fromages affinés, mais aussi parce qu'il conditionne la phase d'affinage en intervenant sur l'activité de l'eau des fromages qui régit les développements microbiens et enzymatiques, principaux agents de l'affinage (**Riahi., 2006**).

II.1..2.4 Affinage

L'affinage résulte de l'action des enzymes provenant du développement des quatre groupes des microorganismes suivants (**Amiot et al., 2002**)

- Les moisissures de genre *penicillium* (croûte fleurie et pâte persillée)

- Les bactéries aérobies de genre *brevibacterium* associées à des levures ou à des moisissures (croute lavée)
- Les bactéries productives des gaz du genre *propioni bacterium* (affinage dans la masse avec ouvertures)
- Les bactéries lactiques

Sa durée peut aller de quelques jours pour les fromages affinés à pâte molle jusqu'au quelques années pour autres fromage tel que le « wheel of Parmigiano-Reggiano » (**Katz et Weaver., 2003**).

Les **enzymes** responsables de la transformation ont trois origines : celles présentes naturellement dans le lait, les agents coagulants ajoutés et celles des différents micro-organismes bactériens, levures et moisissures (**Goudédranche et al., 1999**).

Le **lactose** est hydrolysé sous l'action de nombreux micro-organismes. La molécule, après pénétration dans la cellule du microorganisme est transformée en glucose et galactose puis dégradée par de nombreuses voies métaboliques.

La **matière grasse** subit également des transformations sous l'action des lipases d'origine naturelle du lait ou microbiennes.

Les **protéines** subissent une série de transformations qui font apparaître des fractions peptidiques de masse moléculaire de moins en moins élevée, des acides aminés libres et des composés résultant du catabolisme de ces derniers. Ces transformations participent à la formation de la texture et de l'arôme du fromage.

III. Caractéristiques des fromages

Les caractéristiques sensorielles des fromages sont une préoccupation importante des filières.

La qualité sensorielle des fromages varie en fonction de la technologie de fabrication et des caractéristiques chimiques et microbiologiques de la matière première mise en œuvre. Ces dernières dépendent elles-mêmes de nombreux facteurs d'origine génétique, physiologique, alimentaire etc. Par exemple les vaches de race normande, Brune, ou Montbéliarde produisent un lait plus riche en protéines et de meilleure aptitude fromagère que celui de vaches Holstein conduites dans les mêmes conditions (**Froc et al., 1988; Mistry et al., 2002**). Le gel obtenu après adjonction de présure est plus ferme et les rendements fromagers sont plus élevés. L'essentiel de cet effet est lié d'une part aux différences de teneurs en caséines des laits d'une race à l'autre et d'autre part à des variations du polymorphisme génétique des lacto-protéines et

en particulier à la fréquence du variant B de la caséine κ . En effet, il est maintenant bien établi que les variantes de cette caséine, dont la fréquence diffère fortement d'une race à l'autre, influencent l'aptitude à la coagulation des laits (**Grosclaude, 1988; Macheboeuf et al., 1993**).

IV. Situation de la filière lait en Algérie

Le développement du secteur agricole et agroalimentaire constitue un enjeu majeur pour l'Algérie sur le plan économique, politique et social. Le chiffre d'affaires réalisé par l'industrie agroalimentaire représente 40% du total du chiffre d'affaires des industries algériennes hors hydrocarbures (**Kaci et Sassi, 2007**). Alors comme c'est considéré comme la source principale des protéines animales, le lait reste un aliment stratégique en Algérie, mais vue la progression démographique et le taux d'urbanisation, l'Algérie reste encore loin de garantir une couverture satisfaisante par la production nationale. En effet, l'industrie laitière fonctionne essentiellement sur la base de poudre de lait et de MGLA (**Anonyme 1**)

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb. Chaque année, elle importe 60% de sa consommation de lait en poudre des pays de l'Union européenne, notamment de la Pologne et la France mais aussi de la Belgique. La suppression progressive entre 2004 et 2008 des restitutions communautaires sur les produits laitiers a entraîné une importante hausse des prix dans ces trois pays, ralentissant logiquement leurs exportations vers l'Algérie (**Anonyme 1, 2016**). Selon le Centre national de l'informatique et des statistiques des douanes (CNIS), La facture d'importation de lait (y compris les matières premières : lait en poudre, crèmes de lait et matières grasses laitières) a reculé à 399,71 millions de dollars (USD) durant les cinq premiers mois de 2016, contre 519,04 millions USD à la même période de 2015, soit une baisse de 23% (**Anonyme 2, 2015**).

D'autre part, l'Algérie est devenue en 2010 le deuxième marché étranger pour les fromages irlandais. C'est ce qu'indique l'Irish Dairy Board (l'office irlandais du lait), qui exporte des produits laitiers en Algérie depuis quinze ans. Effectivement, les Algériens sont de plus en plus friands de fromage. Ils consomment surtout du fromage fondu en portion (60 % de la consommation totale de fromage dans le pays). Aujourd'hui, les fromages fabriqués en Algérie restent peu nombreux. Il s'agit essentiellement du camembert et autres pâtes pressées, des fromages frais et des fromages fondu (**Anonyme 3, 2011**).

Afin de réduire les importations du lait et de promouvoir la filière lait, de nouvelles mesures ont été décidées par le gouvernement en faveur des éleveurs et des opérateurs de ce secteur en

augmentant la subvention du lait cru et en encourageant l'investissement, avec l'objectif de baisser les importations de la poudre de lait de 50% à l'horizon 2019 (Anonyme2, 2015).

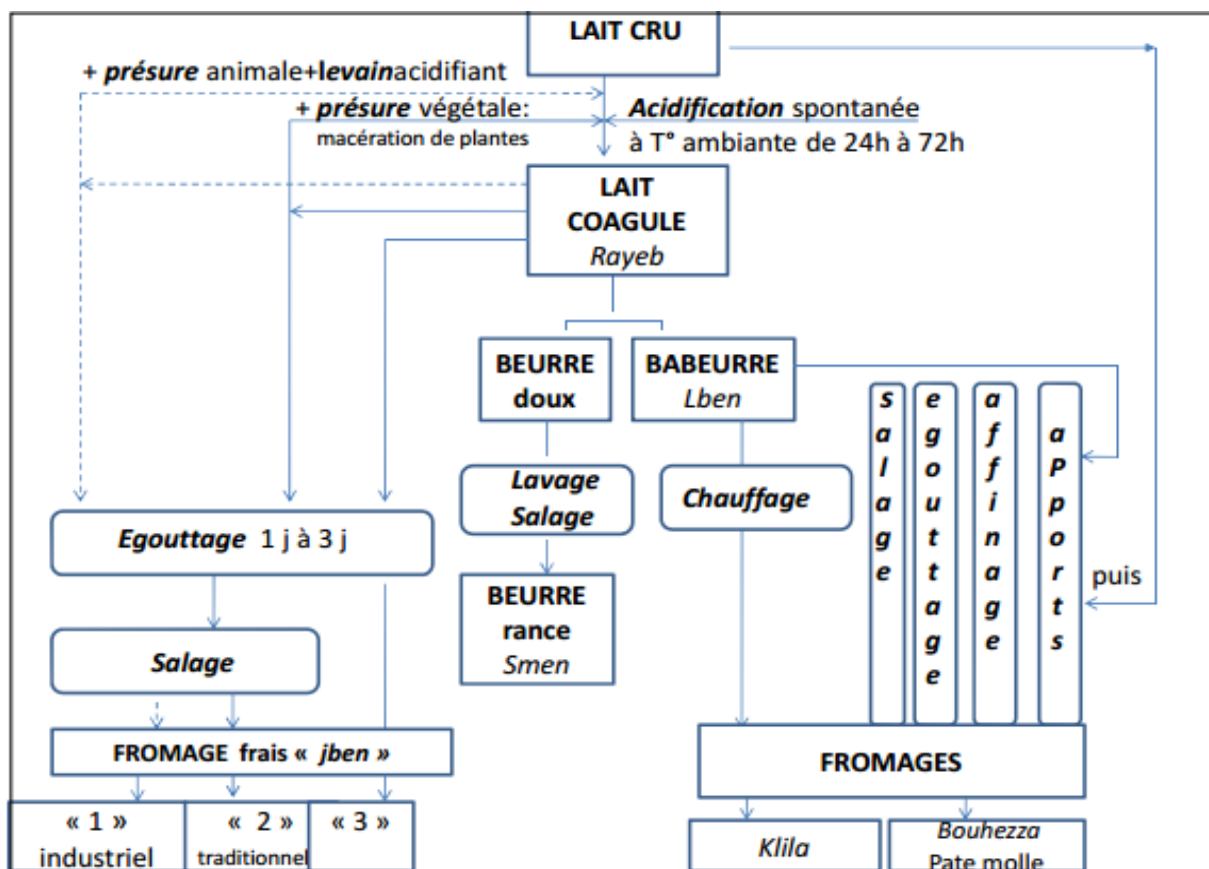


Figure 9 : Schéma présente les différentes étapes de préparation des produits laitiers traditionnels Algériens (Bendimerad, 2013).

V. Les fromages traditionnels les plus connus en Algérie

V.1. Lben et produits à base du Lben

La préparation du *Lben* débute par la coagulation en *Rayeb* (pendant 24h à 72h selon la saison), le *Rayeb* peut être consommé tel qu'il est ou subit un barattage et un écrémage dans une peau de chèvre ou de brebis *Chekouaou Kerbaen* égypt. la peau de l'animal non fondue est tannée puis confectionnée sous forme de sac imperméable par nouaison des différentes ouvertures, l'ouverture du cou de l'animal constituera le col ou la bouche de la *Chekoua* (Aissaoui et al., 2006; Benkerroum et Tammime, 2004).

L'écrémage est réalisé généralement le matin; le *Chekoua* est remplie à moitié de *Rayeb* puis tendue par gonflement. Ensuite, la *Chekoua* est bien nouée et secouée vigoureusement durant une demi-heure. La formation des globules gras (beurre) est jugée par le changement du son

qui se produit à l'intérieur de la *Chekoua*, pour aider l'agglomération des particules du beurre, Léau est habituellement ajouté, chaude ou froide en fonction de la température du lait. Le beurre frais est retiré manuellement en une seule motte appelée *Zebda*, *Zebda baladiou semnah* dans autres pays Le petit lait restant selon ce procédé est appelé *LBEN* le même produit est fabriqué dans autres pays est connu sous le nom de *leben* ou *Lben* (pays du nord d'Afrique et *Laban* (moyen orient) (**Benkerroum et Tammime, 2004**).

Actuellement le barattage traditionnel est remplacé par l'utilisation des mixeurs électriques équipé par des agitateurs et des moteurs, ils prennent l'avantage de la réduction de l'activité physique lors du barattage ainsi la facilité du nettoyage.

Pendant le stockage et après 2 à 3 jours, *Lben* s'altère et son acidité augmente, pour éviter sa perte ; le produit est chauffé jusqu'au la séparation du lactosérum, la phase aqueuse est séparée et le coagulum séparé, est appelé *Klila* qui est consommé comme un fromage frais, ou utilisé comme un ingrédient dans les préparations culinaire après découpage et séchage, l'égouttage du sérum diminue l'acidité, et le traitement thermique favorise la sécurité microbiologique du produit.

Le beurre frais est obtenu après le barattage du lait fermenté *Rayeb*, occasionnellement une quantité d'eau tiède (40-50°C) est ajoutée (environ 10%), à la fin du barattage pour favoriser l'agglomération des globules gras et l'augmentation du rendement en *Zebda*, lors du barattage mécanisé les globules gras se flottent sur la surface du *Lben* et séparées par une cuillère perforées, le beurre frais obtenu a une forte odeur de diacetyl , est possède une consistance molle à cause de la forte teneur en eau comprend au beurre obtenue par le procédés industrielle (23 vs 16g/100g) (**Tantaoui ELaraki et ELmarakchi, 1987**) , l'excès du beurre produit est transformé en beurre rancie (*Smen*) pour la préservation, le beurre frais est lavée dans une eau tiède, puis cette eau est remplacée par une saumure, l'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une eau clair ce qui indique que le beure est dépourvu du *Lben* résiduel, le beurre après est salé (8-10g/100g) puis conditionné.

V.2. Jben

C'est un fromage frais, traditionnel dans le Nord algérien. Cette dénomination regroupe des trajectoires technologiques très différentes, aboutissant à des produits aux caractéristiques très variées. Nous n'avons pas trouvé de publication portant sur la caractérisation du *Jben* algérien. Traditionnellement, il y a une étape d'acidification spontanée, à température ambiante, pendant 24 h à 72 h selon la température, comme celle conduisant au *Rayeb*,

comme le montre la figure 35. Traditionnellement, le fromage Jben est fabriqué avec du lait cru de brebis ou de chèvre, acidifié spontanément et coagulé par des enzymes coagulantes d'origine végétale issues des fleurs de cardon (*Cynaracardunculus* L), d'une plante épineuse sauvage (*Cynara humilis*) ou d'artichaut (*Cynarascolymus*), ou du latex de figuier (*Ficus carica*) ou des graines de citrouille. Les fleurs entières sont mises à macérer dans le lait. Le végétal est utilisé pour accélérer la coagulation et pour donner un certain goût au fromage. La variété végétale utilisée varie d'une région à l'autre ; elle donne un goût et une texture appréciés par les gens de la région concernée. Le caillé est ensuite égoutté et salé ou non. Comme décrit au Maroc par (**Benkerroum et Tamine, 2004**), le Jben peut aussi être artisanalement fabriqué sans coagulation du lait cru par voie enzymatique ; dans ce cas, le lait cru est seulement coagulé par l'acidification spontanée, puis le caillé est égoutté pendant 2 à 3 jours pour obtenir la consistance désirée. Des additifs peuvent être ajoutés après égouttage et salage (ail, persil, poivre,). Le fromage obtenu correspond dans d'autres pays arabes au fromage nommé Jibneh Beida (**Agioux, 2003**).

V.3. Klila

La Klila est préparée à partir du Lben chauffé sur feu doux pendant 12 minutes environ pour favoriser la séparation du caillé et du lactosérum et accélérer le processus d'égouttage. Le lait caillé est égoutté dans un tissu fin. La klila peut être consommée à l'état frais ou additionnée à certains plats traditionnels après avoir été coupé en petits cubes et séchés au soleil (**Touati., 1990**).

V.4. Bouhezza

Ce type de fromage est répandu dans le territoire de l'Aurès (zone Chaouia). Il est fabriqué à partir de lait de chèvre, de vache ou de brebis baratté et écrémé (lben) (**Touati, 1990 et Hallal, 2001**). Le salage, l'égouttage et l'affinage sont réalisés simultanément dans une outre perméable (Chekoua) avec incorporation de poudre du piment rouge, la fabrication de bouhezza dure plusieurs semaines à plusieurs mois, il a un goût acidulé fort caractérisé au fromage (**Zaidi, 2002**).

Autres préparations

V.5. Ighounane :

Fromage fabriqué en Kabylie à partir du colostrum, la préparation se fait dans un ustensile en terre cuite enduit d'huile d'olive dans lequel sera versée une petite quantité

d'eaux salées puis le lait qui sera chauffé et coagulé. Le caillé formé sera découpé et prêt à être consommé (Agroligne, 2001).

V.6. Takammart :

Fromage du Hoggar, sa fabrication se fait par introduction d'un morceau de la caillette de jeunes chevreaux dans le lait, après quelques heures le caillé est retiré à l'aide d'une louche et déposé en petits tas sur une natte, il sera ensuite pétri pour évacuer le sérum puis déposé sur une natte faite de tige de fenouillet qui donne de l'arôme, les nattes sont ensuite exposées au soleil durant deux jours puis placées à l'ombre jusqu'au durcissement du fromage (Agroligne, 2001).

V.7. Aghoughlou

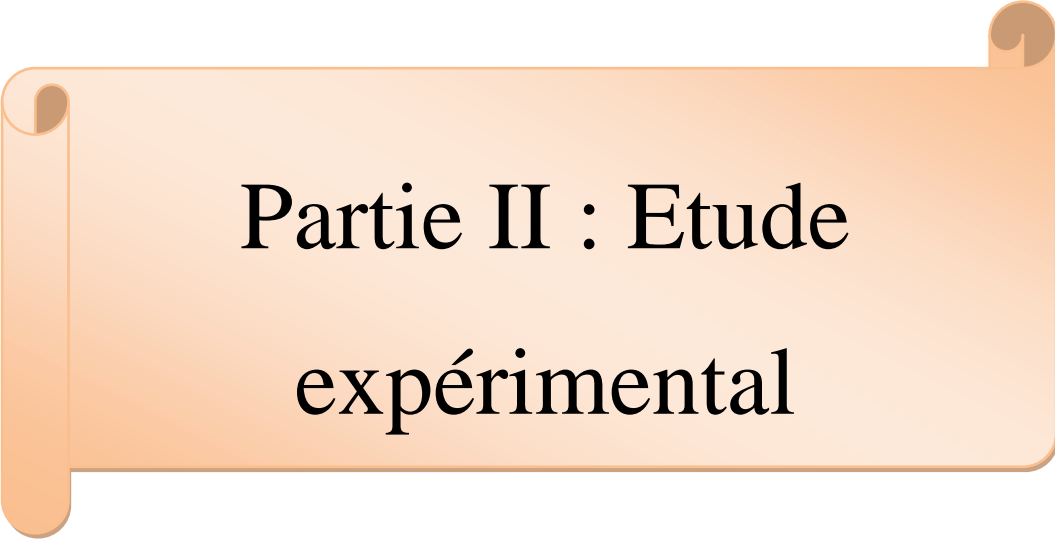
Fromage fabriqué en Kabylie, il est obtenu à partir de lait frais de vache ou de chèvre coagulé par la sève du figuier. Le coagulum ainsi formé est découpé puis mis dans un tissu fin pour compléter l'égouttage (Mahamedi, 2015).

V.8. Mechouna

La *Mechouna* est un fromage traditionnel algérien largement consommé dans la région de Tebessa, fabriqué par l'ajout du *Lben* ou *Rayeb* salé au lait cru de vache ou de chèvre en ébullition. Elle peut être considérée comme un fromage frais à pâte molle, avec un extrait sec de 41 ± 1 , et un pH de $5,85 \pm 0,15$. La *Mechouna* est consommée avec du pain et de la galette, ou bien avec du couscous et des pâtes alimentaires (macaroni, spaghetti, ...). Dans le but d'améliorer sa qualité organoleptique, ce fromage peut être additionné de plusieurs épices selon le choix des consommateurs ; dans cet état la *Mechouna* est dénommée *Chnina* (Lemouchi, 2007 ; Derouiche et Zidoun, 2015).

V.9. Aoules

Aoules est un fromage traditionnel algérien, sec, typique (87% à 92% de matière sèche), obtenu par le chauffage modéré du *Lben* écrémé issu de lait de chèvre coagulé spontanément. Le chauffage est fait dans un récipient en argile jusqu'à la précipitation des caséines. Le précipité est tendu dans un panier de paille et le caillé est malaxé en petite quantité à la fois pour donner la forme d'un petit cylindre plat (2 cm d'épaisseur, 6 à 8 cm de diamètre). Le fromage est ensuite séché au soleil, broyé et peut être mélangé avec de la pâte des dattes ou avec les boissons (Benkerroum, 2013).

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and rounded corners. The text is centered on the scroll.

Partie II : Etude
expérimental

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and rounded corners. The text is centered on the scroll.

Matériel et méthode

I. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal consiste des fleurs de Chardon-Marie (*Silybum marianum*). Récoltée dans la région de Baghaï, W. Khenchela au mois d'Avril 2019. Les fleurs sont séchées à l'étuve à 30°C pendant deux jours. Les fleurs sèches sont ensuite broyées à l'aide d'un broyeur pour avoir une poudre fine. La poudre est conservée au froid (4°C) à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

I. 2. Extraction des coagulants végétaux

I. 2. 1. Extraction par macération

10 g de poudre des fleurs de *S. marianum* ont été mise à macérés dans 150 ml de solvant (Eau et éthanol absolu) sous agitation à température ambiante pendant une nuit (**Isbilir et al., 2012**)

Les extraits ont été ensuite filtrés sur un papier filtre et les résidus sont ensuite évaporé à sec sous pression réduite à 40°C au Rota-vapeur. Le résidu sec pesé est conservé à 4°C.

➤ Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait bruts sec méthanolique a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Où :

R (%) : Rendement extraction d'exprimé en % ;

m: Masse en grammes de l'extrait sec résultant ;

m₀ : Masse en grammes du matériel végétal à traiter.

I.2.2. Extraction par le trichlorure d'acide acétique (TCA)

1g des fleurs de *S. marianum* est mélangé avec 10 ml de TCA (20%) et broyé en utilisant un mortier, le tout est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est additionné de 10 ml de mélange éther de pétrole/chloroforme (V/V). Le mélange est subit une deuxième centrifugation à 5000 rpm/10min. Le culot obtenu est ajouté de 10 ml de NaOH (0,1N). L'échantillon est bien homogénéisé est conservé à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure (**Bradford, 1976**).

I.3. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits des fleurs été déterminée par la méthode colorimétrique en utilisant le Folin Ciocalteu (**Singleton et Ross ,1965**).

Un volume de 200 µl chaque extrait de fleurs (2mg/ml) sont mélangés avec 1 ml de Folin Ciocalteu (1/10) et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 %). Le mélange est agité et laissé à reposer pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, l'absorbance est mesurée à 765 nm. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

I.4. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (**Zhishen et al., 1999**).

500 µl de chaque extrait (2mg/ml) sont ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Ensuite, 150 µl de nitrite de sodium (5 %) est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (10 %) est rajouté et une incubé à température ambiante de 6 min. Enfin 500 µl d'hydroxyde de sodium (1M) sont additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité et l'absorbance est mesurée à 510 nm. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des fruits est exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g).

I.5. Dosage des tannins condensés

La méthode de vanilline en milieu acide à été utilisé pour estimer la teneur en tannins condensés des extraits des fleurs de *S. marianum* (**Julkunen-Titto, 1985**).

Un volume de 50 µl de chaque extrait (2mg/ml) est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré sont additionné et laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm. La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g) à partir de la courbe d'étalonnage.

I.6. Etude de l'activité enzymatique coagulante

L'activité coagulante de chaque extrait des fleurs de *S. marianum* (aqueux, éthanolique, TCA) a été étudiée en mesurant deux paramètres à savoir : la force coagulante et le rendement de coagulation.

Pour se faire le lait de vache frais est additionné de 600 mg de chaque extrait. La coagulation est réalisée pendant 2 à 3 heures. Le gel est subit un égouttage durant la nuit.

Le rendement de coagulation est déterminé en gramme de coagulat par litre de lait.

I.6.1. Détermination de force coagulante

La force coagulante est le nombre de volumes de lait coagulé par un volume de présure. a été déterminée par la formule :

$$F = \frac{2400 * V}{T * v}$$

F : force de présure.

V : volume de lait en ml.

v : volume de présure en ml.

T : temps de floculation (coagulation) en secondes.

On a mis 250ml de lait dans un bécher puis le plonger dans un étuve à 50°C On a ajouté 1ml de l'extrait aqueux et déclenché le chronomètre On a maintenu le bécher dans l'étuve, l'incliner et lui faire effectuer une légère rotation de façon à ce qu'il y ait un film de lait sur les parois du flacon. Lorsqu'un début de floculation apparaît, on a arrêté le chronomètre. On a refait la même chose avec les deux extraits (ethanolique et TCA).

I.7. Etude des aptitudes antioxydante

I.7.1. Etude de l'activité antioxydant totale

L'activité antioxydante totale (TAC) a été déterminée par la méthode de **(Prieto et al., 1999)**. 0.3 ml de chaque extrait de différentes concentrations (0,1- 0,8 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution réactif (1ml acide sulfurique 0,6M , 1ml phosphate de sodium 28mM et 1ml molybdate d'ammonium 4mM). Le mélange est incubé à 95°C pendant 90

min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS) à partir d'une courbe d'étalonnage.

I.7.2. Etude de l'activité anti radicalaire

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhammou *et al.*, 2007). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm.

Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$AAR\% = \frac{A_C - A_T}{A_C} \times 100$$

Où :

AAR% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire

A_C : Absorbance du contrôle

A_T : Absorbance du test effectué

Les concentrations effectrices 50 (EC50) sont déterminées graphiquement par les régressions linéaires des graphes A=f(C).

I.7.3. Etude de l'activité réductrice

Le pouvoir réducteur ou FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) a été déterminé suivant la méthode préconisée par (Oyaizu, 1986). 1 ml de chaque extrait (0,1-0,8 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml du tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanure de potassium 1%. Les mélanges sont incubés à 50°C pendant 30 min. Après, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) est additionné. Le tout est centrifugé à 3000 tours pendant 10 min. 2,5 ml du surnageant de chaque

concentration est mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure de fer (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour chaque extrait. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

I.8. Optimisation de l'extraction des enzymes coagulantes

Le plan de surface de réponse Box-Behnken a été utilisé pour optimiser les conditions d'extraction des enzymes coagulantes du lait à partir des fleurs de *S. marianum*.

La conception de la matrice nous a donné 15 essais d'extraction à réaliser. Chaque extrait est étudié pour son pouvoir coagulant, activité antioxydante et la teneur en protéine.

L'influence de la température, le temps et le rapport solide/liquide sur l'extraction ont été étudié par la régression linéaire. **Le tableau 3** résume les facteurs étudiés et leurs niveaux testés.

Tableau 3 : Les variables explicatives et leurs niveaux

Variable	-1	+1
Température °C (X ₁)	20	60
Temps min (X ₂)	20	180
Rapport S/L ml/g (X ₃)	10	20

Après l'étude des surfaces de réponses les valeurs optimales pour chaque variables ont été utilisées pour valider le model.

I.9. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été analysé en utilisant le logiciel Statistique 8.0 (Copyright © 2007 State Soft Inc. USA). La régression linéaire du modèle et la représentation tridimensionnelle des surfaces de réponse ont été réalisé par le logiciel JMP® 13.2.0 (Copy Right © 2016 SAS Institute Inc., USA).

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and rounded corners. The text is centered on the scroll.

Résultat et discussion

I. Dosage spectrophotométrique

I.1. Dosage des composés phénoliques

I.1.1. Dosage des poly phénols totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations des extraits de la plante *Silybum marianum* (la fleur), selon la méthode Folin-Ciocalteu.

La teneur en poly phénols totaux est exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/mg d'extrait).

Les résultats obtenus exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait aqueux et éthanolique sont mentionnés dans **la figure 10** :

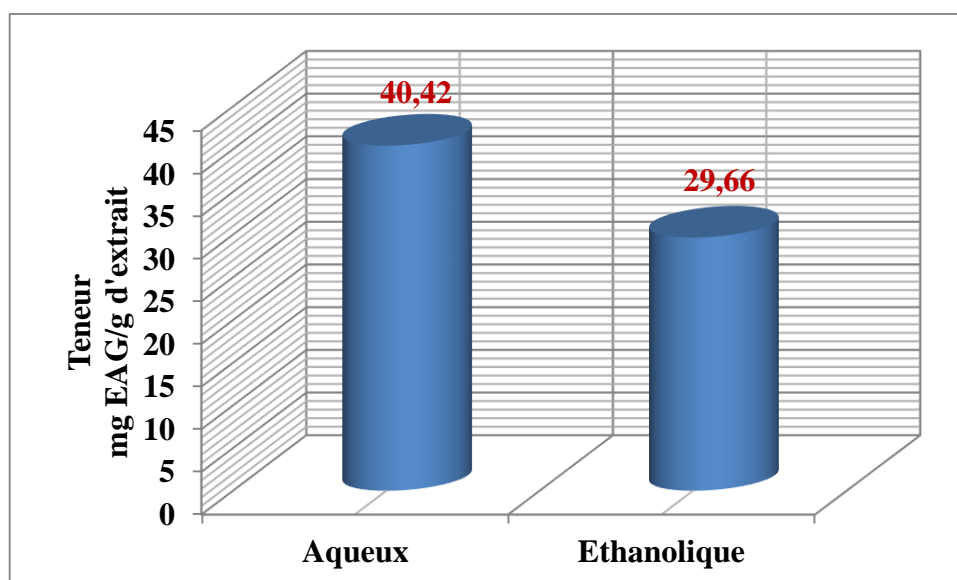


Figure 10 : Teneurs en phénols totaux des extraits de fleur de *S. marianum*.

D'après la figure la teneur en poly-phénol est plus importante dans l'extrait aqueux.

L'étude réalisée par **Jamei et Donia Anvari, 2018** montre que pour 15 g de poudre de la plante avec 100 ml de l'éthanol absolu, l'extrait éthanolique des fleurs de *Silybum marianum* contient un taux de poly-phénols égale à 2.29 ± 0.09 (mg EAG / 100 g d'extrait)

En comparaison avec nos résultats, la teneur des poly-phénols totaux d'extrait éthanolique est supérieure à celle mentionnée par **Jamei et Donia Anvari, 2018**, 29.66 (mg EAG/g d'extrait)

Dans d'autre part Les résultats de **Syed Muhammad Mukarram Shah et al, 2011** montre que pour 10g de poudre de la plante du chardon marie ajouter à 200mL d'eau distillé pendant 12h (**Evans, 2000 ; Harborne, 1973 ; Sofowara, 1993**) l'extrait aqueux contient un taux de poly-phénols égale à 0.4130(%)

I.1.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique de trichlorure aluminium $AlCl_3$. La quercétine considérée comme standard a permis de réaliser une courbe d'étalonnage.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux de la plante est exprimée en mg équivalent de quercétine(EC) par (g) de matière sèche. À partir de la courbe d'étalonnage, les résultats de la teneur en flavonoïdes de la partie des fleurs du *Silybum marianum* sont présentés dans **la figure 11** :

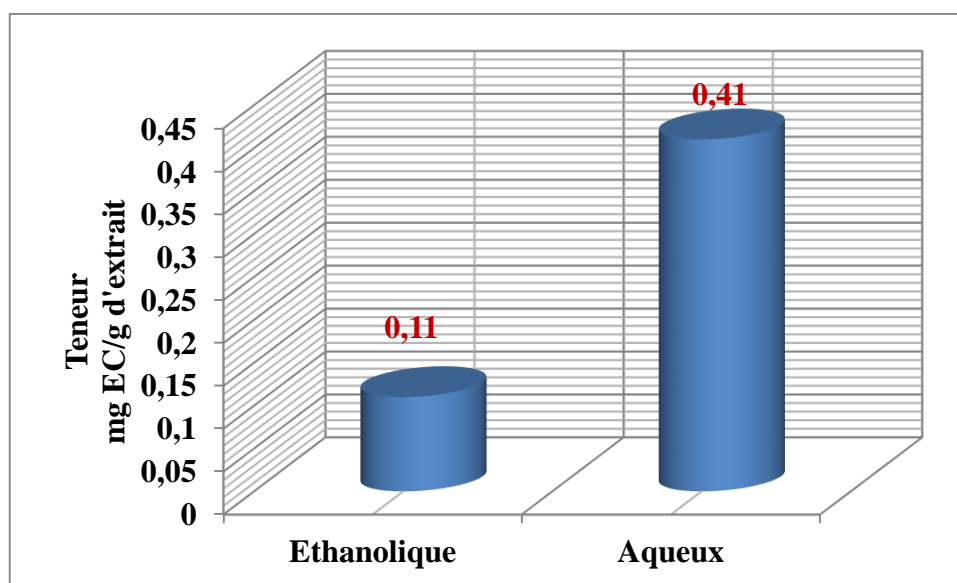


Figure 11 : Teneurs en Flavonoïdes des extraits des fleurs de *S. marianum*.

A partir de résultat qui observé dans **la figure 11**, la teneur en Flavonoïdes est plus importante dans l'extrait aqueux.

Les résultats de **Jamei et Donia Anvari, 2018** ont révèle un taux de flavonoïdes dans l'extrait éthanolique des fleurs de *Silybum marianum* est égale à 0.91 ± 0.03 (mg EAG/100 g d'extrait).

En comparaison avec nos résultats, la teneur en flavonoïdes totaux d'extrait éthanolique est inférieure à celle mentionnée par **Jamei et Donia Anvari, 2018**, 0.11 (mg EC/g d'extrait).

Et d'une d'autre part notre résultats de teneur en flavonoïdes totale d'extrait aqueux et inférieure aussi à celle de **Jamei et Donia Anvari, 2018**, 0.41 (mg EC/g d'extrait).

Mais les résultats de **Syed Muhammad Mukarram Shah et al, 2011** montre que pour 10 g de plante ajouté au méthanol (80%), l'extrait méthanolique des fleurs de la plante donne un taux de flavonoïdes égale à 21(%) .

I.1.3. Dosage des tannins condensés

Le dosage des tannins condensés a été utilisé la méthode à vanilline en milieu acide, en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) réalisé par une solution étalon.

La concentration des tannins est exprimée en milligramme d'équivalents de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/mg d'extrait).

À partir de la courbe d'étalonnage, les résultats de la concentration des tannins condensés sont présentés dans **la figure** :

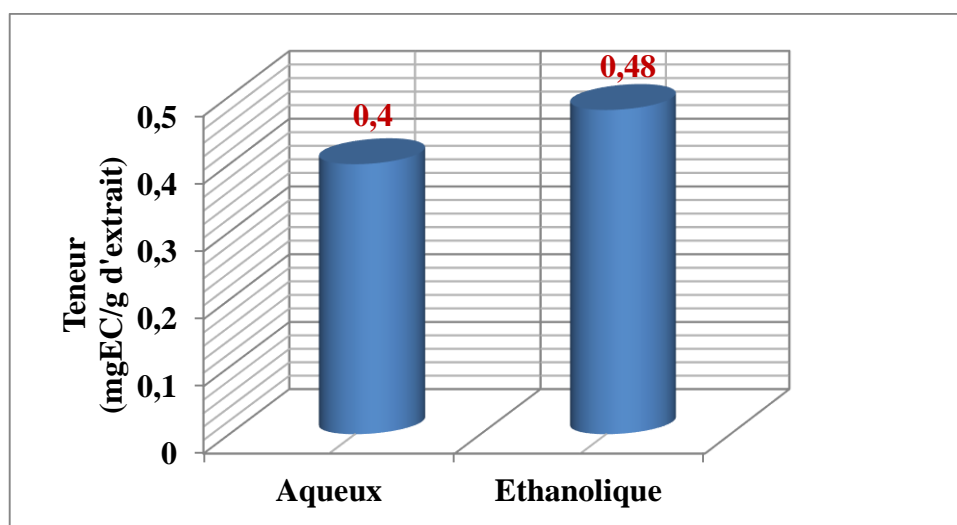


Figure 12 : Teneurs en tannin des extraits des fleurs de *S. marianum*.

D'après **la figure 12** la teneur en tannin est plus importante dans l'extrait éthanolique.

Les résultats obtenus par **Syed Muhammad Mukarram Shah et al, 2011** donne un taux de tannin égale à 0.6930(%) .

I.1.4. Dosage des protéines

Le taux des protéines des trois extraits de la plante *S. marianum* à été déterminé par méthode de Bradford (1976), les résultats sont mentionnés dans **la figure 13** :

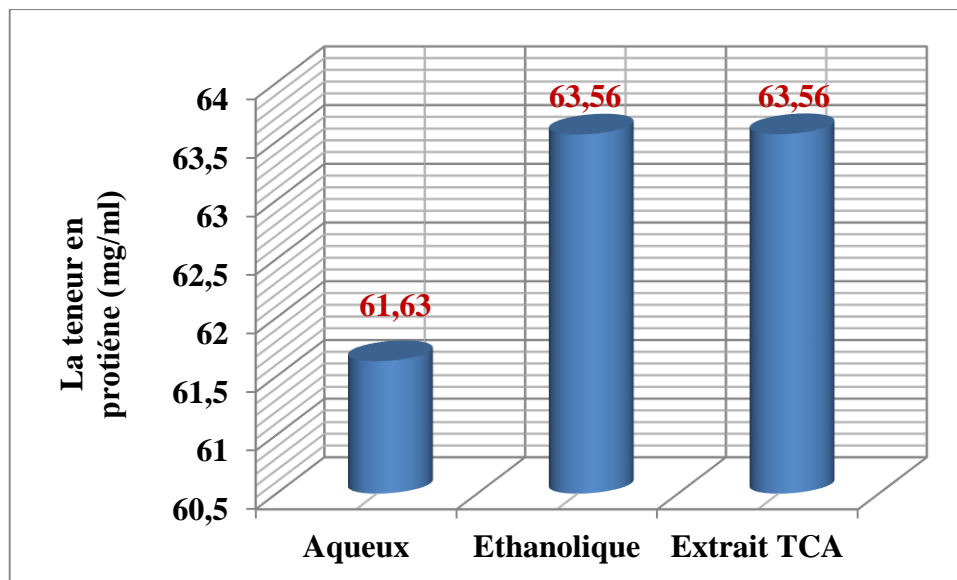


Figure 13 : Teneur moyenne en protéine de l'extrait des fleurs de *S. marianum*.

D'après les résultats illustrés dans **la figure 13**, la teneur la plus bas est enregistré dans l'extrait aqueux et les deux extraits de TCA et de l'éthanolique sont égaux, donc la teneur en protéine est plus importante dans l'extrait éthanolique et l'extrait TCA.

I.1.5. La force de coagulation du lait (F)

La force coagulante est le nombre de volumes de lait coagulé par un volume de présure. Si l'on a pris un volume "v" de présure, un volume "V" de lait et mesuré un temps de coagulation en secondes, on calcul selon la formule de la force.

Les résultats sont présentés dans **la figure 14** :

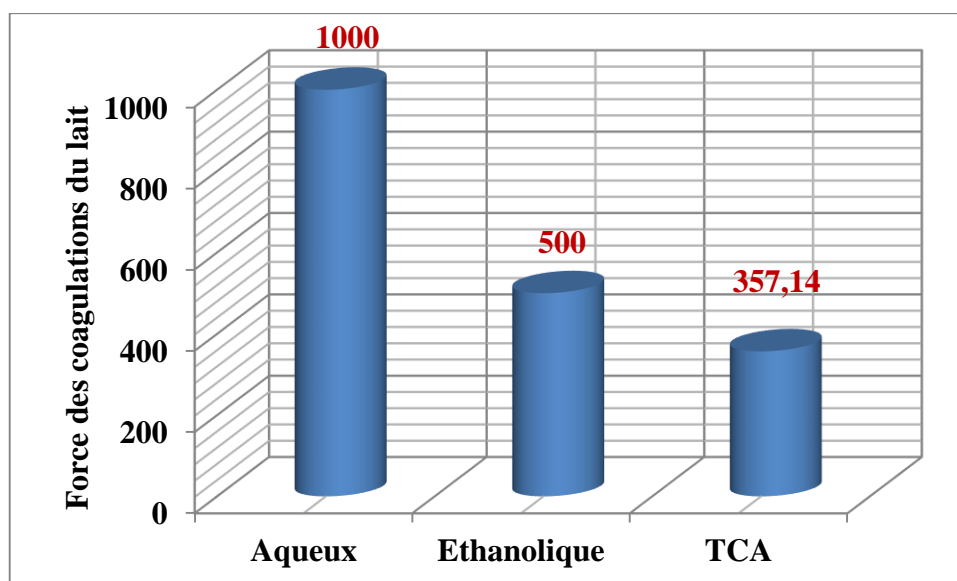


Figure 14 : Résultat de la force de coagulation du lait par les 3 extraits des fleurs de *S. marianum*.

D'après la **figure14** la force de coagulation du lait la plus élevée est celle dans l'extrait aqueux.

I.2.Evaluation de l'activité biologique *in-vitro*

Dans cette partie, nous avons utilisé trois méthodes pour évaluer l'activité antioxydant *in vitro* de la plante étudiée à savoir : DPPH et FRAP et activité antioxydante totale.

I.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le radical libre diphényle-picrylhydrazyle (DPPH)

La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 517nm, à partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée.

Les valeurs obtenues représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des extraits de la plante. Nous avons déterminé la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50), qui constitue l'activité antioxydante des extraits éthanolique et aqueux étudiés en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = a x + b$.

Les résultats sont mentionnés dans la **figure 15** :

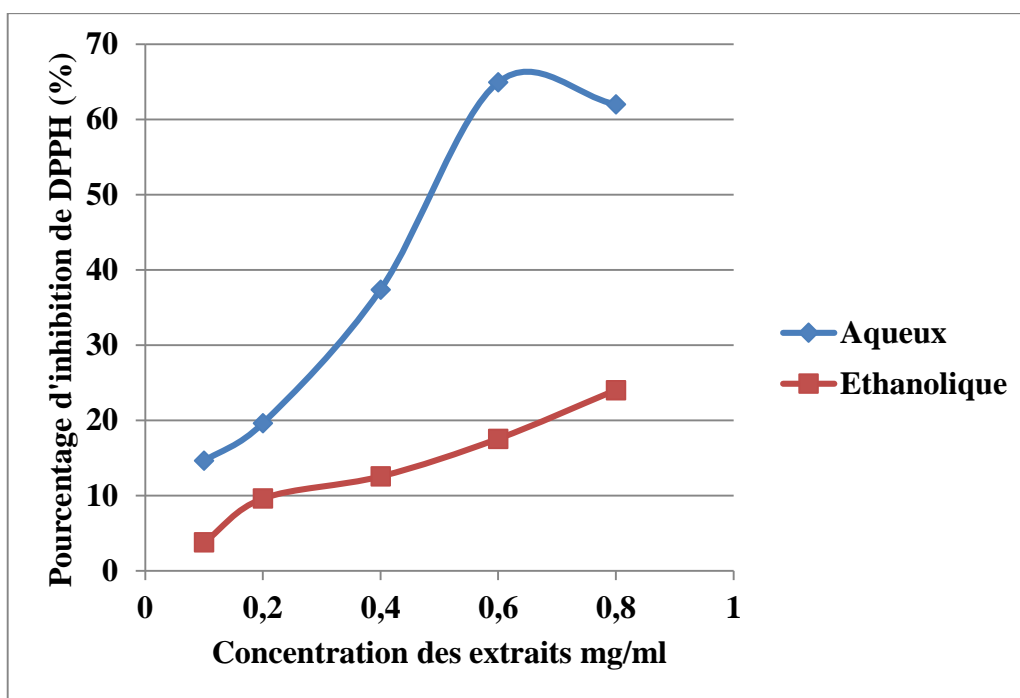


Figure 15 : Courbe de pourcentage d'inhibition de DPPH des deux extraits de *S. marianum*.

D'après la **figure 15** qui représente le pourcentage d'inhibition de DPPH les résultats obtenus que les deux extraits des fleurs de *S. marianum* sont capables de neutraliser le radical DPPH, cette capacité accroit généralement avec la concentration des deux extraits.

* Evaluation de l'IC50

La valeur de l'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. Les valeurs des IC50 trouvées pour les deux extraits testés sont représentées dans la **figure 16** :

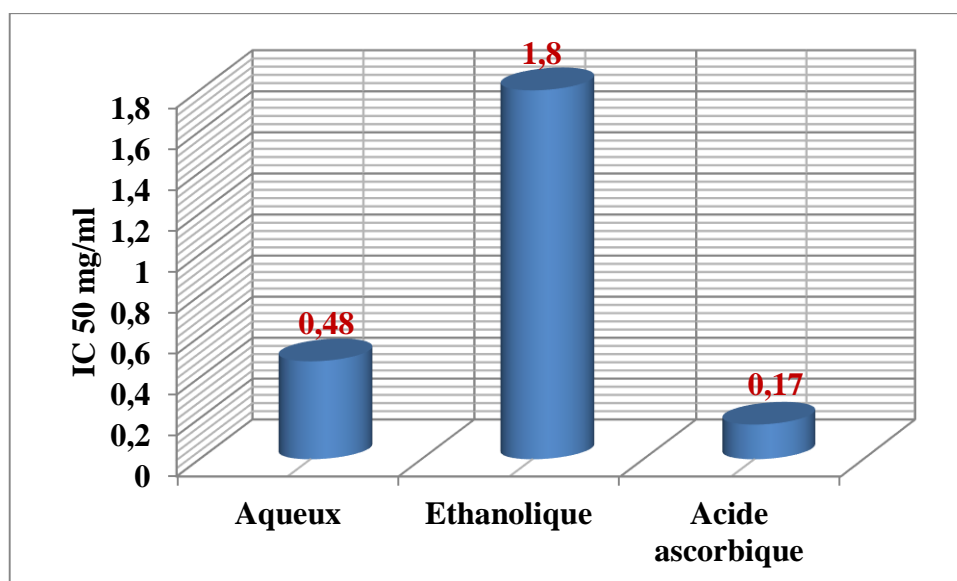


Figure 16 : IC₅₀ de l'acide ascorbique et des extraits des fleurs de *S. marianum*.

D'après le résultat dans **la figure 16** on observe que l'extrait éthanolic des fleurs de *S. marianum* est doté d'une activité antioxydante importante, mais elle est faible par rapport à la valeur d'acide ascorbique.

D'autre part, l'extrait aqueux des fleurs de *S. marianum* est aussi doté d'une activité antioxydante plus importante, parce qu'elle est presque convergée à la valeur d'acide ascorbique.

Les résultats de **Jamei et Donia Anvari, 2018** donnent un taux d'activité de piégeage radicalaire de DPPH d'un extrait méthanolique égale à $70.66 \pm 2.25(\%)$ avec un taux d'IC₅₀ égale à 0.18 ± 0.034 (mg/ml).

En comparaison avec nos résultats, L'extrait éthanolic des fleurs de *Silybum marianum* est doté d'une activité antioxydante DPPH et un IC₅₀ faible, successivement égale à 24(%), 1,8(mg/ml) par rapport aux résultats de **Jamei et Donia Anvari, 2018**.

Et d'autre part notre extrait aqueux est doté d'une activité antioxydant DPPH égale à 62(%) qui est presque proche au résultat de **Jamei et Donia Anvari, 2018** avec un taux important d'IC₅₀ égale à 0,48 (mg/ml).

I.2.2. Pouvoir réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power)

L'activité antioxydante des extraits éthanolique et aqueux de *Silybum marianum* ont été évalué en utilisant la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).

La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanure de à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al* ,2002).

Les résultats de cette activité sont présentés dans **la figure 17** :

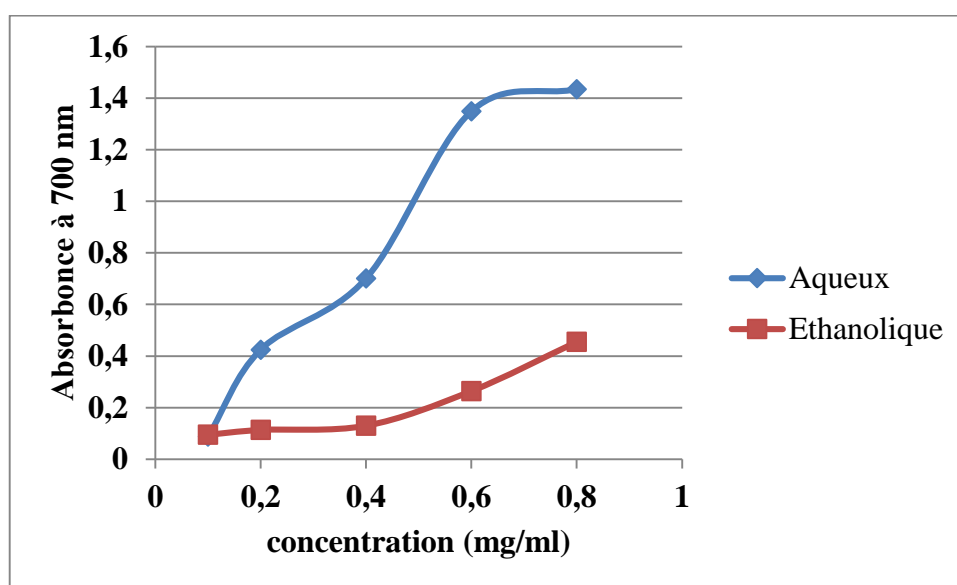


Figure 17 : Pouvoir réducteur du fer des extraits des fleurs de *S. marianum*

En analysant **la figure 17** il apparaît que le pouvoir réducteur des deux extraits et augmente avec la concentration. D'autre part, nous avons constaté que l'extrait d'eau présente le meilleur pouvoir réducteur par rapport à l'extrait éthanolique.

* Evaluation d'EC50

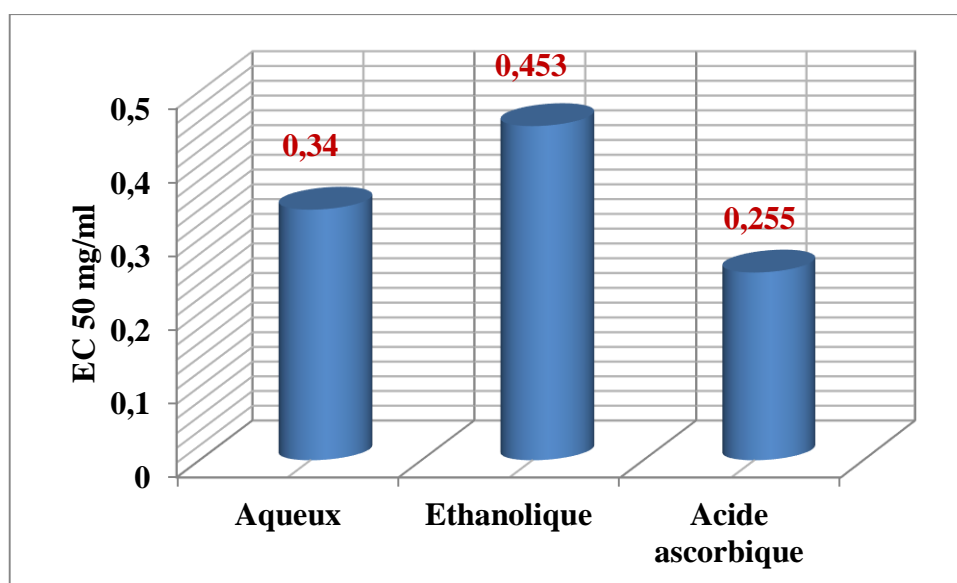


Figure 18 : EC50 de l'acide ascorbique et des extraits des fleurs de *S. marianum*.

D'après **la figure 18** les résultats observés que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux des fleurs est fort par rapport à l'extrait éthanologique qui est comparé avec l'acide ascorbique.

Les résultats de **Jamei et Donia Anvari, 2018** donnent un taux de FRAP égale à 0.82 ± 0.01 (μ mol $\text{Fe}^{+2}/100$ g) pour un extrait éthanologique.

D'après nos résultats, les valeurs de IC50 d'extrait aqueux (0.34 (mg/ml)), et d'extrait éthanologique (0.453 (mg/ml)) est plus importante à celle de **Jamei et Donia Anvari, 2018**.

I.2.3. Activité antioxydante totale

L'activité antioxydante totale a été déterminée pour les deux extraits et exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique g de la matière sèche (mg EAA/ g).

Les résultats sont présentés dans **la figure 19** :

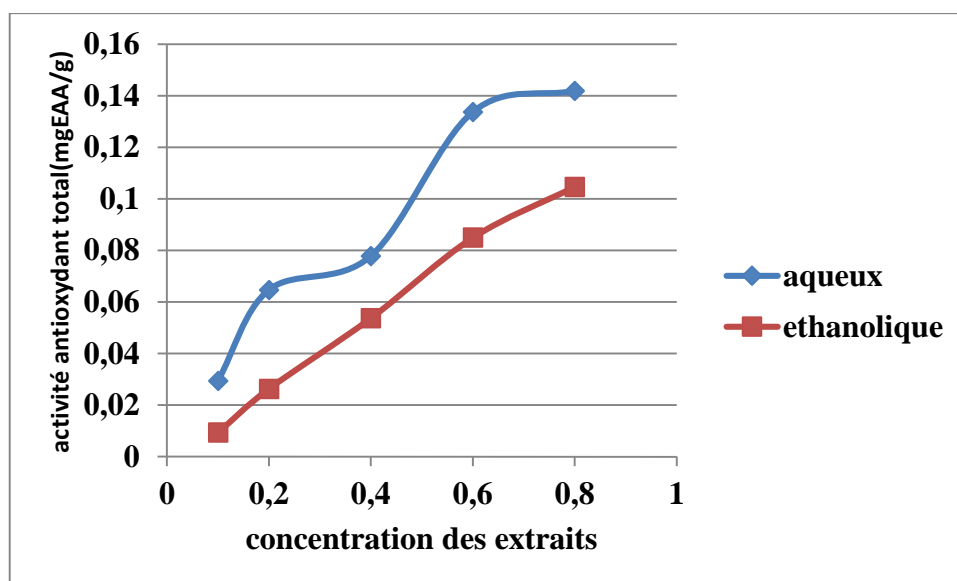


Figure 19 : L'activité antioxydante totale des extraits des fleurs de *S. marianum*.

D'après l'analyse de nos résultats qui montré dans **la figure 19** l'activité antioxydante totale et augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits.

Pour l'extrait aqueux exerce une activité antioxydante plus forte que celle de l'extrait éthanolique.

Les résultats de **Jamei et Donia Anvari, 2018** montres un taux d'activité antioxydante totale égale à 0.03 ± 0.003 (mg Equivalents α - tocophérol).

II. Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction

II.1. Résultats de la réalisation de la matrice des essais

Cette étape est réalisée en utilisant le plan Box-Behnken. L'influence de la température (X_1), le temps (X_2) et le rapport L/S (X_3) sur le rendement de coagulation (Y_1), le taux des flavonoïdes (Y_2), l'activité anti radicalaire (Y_3) et le taux des protéines (Y_4). Les résultats trouvés après étude des quatre réponses sur les 15 essais d'extraction sont résumés dans le **tableau 4**.

Tableau 4: Matrice d'expérience et les réponses associées.

Essai	Variables explicatives			Variable à expliquer			
	X ₁ (°C)	X ₂ (min)	X ₃ (ml/g)	Y ₁ (%)	Y ₂ (MEQ)	Y ₃ (AAR%)	Y ₄ (µg/ml)
1	0	-	-	12.88	26.07	73.99	8.10
2	0	+	-	3.55	26.32	40.06	7.65
3	0	+	+	6.65	12.67	64.4	8.42
4	-	0	-	15.1	37.51	39.19	10.24
5	-	0	+	2.14	18.30	16.4	7.82
6	0	0	0	10.8	20.19	58.5	8.15
7	-	-	0	3.8	18.61	48.11	8.28
8	+	0	-	4.92	23.41	10.22	9.21
9	+	0	+	4.01	14.82	13.62	8.85
10	-	+	0	3.34	18.23	25.1	11.23
11	0	0	0	11.2	13.56	56.66	8.01
12	0	-	+	4.25	11.34	4.95	8.03
13	+	+	0	4.1	10.96	0.31	8.30
14	0	0	0	13.41	14.31	70.2	8.39
15	+	-	0	1.87	14.19	18.58	10.74

X₁: température, X₂: temps, X₃: Rapport L/S, Y₁: Rendement de coagulation, Y₂: Taux des flavonoïdes, Y₃: Activité anti radicalaire, Y₄: Taux des protéines.

Selon le tableau 4, la variance des valeurs observées est plus ou moins remarquable pour les quatre réponses. Le rendement de coagulation varie de 1.87 à 15.1 %, avec une valeur maximale obtenue avec une macération d'un gramme d'échantillon dans 20ml de solvant à température de 20°C de 100 minutes (essai 04).

De l'autre part, la variation des valeurs de Y₂ est moins considérable (10.96-37.51 MEQ), le taux maximal des flavonoïdes est observé avec des niveaux minimaux de la température et de volume de solvant et un temps d'extraction moyen (essai 04).

Par ailleurs, l'activité anti radicalaire maximale (73.99%) est enregistrée dans l'essai 01 avec des niveaux minimum de la température et le volume de solvant.

Le taux des protéines change de 7.65-11.23 avec un teneur maximal observé dans l'essai 10. Il est à noter que les valeurs observé sont proches de celles prédites par le model statistique utilisé.

II.2.Résultats d'ajustement du modèle

L'analyse de l'ajustement du modèle est une étape primordiale avant l'adoption de ce model pour la prédiction des valeurs de réponse étudiées. Cette analyse est assurée par la régression multiple et la détermination du manque d'ajustement du model. Nos résultats du **tableau 5** ont montré un bon ajustement du model quadratique polynomial avec les quatres réponses étudiées.

Tableau 5: Résultats d'ajustement du model et les effets des variable indépendantes sur les réponses.

Réponse Terme	Y ₁		Y ₂		Y ₃		Y ₄	
	Estimation	P> t	Estimation	P > t	Estimation	P > t	Estimation	P > t
Constante	11.80	0.001*	16.02	0.001*	61.78	0.001*	8.18	<.001*
X ₁	-1.18	0.219	-3.65	0.01*	-10.75	0.062	-0.059	0.783
X ₂	-0.64	0.479	-0.25	0.795	-1.97	0.679	0.056	0.791
X ₃	-2.42	0.05*	-7.02	0.001*	-8.01	0.135	-0.260	0.256
X ₁ X ₂	0.67	0.59	-0.71	0.60	1.18	0.859	-1.346	0.005*
X ₁ X ₃	3.01	0.052	2.65	0.09	6.54	0.350	0.517	0.131
X ₂ X ₃	2.93	0.057	0.26	0.84	23.34	0.014*	0.208	0.501
X ₁ ²	-4.40	0.05*	1.94	0.21	-32.37	0.004*	1.216	0.009*
X ₂ ²	-4.11	0.02*	-2.46	0.12	-6.38	0.379	0.237	0.463
X ₃ ²	-0.85	0.52	5.54	0.01*	-9.55	0.208	-0.365	0.275
Model	0.044		0.008		0.038		0.042	
Manque d'ajustement	0.020		0.892		0.193		0.066	
R ²	0.90		0.95		0.91		0.90	

X₁: température, X₂: temps, X₃: Rapport L/S, Y₁: Rendement de coagulation, Y₂: Taux des flavonoïdes, Y₃: Activité anti radicalaire, Y₄: Taux des protéines.

Il ressort du tableau 5 que l'analyse de la variance sont significatifs avec les quatre réponses étudiées (p<0.05). De l'autre part, les résultats montrent un bon ajustement du model avec les réponses étudiées ce qui est traduit par un manque d'ajustement non significatif (p>0.05).

Il est important de noter que le coefficient de corrélation R² situé entre 0.90 et 0.95, qui explique la bonne corrélation entre les valeurs observé et celles prédites par le model utilisé.

II.3. Etude de l'effet des variables explicatives sur les réponses

1. Effet de la température sur les réponses étudiées

Les résultats consignés dans le tableau montrent un effet négatif de la température sur les quatre réponses. De plus ce facteur influence d'une manière hautement significative le taux des flavonoïdes ($p < 0.01$). De l'autre part, la température ayant un effet hautement significatif combiné avec temps sur la teneur en protéines ($p < 0.01$). De même la température en tant que facteur quadratique exerce un effet significatif sur le rendement de coagulation, l'activité anti radicalaire et la teneur en protéines ($p < 0.05$).

2. Effet du temps sur les réponses étudiées

Le temps exerce un effet plus ou moins négatif sur les réponses Y_1 , Y_2 , et Y_3 et un effet légèrement positif sur la réponse Y_4 . Il est à remarquer que dans notre étude, le temps n'a aucun effet significatif sauf en combinaison avec la température (Y_4), et comme variable quadratique sur le rendement de coagulation ($p < 0.05$).

3. Effet du rapport L/S sur les réponses étudiées

La variable indépendante X_3 ayant un effet négatif sur toutes les réponses. Il est à noter que cette variable influence significativement Y_1 et Y_2 en tant que terme linéaire, Y_3 en combinaison avec le temps d'extraction ($p < 0.05$) et hautement significativement Y_2 en terme quadratique ($p < 0.01$).

II.4. Etablissement des équations polynomiales de deuxième degré

L'estimation des valeurs des coefficients des termes linéaires, d'interaction et quadratiques, nous a permis de constituer les équations (1), (2), (3), et (4) pour les réponses Y_1 , Y_2 , Y_3 et Y_4 comme suit :

$$Y_1 = 11.80 - 1.18X_1 - 0.64X_2 - 2.42X_3 + 0.67X_1X_2 + 3.01X_1X_3 + 2.93X_2X_3 - 4.40X_1^2 - 4.11X_2^2 - 0.85X_3^2 \dots\dots\dots(1)..$$

$$Y_2 = 16.02 - 3.65X_1 - 0.25X_2 - 7.02X_3 - 0.71X_1X_2 + 2.65X_1X_3 + 0.26X_2X_3 + 1.94X_1^2 - 2.46X_2^2 + 5.54X_3^2 \dots\dots\dots(2).$$

$$Y_3 = 61.78 - 10.75X_1 - 1.97X_2 - 8.01X_3 + 1.18X_1X_2 + 6.54X_1X_3 + 23.34X_2X_3 - 32.37X_1^2 - 6.38X_2^2 - 9.55X_3^2 \dots\dots\dots(3).$$

$$Y_1 = 8.18 - 0.05X_1 + 0.05X_2 - 0.26X_3 - 1.34X_1X_2 + 0.51X_1X_3 + 0.2X_2X_3 + 1.21X_1^2 + 0.23X_2^2 - 0.36X_3^2 \dots\dots\dots(4).$$

Les équations (1), (2), (3) et (4) résument l'influence des variables indépendantes sur les quatre réponses et l'effet est permet de comprendre les interactions entre les différents facteurs étudiés.

II.5.Analyse des surfaces de réponse

Les équations polynomiales de deuxième degré sont représentées graphiquement par des surfaces de réponse tridimensionnelles, dont les variables explicatives sont représentées deux à deux. A chaque fois deux variable sont variés et la troisième est fixée au niveau zéro **figure 20**. Ces surfaces de réponses visualisent l'effet des variables indépendantes sur les réponses et sert à déterminer les points optimaux pour chaque réponse.

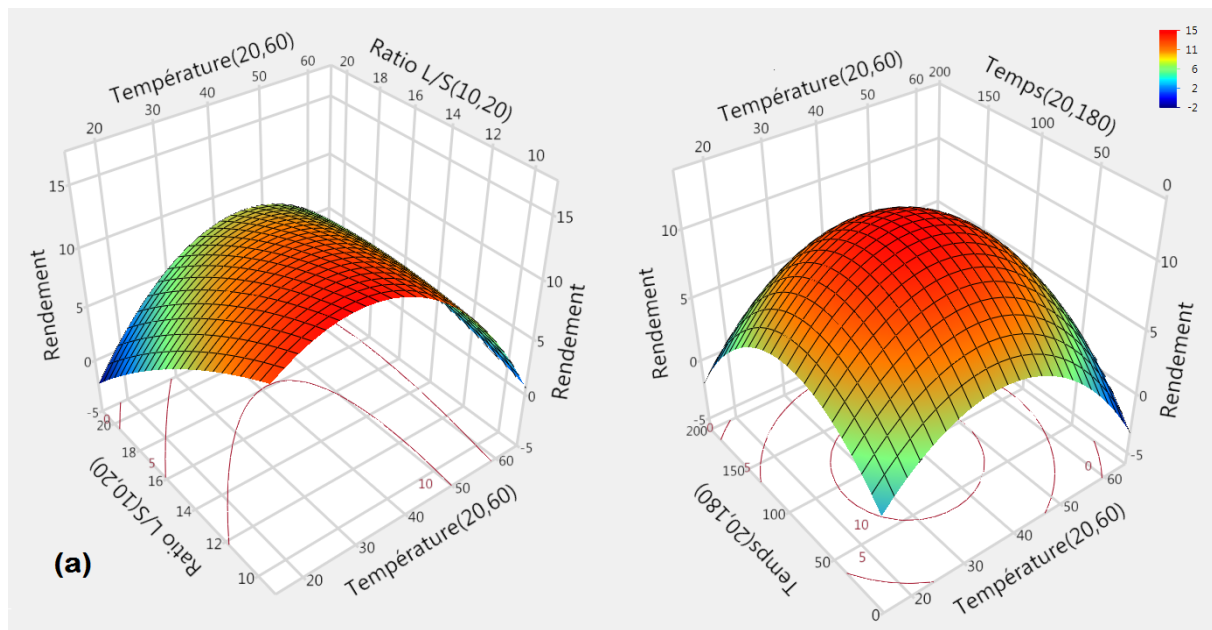


Figure 20 : Représentation tridimensionnelle des modèles polynomiales de deuxième degré de Rendement avec température et ration L/S.

Il ressort de la **figure 20** que le rendement de coagulation s'augmente avec l'augmentation de la température d'extraction jusqu' atteindre son maximum à une température de 35°C, après ce point en remarque une chute des valeurs de Y₁ avec l'augmentation de la température, cet est due à la dénaturation des enzymes coagulante du lait par la chaleur.

D'autre part, il est observé que l'augmentation du temps d'extraction améliore le rendement de coagulation, mais au de la de 100 minutes le temps joue un rôle négatif sur l'extraction du coagulant végétal, cela est due au risque de l'oxydation et la dénaturation des protéines en contact très long avec l'eau et surtout dans les températures élevées.

La présentation de l'effet des variables indépendantes sur la réponse Y_2 sont présente dans la **figure 21**.

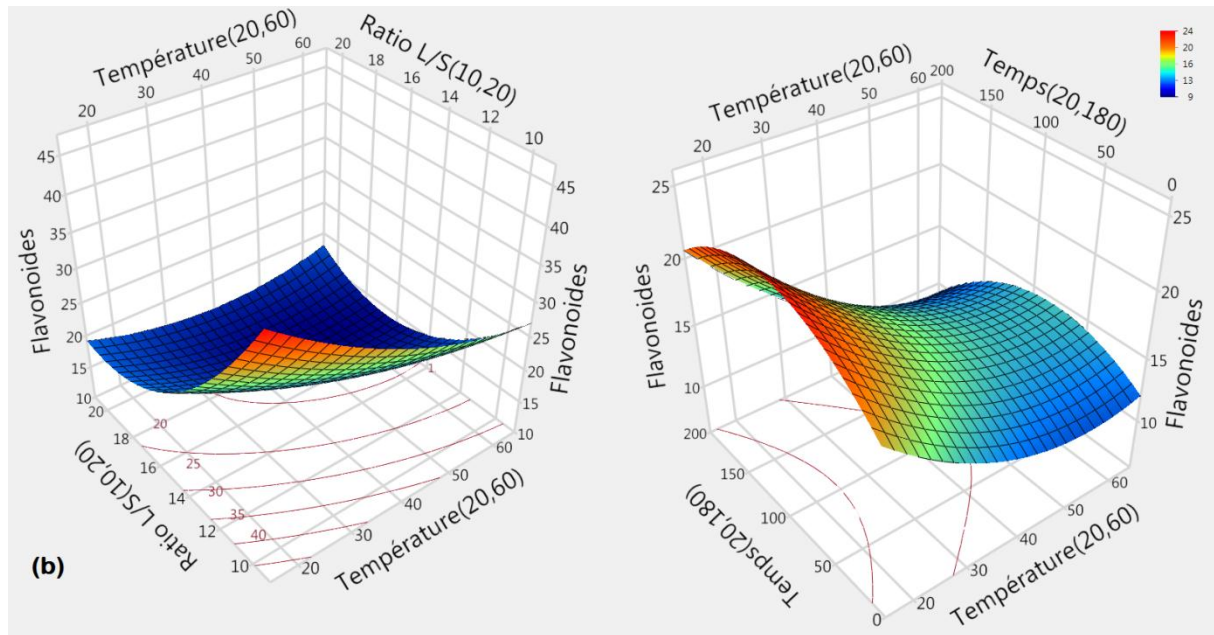


Figure 21 : l'effet des variables indépendantes sur la réponse Y_2

Il est noté d'après la **figure 21** que l'interaction entre le rapport L/S et la température en gendre un effet positif sur le taux des flavonoïdes jusqu'atteindre un maximum avec les niveaux minimum de X_1 et X_3 . De plus la réponse Y_2 est influencée positivement par le temps d'extraction en enregistrant son max à 150 min lorsque la température est gardée dans son niveau minimal.

La **figure 22** représente la variation des valeurs de l'activité anti radicalaire en fonction des variables indépendantes.

Le temps et le rapport L/S ayant en combinaison un effet positif sur la réponse Y_3 , cette dernière atteint sa valeur maximale lorsque ces deux facteurs sont maintenus à leurs niveaux minimaux. De l'autre part, Y_3 s'augmente avec la température jusqu'à 80%) température 40°C ; au delà de ce point, la température manifeste un effet négatif sur l'activité anti

radicalaire. Cette observation confirme la sensibilité de l'extrait aqueux des fleurs de *S. marianum* à la chaleur.

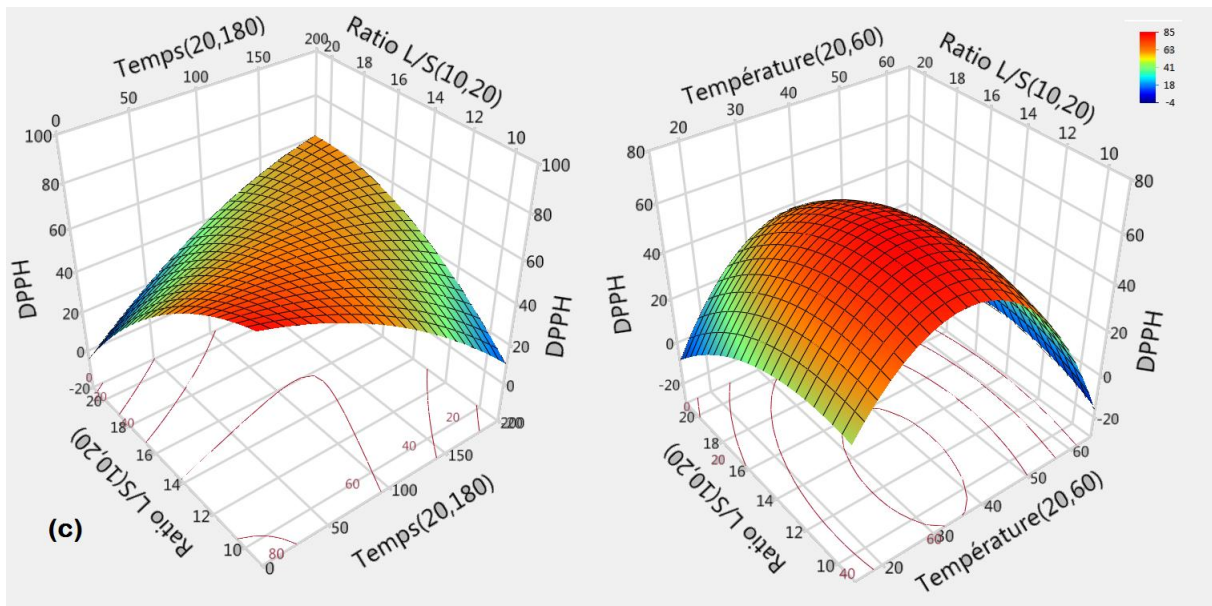


Figure 22 : la variation des valeurs de l'activité anti radicalaire en fonction des variables indépendantes.

Il est recommandé donc d'utiliser des températures qui ne dépassent pas les 40°C lors de l'extraction des composés actifs ou de la présure végétale à partir des fleurs de *S. marianum*.

En fin, d'après la présentation en surface de la réponse Y_4 **figure 23**, il est claire que l'interaction entre les deux variable X_1 et X_3 ayant un effet positif sur le taux des protéines qui atteint son valeur maximale l'orque la température et le rapport L/S sont dans leurs niveaux +1.

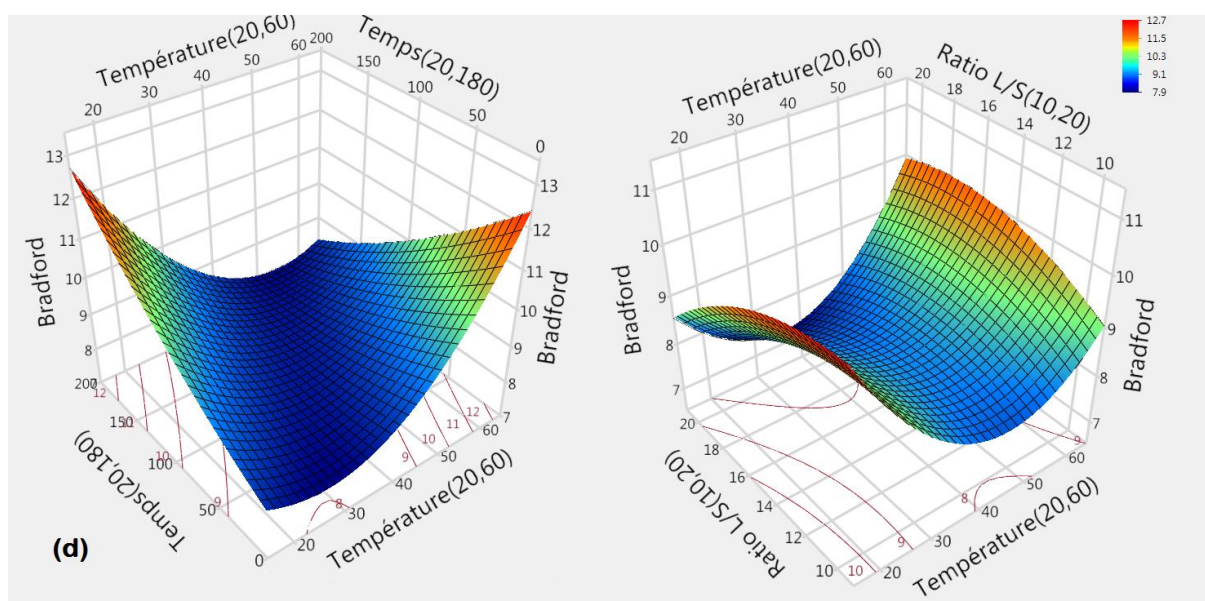


Figure 23 : la variation des valeurs de Bradford en fonction des variables indépendantes.

De même, l’extension de temps d’extraction influence positivement cette réponse, dont la valeur maximale est observée avec un temps d’extraction de 200 minutes.

II.6.Résultats de validation du model

La régression des équations polynomiale des quatre réponses nous a permet de déterminer les conditions optimales pour chaque réponse. La fonction de la désirabilité a été utilisée pour unifier les quatre solutions en une adéquate aux quatre réponses Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 à la fois **tableau 6**.

Tableau 6: Résultats de validation du model.

Variable indépendante	Valeurs critiques			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
Température (20,60)	20			
Temps (20,180)	76,5			
Rapport L/S (10,20)	10			
Rendement prévu	14.10	36.53	82.10	9.51

La validation du model requit une nouvelle extraction en utilisant les valeurs optimales pour chaque variable indépendante. L’extrait obtenu est testé pour son force coagulante, taux des flavonoïdes, activité anti radicalaire et la teneur en protéines.

An orange scroll graphic with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and rounded corners. The text is centered on the scroll.

Conclusion générale

Conclusion

De nos jours, un grand nombre des plantes médicinales de la nature présentent une source indéfinie des molécules bioactives, ces molécules résultant de métabolites secondaires produits à partir de métabolisme des nutriments, que sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicinales et agroalimentaires.

Notre étude nous a permis d'avoir une idée sur l'extraction des enzymes végétale à partir de la plante *Silybum marianum*, nous avons travaillé sur les différentes activités antioxydant (TAC, FRAP, DPPH), les propriétés phytochimiques (TPC, TFC, Tannin, et le dosage des protéines), et l'activité coagulante du lait par l'extrait des fleurs de cette plante.

Les résultats obtenus lors de notre étude montrent que la teneur en poly-phénol et en flavonoïdes est plus importante dans l'extrait aqueux que dans l'extrait éthanolique.

D'autre part le teneur en tannins est faible dans l'extrait aqueux par rapport à l'extrait éthanolique.

D'après Les résultats de dosage des protéines on obtient que la teneur le plus bas est enregistrer dans l'extrait aqueux, mais les extrais éthanolique et TCA la teneur des protéines sont égaux.

Cependant, pour le piégeage du radical libre DPPH et en comparant les IC50 des différents extraits testés par rapport à l'acide ascorbique, nous avons remarqué une activité antioxydante très importante dans l'extrait aqueux.

Nous avons constaté pour l'activité antioxydante par la méthode réduction de fer (FRAP), que l'extrait de la plante étudiée ont une capacité fort de réduire le fer (qui augmente en fonction de la concentration) par rapport à l'extrait éthanolique qui est comparé à l'acide ascorbique.

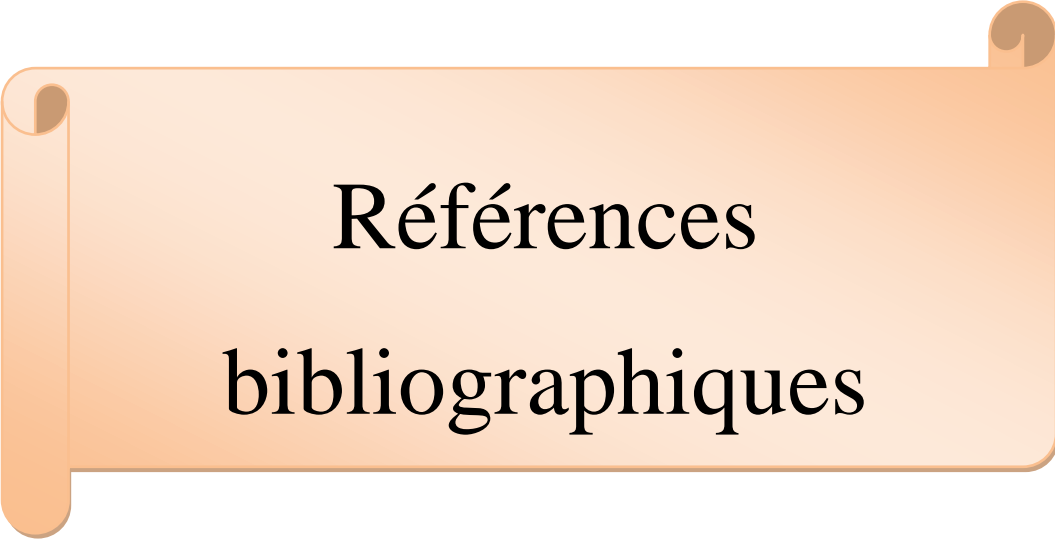
Par ailleurs, à partir des résultats d'activité antioxydant totale, on a remarqué que l'activité d'extrait aqueux est plus fort à celle d'extrait éthanolique.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons dire que *Silybum marianum* es triche en Phénols Totaux, en Flavonoïdes et en protéines. L'extrait aqueux donne une bonne activité antioxydante totale soit une capacité de piégeage de radicaux libres, un pouvoir réducteur de fer

Selon les résultats d'optimisation par plans d'expérience ont montré le bon ajustement du model avec un effet hautement significatif et une haute corrélation entre les valeurs prévues par le model et les valeurs expérimentales. L'analyse des surfaces de réponse nous a permit de déterminer les valeurs optimales pour chaque facteur (température, temps, ratio S/L). La validation du model en utilisant les meilleures conditions de coagulation nous a données des meilleure rendements .

Notre perspective d'avenir est d'effectuer d'autres analyses telles que :

- L'identification des différents constituants de *silybum marianum*, par HPLC-MS.
- Tester l'aptitude des extraits de la plante à développer d'autres activités biologiques en utilisant différentes techniques.



Références
bibliographiques

A

- Abi azar R., 2007** .Complexassions des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier Propriétés technologiques des coagulums obtenus. 196p. thèse doctorat. Agroparistech.
- Agioux L., 2003**. Conception et validation d'un outil d'aide à l'estimation de l'état sensoriel des fromages en cours d'affinage. 192p. thèse doctorat. Institut National Agronomique de Paris Grignon
- Agroligne., 2001**. Revue N°14 –Avril –Mai
- Aissaoui O., Zitoun M., Zidoune N., 2006**. Le fromage traditionnel algérien "BOUHEZZA". Séminaire d'Animation Régional. Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments '. INSAT – Tunis, Tunisie 27 – 28 – 29 novembre
- Alais. C.** Sciences du lait: Principes et techniques laitiers. IVe édition, Ed. SEPARC, Paris, 1984,814 p.)
- Anonyme1**. Quotidien Algérien d'Information. La filière agroalimentaire en Algérie. (Mardi, 20 Décembre 2016). http://www.reflexiondz.net/La-filiere-agroalimentaire-en-Algerie_a21396.html.
- Anonyme 2** . Presse Service. Agriculture: de nouvelles mesures pour la relance de la filière lait Algérie. (lundi, 02 novembre 2015). <http://www.aps.dz/economie/30864-agriculture-denouvelles-mesures-pour-la-relance-de-la-fili%C3%A8re-lait>.
- Anonyme 3** . Hakim, A. L'Algérie deuxième marché du fromage irlandais. Tout Sur l'Algérie TSA. Quotidien Electronique. (26 décembre 2011). http://archives.tsa-algerie.com/economieet-business/l-algerie-deuxieme-marche-du-fromage-irlandais_17445.html.
- Anonyme. (1984)**. Document technique n°01. Station nationale d'essais de semences. Liste alphabétique des principales espèces de plantes cultivées et des mauvaises herbes. Noms latins et noms communs français. 2eme Ed. Ed Geues.
- A. Carillon, J.-C. Charrié, C. Cieur, C. Saigne-Soulard.(2017)** . Plantes médicinales. phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique. Ed. lavoisier.fr.p257,264.

B

Barceloux, D. G . (2008). Medical toxicology of natural substances. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Beloued. A. (2001). Plante médicinales d'Algérie. Ed. ISBN. p68

Benkerroum N. 2013. Traditional Fermented Foods of No African Countries: Technology and Food Safety Challenges With Regard to Microbiological Risks. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 12:54

Benhammou N., Bekkara A., Kadifkova P. 2007. Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf, Advances in Food Sciences,29(3) :155-161.

Benkerroum N., Tammime A. Y. (2004). Technologytransfer of sometraditionaldairyproducts (*lben, jbenand smen*) to smallindustrialscale. *Food Microbiolgy.* (21) 399-413

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantifies of protein, utilizing the principal of protein. Dye binding, Analytique Biochemistry: 248-254.

Brule G., Lenoir J. et Ramet J.P., 1997 . Les mécanismes généraux de transformation du lait en fromage, chapitre I, la micelle de caséine et la coagulation du lait. Pp. 7 à 39. Dans le fromage. Coord. ECK A., et GILLIS J.C. 3ème édition Tec et Doc. Lavoisier. 875 P.

C

Cayot, P. Et Lorient D.(1998). Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris.281p.

Charrié. JC ; Chastel .B ; Cieur. C; Combe .P; Damak .M; Hedayat.K; Saignesoulard .C. (2017). Plantes médicinales, Phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique, ED, Lavoisier Tec & Doc : 256-257-260-261-262,264

Chlopeikova, A., Psotova, J., Miketova, P., & Simanek, V. (2004). Chemopreventive effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. *Phytotherapy Research,* 18, 107e110.

Canter, P.H., Thomas, H., Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 23, 180–185.

D

Dauvillier P., Adrian J., Potus., Poiffait A. (1998). Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Technique et documentation. *Tec. Doc. Lavoisier*, Paris: 48,49.

David, V. et Forte, R. (1998). Guide national des bonnes pratiques en production fromagère fermière. 2e éd. Paris : Institut de l'élevage, Fiche I, 15-19.

Daviau C., Marie-Hélène F., Alice P., Henri G., Jean-Louis M., (2000). Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment).

Das, S. K., Mukherjee, S., & Vasudevan, D. M. (2008). Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin: an overview. *Natural Product Radiance*, 7, 182,192. **Décret n°88-1206** du 30 décembre 1988 portant application de la loi du 1er août 1905 sur les fraudes et falsifications en matière de produits ou de services et de la loi du 2 juillet 1935 tendant à l'organisation et à l'assainissement du marché du lait en ce qui concerne les fromages.

DerMarderosian, A. (2001). The review of natural products (1st ed.). St Louis, MO: Facts and Comparisons.

Desplaces, J., Choppin, G., Vogel, G., & Trost, W. (1975). The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning. *Arzneimittel forschung*, 25, 89e96.

Deysson, G. (1979). Organisation et classification des plantes vasculaires. 2eme parties.

Dixit, N., Baboota, S., Kohli, K., Ahmad, S., & Ali, J. (2009). Silymarin: a review of pharmacological aspects and bioavailability enhancement approaches. *Indian Journal of Pharmacology*, 39, 172e179.

E

Eck A., Gillis J.C. (1997). Le Fromage, De la science à l'assurance qualité ; 3e éd-Paris, 891p.

Evans, W.C. Trease and Evans.(2000). Pharmacognosy, 15 Edition, W.B. Saunders, London, pp: 3-4,488-491.

F

F.A.O. (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Rome(Italie).Collection FAO : Alimentation et nutrition °28ISBN 92-5-20534-6.

Ferenci, P., Dragosics, B., & Dittrich, H. (1989). Randomised controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Hepatology*, 9, 105e113.

Fiebrich, F., & Koch, H. (1979). Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experientia*, 35, 150e152

Froc J., Gilibert J., Daliphar T., Durand P. (1988). Composition et qualité technologique des laits de vaches Normandes et Pie-Noires. 1. Effet de la race. *INRA Prod. Anim.*, 1, 171-17

Froc J. (2001) . Des jus de fruits ou de plantes pour faire du fromage. *INRA mensuel* n°110,41-42.

G

Gelais ST-D. Tirrard-Coller P., Belanger G., Drapeau R., Couture R. (2002).

Le fromage **In** Science et technologies du lait transformation du lait par Vignola Carole L. presse internationale polytechnique. 349-413pp

Goudéranche H., Camier-Caudron B., Gassi J-Y., Schuck P. (1999).

Procédés de transformation fromagère (partie 1) F 6305, *Techniques de l'Ingénieur*, traité Agroalimentaire, vol. F1

Goursaud, J.(1985). Composition et propriétés physico-chimiques.In : LUQUET, F.M. - Laits et produits laitiers.1ère éd. Paris : Technique et documentation Lavoisier, Vol.1, Chap.1, 1-90.

Gresta, F., Avola, G., Guarnaccia, P.(2007). Agronomic characterization of some spontaneous genotypes of milk thistle (*Silybum marianum* L Gaertn.) in Mediterranean environment. *J. Herbs Spices Med. Plants* 12, 51–60.

Guignard J.L. (1998). Botanique. 11eme ED. Ed Masson. NP 278.

H

Hallal A. (2001). Fromages traditionnels algérien. Quel avenir ? Revue agroligne n° 14, Avril-Mai.

Harborne, J.B. (1973). Phytochemical methods, London. Chapman and Hall, Ltd., pp: 49-88.

Herbert S. A., Riaublanc B., Bouchet D., Gallant J., and Dufour E. (1999) . Fluorescence spectroscopy investigation of acid or rennet-induced coagulation of milk. *J Dairy Sci*82:2056.

I

Ikonen T. (2000). Possibilities of geneticimprovement of milk coagulation properties of dairycows. Academic dissertation. University of Helsinki, dept of animal science.

Isbilir, S.S., Orak, H.H., Yagar, H., Ekinici, N.(2012). Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol.*, 11, 223 237.

J

Jamei.R et Anvari D.(2018). Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some Asteraceae species.43 – 47

K

Kaci M. et Sassi Y. (2007). Industrie laitière et des corps gras, Recueil des fiches sous sectorielles. EDPme. 44 P.

Katz H., Weaver W.W. (2003). Encyclopedia of food and culture. Volume 1: Acceptance to foodpolitics. 718p. Charles Scribner's Sons. New York

Karkanis, A., Bilalis, D., Efthimiadou, A. (2011). Cultivation of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.), a medicinal weed. *Industrial Crops and Products* 34, 825-830

Kshirsagar, A., Ingawale, D., Ashok, P., & Vyawahare, N. (2009). Silymarin: a compréhensive review. *Pharmacognosy Reviews*, 3, 116e124.

Katiyar, S. K., Korman, N. J., Mukhtar, H., & Agarwal, R. (1997). Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *Journal of National Cancer Institute*, 89, 556e566

L

Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 1073P

Lemouchi, L. (2007). Le fromage traditionnel *Bouhezza*: enquête dans la wilaya de Tébessa et suivi de l'évolution des caractéristiques physicochimiques de deux fabrications. Mémoire d'ingénieur en Nutrition et Technologies Agro-Alimentaires. Aissaoui Zitoun, O. Université de Constantine 1. Algérie.

Lo Piero A.R., Puglisi I. Et Petrone G. (2002) . Characterization of lettuce, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2439- 2443.

M

Macheboeuf D., Coulon J.B., D'Hour P. (1993). Effect of breed, protein genetic variants and feeding on cow milk coagulation properties. *J. Dairy Res.*, 60, 43-54.

Magliulo, E., Gagliardi, B. et Fiori, G. P. (1978). Results of a double blind study on the effect of silymarin in the treatment of acute viral hepatitis, carried out at two medical centres. *Medizinische Klinik*, 73, 1060e1065.

Mahamedi, A. E. (2015). Etude des qualités : hygiénique, physicochimique et microbiologique des ferments et des beurres traditionnels destinés à la consommation dans différentes régions d'Algérie. Mémoire de Magister en Biologie. Benlahcen K. Université d'Oran. Algérie. 111p.

Mahaut M., Jeantet R., ET Brule G. (2000). Initiation à la technologie fromagère, Tec&Doc, ed.

Majdi A. (2009). Séminaire sur les fromages AOP et IGP .INT-Ingénieur agronomie ,88pages.

Mietton B. (1995) . La typologie des fromages, Symposium organisé par la fondation des Gouverneurs et le centre de recherche et de développement sur les aliments d'agriculture et Agroalimentaire Canada, octobre, 245p.

Mistry V.V., Brouk M.J., Kasperson K.M., Martin E. (2002). Cheddar cheese from milk of Holstein and Brown Swiss cows. *Milchwissenschaft*, 57, 19-23

Mouzali L., Aziza M., Bensiamer-Touati., Benateya H. (2006). A cardoon (*Cynara cardunculus* L.) used as vegetable rennet in an Algerian traditional cheesemaking. *Djben ISHS acta horticulturae* 660 : V International Congress on Artichoke. **u. (1975)**. Mon herbier de santé. Les plantes qui guérissent. Ed Robert Laffont, Paris, 334 p.

Montemurro, P., Fracchiolla, M., Lonigro, A. (2007). Effects of some environmental factors on seed germination and spreading potential of *Silybum marianum* Gaertner. *Ital. J. Agron.* 3, 315–320.

Montgomery D.C. (2009). Design and analysis of experiments, 5eme ed. John Wiley & Sons, Inc., New York: 5

Moayedi Esfahani, B.A. Reisi, aei N. et Mirmoghtadei, M. (2015). Evaluation the safety and efficacy of silymarin in b-thalassemia patients : A review. *Hemoglobin*, 39, 75-80.

Myers, N, RA. Mittermeier, CG. Mittermeier, GAB. da Fonseca, J. Kent. (2000). *Nature*. 403 : 853.

N

Nwabueze T.U. (2010). Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimization in the food systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9): 1768–1776.

O

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

P

Pastor, I., Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Plant Sci.* 20, 522–531.

Payne M., Morison K. (1999). A multi-component approach to salt and water diffusion in cheese." *International Dairy Journal*, 9, 887-894. (ABSTRACT)

Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*

Q

Quézel.P ; Santa.S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales Tome 2, ED, CNRS : 804,806, 1011p.

R

Rahali, V. and Menard, J.L.(1991). Influence des variants génétiques de la Blactoglobuline et de la k-caséine sur la composition du lait et son aptitude fromagère. *Lait*, 71: 275–297.

Ramet J.P. (1987). La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes.

Dans *Le fromage* (Coord. ECK A.), Tec et Doc. Lavoisier, pp 101-107, 539 p.

Ramet J.P. (1997). L'égouttage du coagulum. Dans *Le fromage* (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.). 3ème édition, Ed. Tec et Doc. Lavoisier. p. 43.

Ramet J.P. (1997). La préparation du caillée, 1- : La présure et les enzymes coagulantes (p. 101-107). Dans *Le fromage* (Coord. ECK A. et GILLIS J.C.) , 3ème ed. Tec et Doc. Lavoisier.

Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M.O., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B.(2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Plant Sci.* 20, 522–531

Riahi M H. (2006). Modélisation des phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques intervenant lors de l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée. 200p. Thèse doctorat. Institut national agronomique paris-grignon.

S

Simal S., Sanchez E., Bon J., Femenia A., and Rossello C. (2001). Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 48, 269-275. (ABSTRACT)

Sofowara, A. (1993). Medicinal plants and Traditional medicine in Africa. Spectrum Books Ltd. Ibadan, Nigeria, pp: 289.

Soryal, K.A., Zeng, S.S., Min, B.R. and Hart, S.P. (2004). Effect of feeding treatments and lactation stages on composition and organoleptic quality of goat milk domestic cheese. Small R **Smith, T., Lynch, M., Johnson, J., Kawa, K., Bauman, H., Blumenthal, M., 2015.** Herbal dietary supplement sales in US increase 6.8% in 2014. *Herbal Gram* 107, 52-59 **uminant Re.,52:** 109–116.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

Sindel.BM. (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia, *Weed Research*, 31: 189,201.

SPICHIGER, R. E., SAVOLAINEN, V. et FIGEAT M. (2000). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. 1^{ier} Ed. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes. 372p.

T

TantaouiElarki A., ELmarakchi A. (1987). Study of the Moroccan dairy products *Lben and smen .MircenJ . 3,* 211-220

Touati. (1990). chimie d'un fromage artisanal algérien "la klila". Mémoire d'ingénieur, INATAA, Constantine, Algérie, 83 p.

Tinsson W. (2010). Plans d'expérience, construction et analyse statistique. *Springer:* 4-5p

V

Vignola, C. (2002). Science et technologie du lait: transformation du lait. Presses inter Polytechnique

Vilain, A. C.(2010). Qu'est-ce que le lait? . *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127).

Vogel, G. Tuchweber, B., Trost, W., & Mengs, U. (1984). Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 73, 355e362.

W

Wagner, H., Horhamer, L., Munster, R. (1965). Structure of a new flavonoid from the *Silybum marianum* fruits. *Die Naturwissenschaften* 52, 305

Wang, M. J., Lin, W. W., Chen, Y. H., Ou, H. C., & Kuo, J. S. (2002). Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. *European Journal of Neuroscience*, 16, 2103e2112.

WEBER F. (1987). L'égouttage du coagulum. Dans le fromage (coord. ECK A), 2eme Édition. p122.

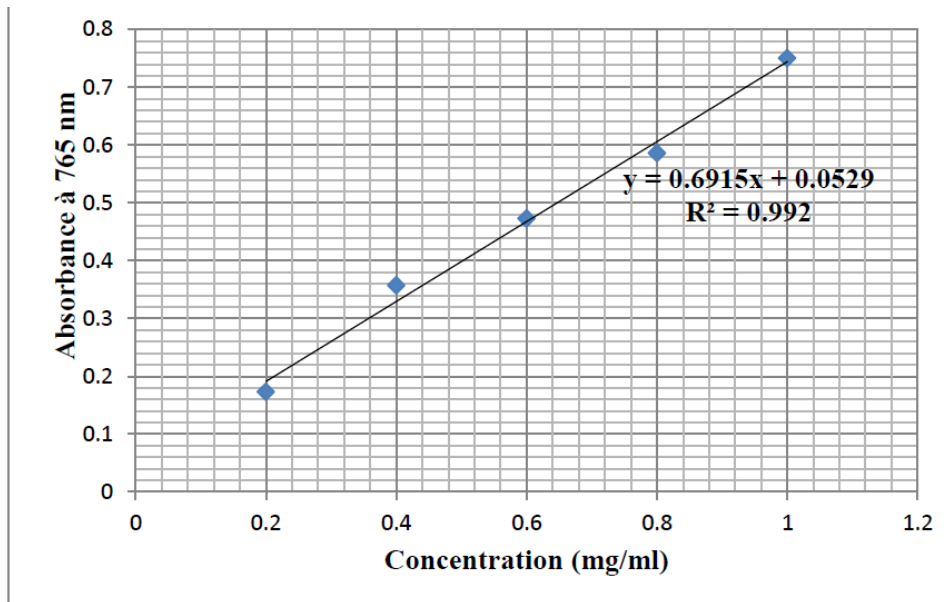
Z

Zaidi O. (2002).Caractérisation du fromage traditionnel bouhezza; caratirisation physicochimique et microbiologique. Mémoire d'ingénieur INATAA. Constantine, Algérie.51 p.

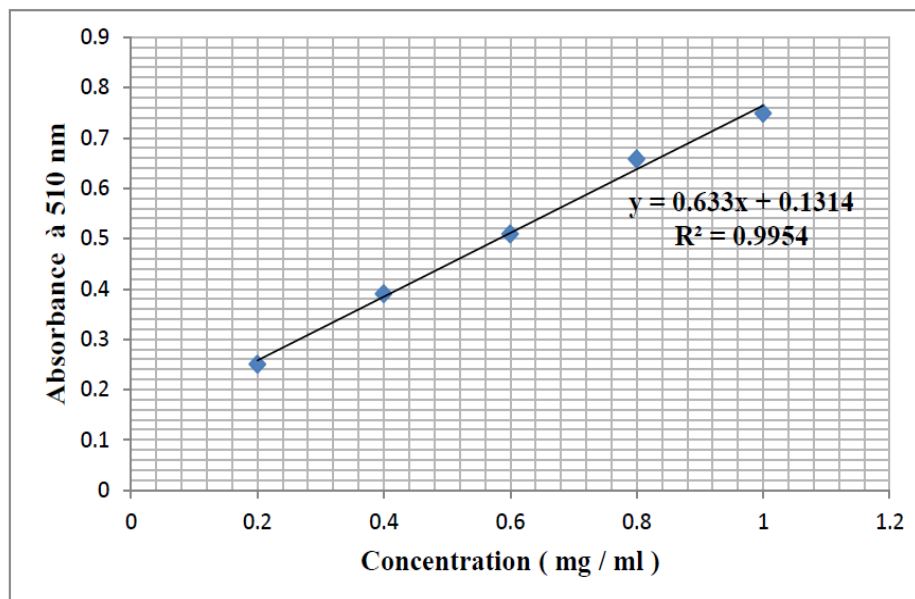
Zhishen J., Mengcheng T. et Jianming W. (1999). Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials, *Food Chemistry*, 64: 555-556.



Annexes



Annexe 1 : Courbe d'étalonnage de l'Acide gallique



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de quercétine

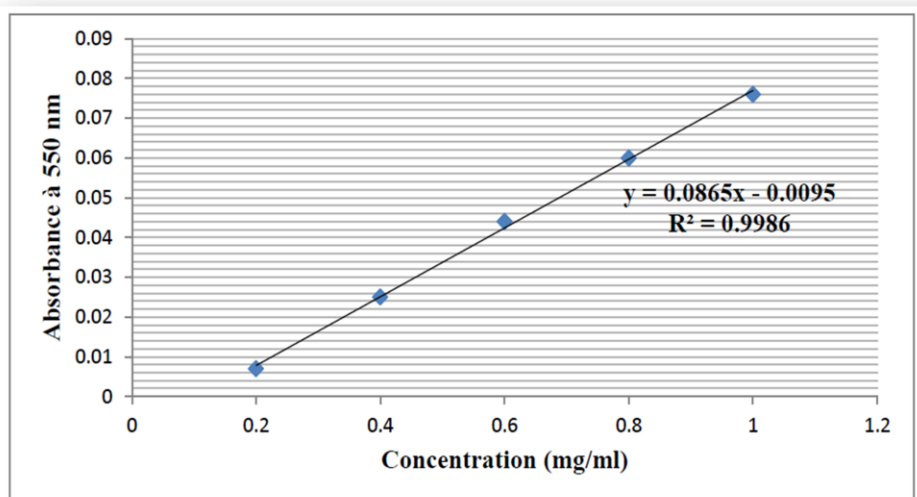
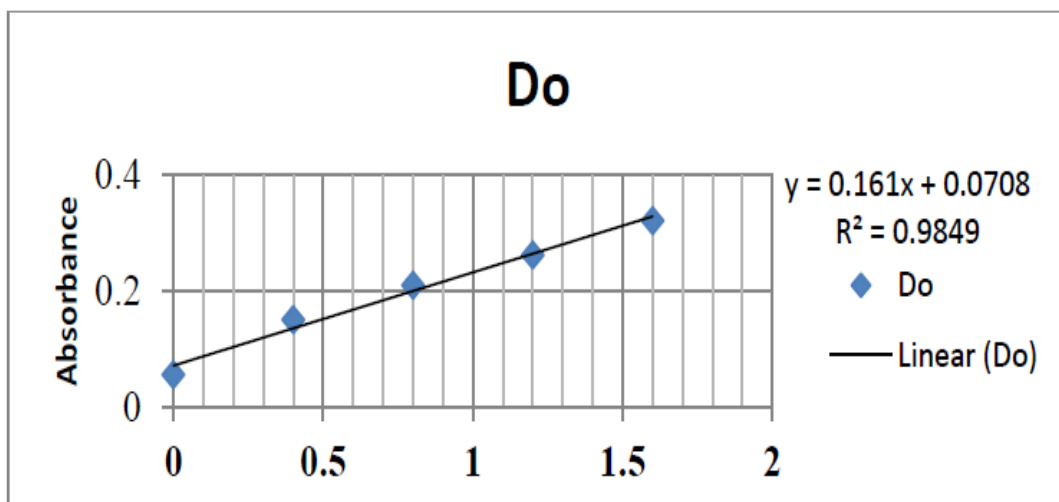
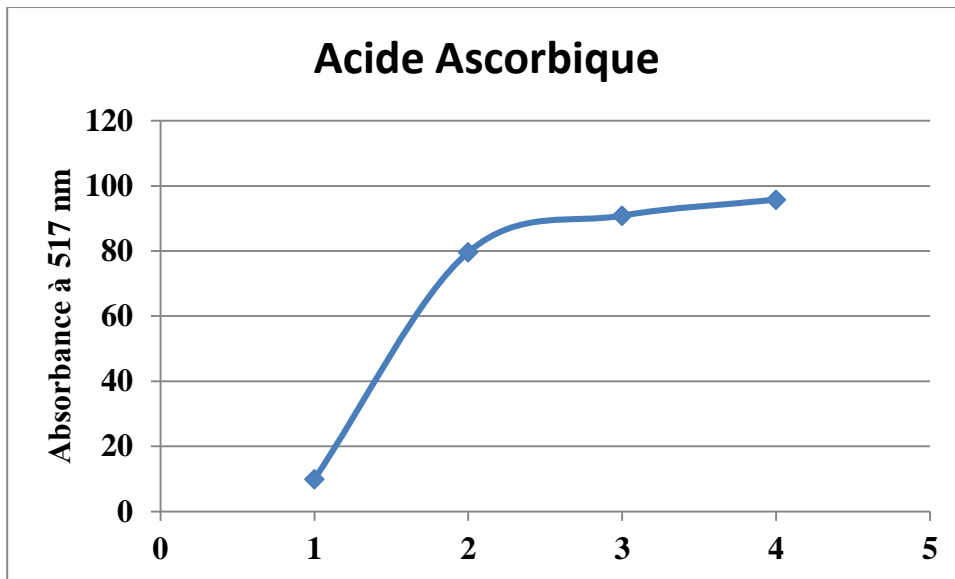


Figure 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

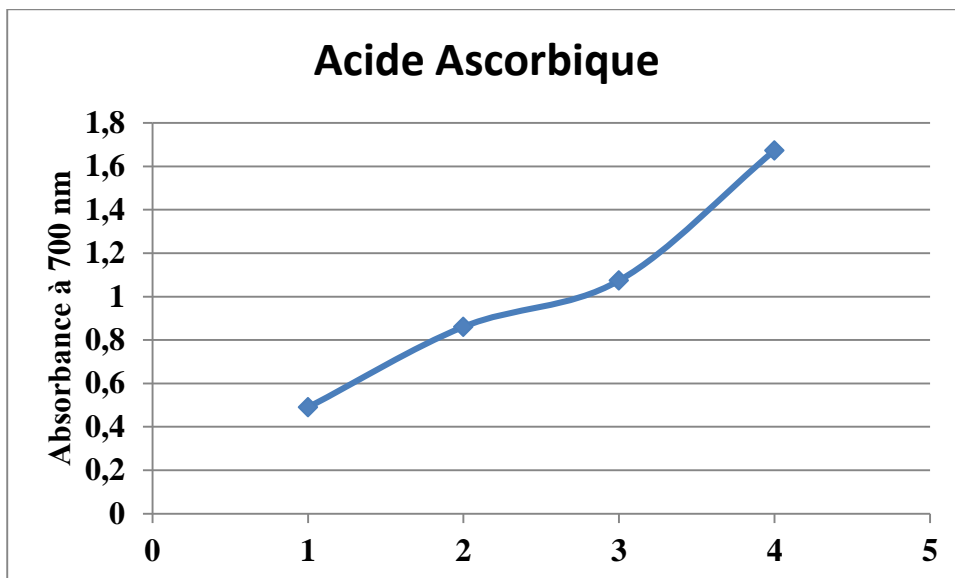
Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de catéchine



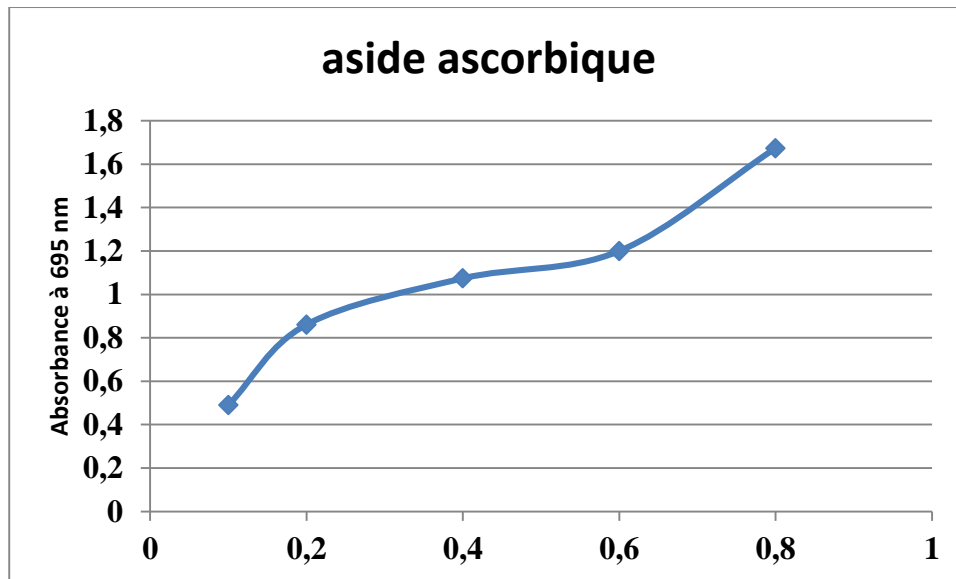
Annexe 4 : La courbe d'étalonnage de protéine



Annexe 5 : La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique de Dpph



Annexe 6 : La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique de FRAP



Annexe7: La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique de FRAP

Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Il est souvent nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des différentes protéines d'un milieu, c'est pourquoi on cherche à mettre en œuvre des réactions capables de révéler toutes les protéines. **(Bradford, 1976).**

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. **(Bradford, 1976).**

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution. Le test est basé sur l'observation que le maximum d'absorbance pour une solution acide de bleu de Coomassie G-250 passe de 465 nm à 595 nm lors que la liaison à la protéine se produit **(Bradford, 1976).**

Contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine. C'est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines) et très rapide. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes **(Bradford, 1976)**.

La méthode de Bradford utilise les propriétés de bleu brillant de Coomassie (BBC) à se fixer sur les acides aminés basiques (l'arginine en particulier) et aromatiques; il en

résulte une modification des propriétés spectrales du bleu de Coomassie qui, une fois complexé, présente un maximum d'absorbance à 595 nm (**Dauvillier, 1998**).

On utilise le bleu brillant de Coomassie (G250) comme réactif. Les résultats sont exprimés en équivalent albumine (l'albumine de sérum de boeuf BSA (20mg /ml), produit de référence servant à la standardisation (**Dauvillier, 1998**).



Résumés

Résumé

Silybum marianum Est cultivé comme plante médicinale, mais il peut aussi s'agir d'une mauvaise herbe gênante. Le chardon-Marie est originaire du bassin méditerranéen et est maintenant répandu dans le monde entier. Est aussi une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de la famille des Asteraceae, Connue sous le nom Chouk el djemel.

Cette étude effectuée sur l'extrait éthanolique et aqueux des fleurs de *S. marianum*, qui sont obtenu par macération à froid en utilisant comme solvant éthanol / eau. Les tests phytochimiques on relevé que cette plante est riche en poly-phénol, flavonoïdes tannins condensé, protéine. La teneur en phénols totaux est variable, l'extrait aqueux des fleurs présente une teneur de **40.42** (mg EAG/g d'extrait), tandis que l'extrait éthanolique est **29.66** (mg EAG/g d'extrait). La teneur des flavonoïdes a été déterminée par Quercitine (EC), une teneur de **0.41** (mg EC/g d'extrait) pour l'extrait aqueux alors que pour l'extrait éthanolique est de **0.11** (mg EC/g d'extrait). La teneur des protéines à été déterminé par méthode de Bradford (**1976**), dans l'extrait aqueux une teneur de **61.63** (mg /ml), alors que l'extrait éthanolique et l'extrait TCA sont **63.56** (mg/ml). Les résultats obtenus pour de l'activité antioxydante par le radical libre diphényle picrylhydrazyle (DPPH) montrent que les extraits possèdent un faible pouvoir de piéger ce radical avec des **IC50** de l'ordre de **1.8** (mg/ml) pour l'extrait éthanolique et pour l'extrait aqueux **0.48** (mg/ml). L'évaluation réducteur du fer (Test FRAP : Ferric Reducing Antioxydant Power) des deux extrait est égale à **EC50 = 0.34** (mg/ml) pour l'extrait aqueux et **EC50 = 0.45** (mg/ml). Les résultats de l'évaluation de l'activité montre que l'extrait aqueux est plus fort de l'ordre de **0.14** (mg/ml), et de **0.11** (mg/ml) pour l'extrait éthanolique. Les résultats de l'optimisation montrent des effets hautement significatifs de la température et le temps el ratio L/S sur le rendement de coagulation.

Mot clés :

Silybum marianum, activité antioxydant, pouvoir réducteur, optimisation, coagulation.

ملخص

تزرع *Silybum marianum* كنبات طبي ، لكنها يمكن أن تكون أيضًا عشبًا مزعجًا. الحليب الشوك هو موطن الأصلي لحوض البحر الأبيض المتوسط وينتشر الآن في جميع أنحاء العالم. هو أيضا نبات عشبي سنوي أو كل سنتين من عائلة Asteraceae، والمعروفة باسم Chouk الجميل.

أجريت هذه الدراسة على المستخلص الإيثانولي والمائي لزهور *S. Marianum* ، التي يتم الحصول عليها عن طريق البرد ، وتستخدم كمذيب للإيثانول / الماء. وكشفت الاختبارات الكيميائية النباتية أن هذا النبات غني بالبولىفينول وتانين الفلافونويد المكثف والبروتين. إجمالي محتوى الفينول متغير، يحتوي المستخلص المائي للزهور على نسبة 40.42 (مستخلص EAG / جم) ، بينما مستخلص الإيثانول 29.66 (مستخلص EAG / جم). تم تحديد محتوى الفلافونويد بواسطة (EC Quercitin) ، وهو محتوى 0.41 (EC mg / g مقتطف) للمستخلص المائي بينما بالنسبة لمستخلص الإيثانول هو 0.11 (مستخلص EC مجم / جم) . تم تحديد محتوى البروتين عن طريق طريقة برادفورد (1976)، في المستخلص المائي محتوى 61.63 (ملغ / مل)، في حين أن استخراج الإيثانول ومستخلص TCA هي 63.56 (ملغ / مل). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها عن نشاط مضادات الأكسدة بواسطة ثنائي فينيل هيدروزيليل الراديكالي الحر (DPPH) أن المستخلصات لديها قدرة منخفضة على حبس هذه الراديكالية مع IC50 بقيمة 1.8 (ملغم / مل) للاستخراج الإيثانولي وللاستخراج المائي 0.48 (ملغ / مل). إن اختبار الحديد المختزل (FRAP: الحد من مضادات الأكسدة الحديدية) للمستخلصين يساوي EC50 = 0.34 (ملغم / مل) للمستخلص المائي و EC50 = 0.45 (ملغم / مل). تظهر نتائج تقييم النشاط أن المستخلص المائي وأقوى في حدود 0.14 (ملغم / مل) ، و 0.11 (ملغم / مل) للمستخلص الإيثانولي. تظهر نتائج التحسين آثارًا بالغة الأهمية لنسبة درجة الحرارة والوقت L / S على عائد التخثر.

كلمات مفتاحية:

Silybum marianum ، نشاط مضادات الأكسدة ، تقليل الطاقة ، التحسين ، التخثر.

Abstract

Silybum marianum is cultivated as a medicinal plant, but it can also be a troublesome weed. Milk thistle is native to the Mediterranean Basin and is now spread all over the world. Is also an annual or biennial herbaceous plant of the family Asteraceae, known as Chouk el djemel

This study carried out on the ethanolic and aqueous extract of *S. marianum* flowers, which are obtained by cold maceration, uses as ethanol / water solvent. Phytochemical tests revealed that this plant is rich in polyphenol, condensed tannin flavonoids, protein. The total phenol content is variable, the aqueous extract of the flowers has a content of 40.42 (mg EAG / g extract), while the ethanolic extract is 29.66 (mg EAG / g extract). The flavonoid content was determined by Quercitin (EC), a content of 0.41 (EC mg / g extract) for the aqueous extract while for the ethanol extract is 0.11 (EC mg / g extract) . The protein content was determined by the method of Bradford (1976), in the aqueous extract a content of 61.63 (mg / ml), while the ethanolic extract and the TCA extract are 63.56 (mg / ml). The results obtained for the antioxidant activity by the free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) show that the extracts have a low power to trap this radical with IC50 of the order of 1.8 (mg / ml) for the ethanolic extract and for the aqueous extract 0.48 (mg / ml). The reductive iron (FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power) test of the two extracts is equal to EC50 = 0.34 (mg / ml) for the aqueous extract and EC50 = 0.45 (mg / ml). The results of the evaluation of the activity shows that the aqueous extract and stronger in the order of 0.14 (mg / ml), and 0.11 (mg / ml) for the ethanolic extract. The results of the Optimization results show highly significant effects of temperature and time el L / S ratio on coagulation yield.

Keywords:

Silybum marianum, antioxidant activity, reducing power, optimization, coagulation.