



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
Mémoire de fin d'études

Présenté par

M<sup>elle</sup> CHOUARFIA Meroua

M<sup>elle</sup> CHEHIDA Soumia

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes**

THÈME

**Effet de l'extrait aqueux de *Mentha piperita.L* sur la  
croissance du germe *Streptococcus thermophilus*  
caractéristique du yaourt.**

Soutenu publiquement le ..../..../2020

DEVANT LE JURY

Présidente :	M <sup>me</sup> . AIT CHABAN.O	M.C.B	U. Mostaganem
Encadreur :	M.AIT SAADA. D	M.C.A	U. Mostaganem
Examineur :	M <sup>me</sup> . NAAS.A	M.A.A	U. Mostaganem
Invitée :	M <sup>me</sup> . GUEMIDI.C	Doctorante	U. Mostaganem

## **Remerciements :**

*Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout-puissant de nous avoir donné le privilège d'étudier et de suivre le chemin de la science.*

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Monsieur AIT SAADA Djamel**, maitre de conférences classe A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-mostaganem et **Mme GUEMIDI Chafika** qu'on remercie vivement pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce modeste mémoire.*

*Nous sommes conscientes de l'honneur que nous a fait **Mme AIT CHABANE Ouiza** en tant que présidente du jury du mémoire et **Mme. NAAS.Awda** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent, en fin, à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette présente étude.*

## Liste des abréviations:

**EAG** : Equivalent d'acide gallique.

**EQ** : Equivalant Quercitain

**MS** : Matière Sèche.

**MH** : Mueller Hilton.

**CMB** : Concentration minimale bactéricide.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**UFC** : Unité formant colonie.

**S** : Taux de survie du microorganisme en %

**df-di** : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures

**Df-Di**: différence de densité optique sans extraits de Menthe avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.

**ADN**: Acide Désoxyribose Nucléique.

**ARN** : Acide Ribose Nucléique.

## Liste des figures :

<b>Figure 1.</b> Morphologie de la menthe poivrée .....	<b>05</b>
<b>Figure 2.</b> Inflorescence et feuille de la menthe poivrée .....	<b>05</b>
<b>Figure 3.</b> Protocole d'extraction .....	<b>21</b>
<b>Figure 4.</b> Filtration après macération .....	<b>21</b>
<b>Figure 5.</b> Évaporation du solvant (eau) sous vide par Rota vapor .....	<b>22</b>
<b>Figure 6.</b> Activation de la souche lactique <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	<b>23</b>
<b>Figure 7.</b> Méthode de contact direct.....	<b>25</b>
<b>Figure 8.</b> Méthode des disques par diffusion sur milieu de Muller Hinton.....	<b>26</b>
<b>Figure 9.</b> Détermination de CMI.....	<b>28</b>
<b>Figure 10.</b> Détermination de CMB .....	<b>29</b>

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1.</b> Constituants principaux de la menthe poivrée .....	<b>07</b>
<b>Tableau 2.</b> Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone .....	<b>10</b>
<b>Tableau 3.</b> Activités biologiques des composés phénoliques .....	<b>13</b>
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques de <i>Streptococcus thermophilu</i> .....	<b>17</b>
<b>Tableau 5.</b> Teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait aqueux et de matière végétale de <i>Mentha piperita.L</i> .....	<b>30</b>
<b>Tableau 6.</b> Effet de l'extrait aqueux de <i>Mentha piperita.L</i> sur la croissance du germe <i>Streptococcus thermophilus</i> caractéristique du yaourt .....	<b>31</b>

# Table des matières

**Remerciments**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Résumé**

**Introduction**.....1

## **Partie 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre I : Aperçu général sur la *Mentha piperita L.*

1	Les menthes.....	3
1.1	Historique .....	3
1.2	Définition .....	3
2	La menthe poivrée ( <i>Mentha piperita L.</i> ) .....	4
2.1	Classification.....	4
2.2	Description botanique .....	4
2.3	Cycle de végétation de la menthe poivrée.....	6
2.4	Pays d'origine.....	6
2.5	Récolte .....	6
3	Conservation .....	6
4	Composition .....	7
4.1	Constituants principaux de la plante .....	7
4.2	Les principaux composés phénoliques de la menthe .....	7
5	Propriétés.....	7
6	Usage.....	8
7	Toxicologie .....	8

Chapitre II: Les composés phénoliques des plantes

1	Définition et Caractéristiques .....	9
2	Biosynthèse .....	9
3	Classification des composés phénoliques .....	10
3.1	Composés phénoliques largement répondus .....	11
4	Localisation des composés phénoliques.....	12
5	Rôles et propriétés des composés phénoliques .....	12
6	Intérêts des composés phénoliques .....	13

6.1 Rôle nutritionnel et thérapeutiques.....	13
6.2 Rôle physiologique.....	14
6.3 Rôle technologique.....	14
7 Mode d'action des composés phénoliques .....	14

### Chapitre III: Le germe *Streptococcus thermophilus*

1 Généralistes sur les bactéries lactiques.....	15
1.1 Définition et caractérisation des bactéries lactiques.....	15
1.2 Habitat .....	15
1.3 Rôle et intérêts des bactéries lactiques .....	16
2 <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	16
2.1 Caractéristiques des <i>S.thermophilus</i> .....	17
2.2 Fermentation par <i>S.thermophilus</i> .....	18
2.3 Techniques d'isolement.....	18

### **Partie 2 : METHODOLOGIE EXPERIMENTALE**

1 Objectif.....	19
2 Région de prélèvement et traitements préliminaires du matériel végétal .....	19
3 Préparations des échantillons .....	20
4 Extraction des composés bioactifs .....	20
5 Dosage des polyphénols totaux de <i>Mentha piperita</i> L.....	22
6 Etude des effets antimicrobiens des extraits de Menthe poivrée ( <i>Mentha piperita</i> L.....	23
6.1 Activation des inocula microbiens .....	23
6.2 Méthode de contact direct .....	24
6.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose.....	24
6.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.....	26
6.5 Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB.....	27
7 Traitement statistique .....	29

### **Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

1 Résultats .....	30
1.1 Composés phénoliques et flavonoïdes .....	30
1.2 Effet antimicrobien.....	30
2 Discussion .....	32
CONCLUSION .....	34
References bibliographiques.	
Annexes.	

## **Résumé :**

La présente étude a pour but de suivre l'effet antimicrobien de l'extrait aqueux de la Menthe Poivrée (*Mentha x Peperita* L.) récoltée dans la région d'Ouargla-Algerie sur le germe *Streptococcus thermophilus* spécifique de yaourt. L'extrait aqueux de *Mentha x Peperita* L. objet de l'étude a été obtenu par macération dans l'eau d'une prise de feuilles de la plante. l'extrait récupéré après filtration et évaporation a été ensuite, dilué à l'eau distillée stériles à des concentrations de 0,20,40,60,80 et 100%. Les différentes mesures et contrôles ont été réalisées en triples essais et ont porté sur : le test de contact direct, le test de diffusion sur disques, la concentration minimales inhibitrice et la concentration minimales bactéricide. Les résultats ont subi une analyse de variances mono-factorielles et une comparaison des moyennes selon le test de Newman et Keuls.

L'extrait aqueux de *Mentha pipérita* L. est relativement riche en composés phénoliques (45.41 mgEAG/ml d'extrait) et semble exercer un effet inhibiteur de type bactéricide vis-à-vis du germe lactique *Sreptococcus thermophilus* spécifique du yaourt.

Aucune croissance du germe étudié n'a été remarquée dans l'extrait pur non dilué de la menthe poivrée dont l'effet antimicrobien été très proche de la gentamycine ; avec un taux d'inhibition d'environ 87.71.

Il est possible d'incorporer l'extrait de *Mentha pipérita* L. dans le yaourt à un taux de moins de 20%. Néanmoins cette incorporation peut freiner à 32% la croissance du germe *Sreptococcus thermophilus* dans le produit.

**Mots clés :** Extrait, aqueux, antimicrobien, composés phénoliques

**Abstract:**

The present study aims to follow the antimicrobial effect of the aqueous extract of Peppermint (*Mentha x Piperita L.*) harvested in the region of Ouargla-Algerie on the specific *Streptococcus thermophilus* germ of yoghurt. The aqueous extract of *Mentha x Piperita L.* subject of the study was obtained by maceration in water of the leaves of the plant. The extract recovered after filtration and evaporation was then diluted with sterile distilled water at concentrations of 0, 20,40,60,80 and 100%. The different measurements and controls were carried out in triple tests and included: the direct contact test, the disc diffusion test, the minimal inhibitory concentration and the minimal bactericidal concentration. The results underwent an analysis of mono-factorial variances and a comparison of the means according to the Newman and Keuls test.

The aqueous extract of *Mentha piperita L.* is relatively rich in phenolic compounds (45.41 mgEAG/ml extract) and seems to have a bactericidal inhibitory effect on the yoghurt-specific lactic germ *Sreptococcus thermophilus*.

No growth of the studied germ was noticed in the pure undiluted extract of peppermint whose antimicrobial effect was very close to gentamycin; with an inhibition rate of approximately 87.71.

It is possible to incorporate the extract of *Mentha piperita L.* in yogurt at a rate of less than 20%. Nevertheless, this incorporation can slow down to 32% the growth of the *Sreptococcus thermophilus* germ in the product.

**Key words:** Extract, aqueous, antimicrobial, phenolic compounds

## ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو متابعة تأثير مضاد الميكروبات للمستخلص المائي لنعناع فلفلي الذي تم جمعه في منطقة ورقلة الجزائر على جرثومة حمض اللاكتيك العفديّة الحرّية

تم الحصول على المستخلص المائي لنعناع فلفلي قيد الدراسة عن طريق النقع أوراق النبات في الماء. المستخلص المتحصل عليه بعد الترشيح والتبخير تم تخفيفه بالماء المقطر المعقم لتركيزات 0.20، 40، 60، 80 و 100٪.

تم إجراء القياسات والضوابط المختلفة في اختبارات ثلاثية ركزت على: اختبار الاتصال المباشر ، واختبار الانتشار على الأقراص ، والتركيز المثبط الأدنى ، والحد الأدنى من تركيز مبيد الجراثيم. خضعت النتائج لتحليل أحادي العامل للتباينات ومقارنة بين الوسائل وفقاً لاختبار نيومان وكيولس.

المستخلص المائي من نعناع فلفلي غني نسبياً بالمركبات الفينولية (45.41 مجم / EAG مل من المستخلص) ويبدو أنه يمارس تأثير مثبط للجراثيم ضد جرثومة حمض اللاكتيك الخاصة بالزبادي.

لم يلاحظ أي نمو للجرثومة المدروسة في مستخلص النعناع النقي غير المخفف ، والذي كان تأثيره المضاد للميكروبات قريباً جداً من الجنتاميسين ؛ مع معدل تثبيط يقارب 87.71.

يمكن دمج خلاصة النعناع في الزبادي بمعدل أقل من 20٪. ومع ذلك ، يمكن أن يؤدي هذا الدمج إلى إبطاء نمو جرثومة العفديّة الحرّية في المنتج بنسبة 32٪.

الكلمات المفتاحية: مستخلص ، مائي ، مضاد للميكروبات ، مركبات فينولية

# **INTRODUCTION**

# Introduction:

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et très diversifiée. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations locales pour se soigner et certaines plantes se sont même imposées dans le monde médicinal

Parmi ces plantes, la menthe poivrée de son nom scientifique *Mentha x piperita* est avant tout une plante bienfaitrice ayant un pouvoir positif sur la santé. On prête d'ailleurs à cette plante d'innombrables vertus telles antibactérienne, antidouleur, anti-inflammatoire ... etc. qui ont été d'ailleurs vérifiés scientifiquement. Ces effets sont dus à la présence dans cette plante de certains composés bioactifs tels : l'eugénol, l'acide caféique et l'acide rosmarinique (**Arumugam et al., 2008**).

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie. Il résulte que, les extraits phénoliques possèdent de nombreuses activités biologiques. Selon les travaux de **Freeman et Carel (2006)**, ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques.

Ces effets antibactériens nous ont conduits à poser la question suivante : « Est ce que l'utilisation des extraits de menthe comme adjuvant dans les produits laitiers (le yaourt par exemple) peuvent avoir un effet sur la croissance des ferments lactiques tels, que les *Streptococcus thermophilus*, qui présentent des intérêts variés industriels et nutritionnels? Pour cela, nous nous sommes proposé de suivre le comportement in vitro de cette souche de levain lactique vis-à-vis de quelques inhibiteurs de croissance dont les composés phénoliques de *Mentha piperita* L.

Le manuscrit comporte trois grandes parties :

- Une partie bibliographique scindée en trois chapitres comportant des notions généraux sur la menthe poivrée, les composés phénoliques et le germe *Streptococcus thermophilus*.

## INTRODUCTION

---

- Une seconde partie décrivant le matériel et les méthodes appliquées dans l'approche expérimentale en vue d'étudier les effets antimicrobiens de l'extrait aqueux de la Menthe sur les germes spécifiques du yaourt.
- Enfin, une dernière partie a été consacrée à la critique et à la discussion des résultats obtenus au terme du travail expérimental entrepris au laboratoire et les perspectives de recherche développement à entreprendre dans le future.

# **Partie 1 : Etude bibliographique**

**Chapitre I:**  
**Aperçu général sur *Mentha piperita* L.**

## Chapitre I : Aperçu général sur la *Mentha piperita* L.

### 1 Les menthes :

#### 1.1 Historique :

Les feuilles séchées de la menthe poivrée ont été trouvées dans les pyramides égyptiennes datant du premier millénaire av .J.C (**Iserin, 2001**). Le nom mentha vient du grec « Minthe» et du latin « menta ». Piperita signifie poivrée. Les Grecs et les Hébreux l'ont utilisé comme moyen de fumigation tandis que les romains en mettaient dans leur vin et sauces, leur femmes mâchaient une pâte renfermant de la menthe et du miel pour masquer l'odeur de vin qu'elles buvaient en cachette et à l'époque la loi punissait de peine de mort celles qui useraient d'un breuvage réservé aux hommes et aux dieux.

La menthe a été reconnue et décrite en 1696 aux environs de Londres à Mitcham, où cet hybride est apparu d'où son deuxième nom : menthe anglaise. Elle est originaire d'Angleterre, cultivée dans nos régions cependant on la rencontre rarement à l'état spontané (**Hammami et Abdesselem, 2005**).

La culture de la menthe poivrée s'est répandue dans un certain nombre de pays aux USA à partir de 1825, et progressivement dès la fin du 19<sup>ème</sup> Siècle, et le début du 20<sup>ème</sup> siècle, dans toute l'Europe occidentale et méridionale (**Fournier, 1948**).

La menthe poivrée est inscrite à la 10<sup>ème</sup> édition de la pharmacopée française, elle est un hybride de la menthe aquatique (*Mentha aquatica*) et de *Mentha spicata*. Cette plante est rare en Algérie ; mais elle est seulement cultivée dans certaines régions du pays comme à Ouargla (**Beruneton., 1993**).

#### 1.2 Définition :

La Menthe poivrée (*Mentha piperita* L.) appartient à la famille des Labiateae et est originaire des régions méditerranéennes. Elle est largement cultivée dans le monde et est une Menthe hybride, un croisement entre la Menthe aquatique et la Menthe verte. La plante, indigène d'Europe, est maintenant répandue et cultivée dans toutes les régions du monde. Elle est parfois trouvée à l'état sauvage avec ses espèces parentes. La menthe poivrée a été décrite pour la première fois en 1753 par Carolus Linnaeus à partir de spécimens recueillis en Angleterre, il l'a traité comme une espèce, mais il est maintenant universellement accepté comme un hybride (**Moghtader., 2003**).

## 2 La menthe poivrée (*Mentha piperita* L.)

### 2.1 Classification :

La Menthe poivrée peut être classée comme suit :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae / Labiales (lamiacées)

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha x piperita* L. nm *Piperita*

Autre nom : Mitchan, menthe anglaise, Peppermint et en Algérie

-Synonyme : *Mentha x piperita* L. Var *vulgaris* SOLE (François, 2012).

### 2.2 Description botanique :

La menthe poivrée est une plante appartenant à la famille des Labiales, herbacée à végétation vigoureuse, elle est caractérisée par son odeur pénétrante spéciale ainsi qu'une saveur aromatique, brûlante et laisse une sensation de fraîcheur dans la bouche (Hammami et Abdesslem., 2005).

C'est une herbe annuelle, semblant pérenne en se reproduisant à partir de nombreux stolons, traçants, rampant, chevelu, aériens ou souterrains, à racine adventives (Baba Aissa., 1999). La menthe poivrée est caractérisée par des tiges quadrangulaires le plus souvent violacées (Brouneton., 1999). Les tiges sont un peu velues de 50 à 80 cm de haut, dressées ramifiées, se divisent en rameaux opposés (Hammami et Abdesslem., 2005).

Les feuilles sont ovales ou lancéolées et crénelées en scie, opposées par paires longues de 4 à 8 cm courtement pétiolées, de couleur vert pâle souvent teintées de rouges et ne présentent pas de stipules (Fouzi., 1994). Les feuilles sont bien adaptées au climat sec et sont caractérisées par des limbes coriaces, réduits et renfermant des poils sécréteurs (Daniel et al., 2002) (figure, 1).



**Figure 1.** Morphologie de la menthe poivrée ( **Daniel et al., 2002**).

Les inflorescences de fleurs faiblement bilabiées de couleur pourpre sont groupées en épis très serrés (**Brouneton., 1999**). Le calice présente cinq dents, la corolle pourpre violacées (parfois blanches) est terminée par quatre lobes, les quatre étamines sont incluses dans la corolle et les graines sont rares et stériles (**figure 2**).



**Figure 2.** Inflorescence et feuille de la menthe poivrée (**Brouneton ., 1999**).

### 2.3 Cycle de végétation de la menthe poivrée

- **Multiplication végétative :** Le cycle commence par la germination, les feuilles trifoliées apparaissent ensuite, une nouvelle tige se développe et les premiers nœuds commencent à se former.
- **Phase reproductrice :** La production de menthe est relativement facile, il suffit de diviser les pieds, ceux-ci produisant des stolons est une tige rampante, dont l'extrémité produit un bourgeon s'enracinant, qui donne à son tour naissance à un autre pied de menthe.

### 2.4 Pays d'origine :

Il s'agit d'un hybride cultivé, provenant probablement d'Angleterre et des pays méditerranéens (François., 2012).

### 2.5 Récolte :

La récolte s'effectue avant la floraison (de juin au juillet) manuellement dans les cas des cultures à petites échelles et mécaniquement en cas de culture industrielle.

Une deuxième coupe, voir éventuellement une troisième, sont possibles au plus tard à la mi-septembre. Le produit de la récolte est grossièrement haché, puis les feuilles sont séparées des tiges par ventilation ou tamisage. Dans les cultures à échelle familiale, les feuilles et les tiges feuillées portant 3 paires de feuilles supérieures sont cueillies manuellement, elles sont séchées à des températures maximales de 42°C dans des tunnels de séchage et pour une consommation personnelle, les feuilles fraîches sont récoltées juste avant leur emploi (Eberhard et al., 2005).

## 3 Conservation :

Les feuilles fraîches peuvent être conservées quelques jours dans des sacs en plastique au réfrigérateur, ou congelées dans des bacs à glaçons. Les feuilles séchées peuvent être stockées au frais, dans des récipients hermétiques (en porcelaine, en verre ou en métal), qui les protègent de l'humidité et de la lumière (Eberhard et al., 2005).

## 4 Composition :

### 4.1 Constituants principaux de la plante :

**Tableau1.** Constituants principaux de la menthe poivrée (François., 2012).

Constituants principaux	Pourcentage %
Les huiles essentielles:	0,5 à 6
• menthol	15 à 76
• acétate de menthyle	2 à 5 (voir jusqu'à 23% selon les provenances)
• 1,8-cinéole	3 à 8
• menthofurane	0 à 7
• isomenthon	2 à 13
• noémenthol	2,5 à 5
• limonène	2 à 10
• pulégone ; $\beta$ -caryophyllène	0,5 à 1,5
• germacrène D	1 à 2
• Des dérivés d'acide hydroxycinnamiques	3,5 à 6
• Des Flavonoïdes:	10
• Tritarpènes	0,1

### 4.2 Les principaux composés phénoliques de la menthe :

La Menthe poivrée est riche en acide phénolique (7%) : acide rosmarinique et dérivés de l'acide caféique. Elle contient une très forte proportion de flavonoïdes et des tanins.

## 5 Propriétés :

### **Activité antimicrobienne**

**composés phénoliques de la menthe :** Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des extraits, il est probable que leur activité antimicrobienne ne

soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaires (**Kokate et Varma., 1970**).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des extraits sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron, la coagulation du contenu protéique des cellules, et l'inhibition de la décarboxylation des acides aminés. Les extraits peuvent inhiber aussi la synthèse d'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides. Le mode d'action des extraits dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs (**Bakkali et al .,2014**).

## **6 Usage :**

La Menthe par leur odeur et leur activité et richesse en composés bioactives, ont une place particulière dans l'ensemble des produits aromatiques. Grâce à certaines propriétés spécifiques, les besoins en produits extraits des Menthes sont multiples. En usage local, les médicaments à base de Menthe sont utilisés comme adoucissant et comme protecteur (contre les crevasses et les piqûres d'insectes); utilisé également pour l'hygiène buccale et comme antalgique (**Telidji. , 2015**).

## **7 Toxicologie :**

Aux doses usuelles, la consommation des parties aériennes de la menthe poivrée comme condiment ou en tisane, ne présente aucun risque de toxicité ni aiguë ni chronique. Cependant, de très forte doses des huiles essentielles peuvent conduire à des céphalées , des aigreurs d'estomac, de la bradycardie et des tremblements musculaires de l'ataxie. Le potentiel de sensibilisation de la menthe poivrée est faible, mais des réactions allergiques ont été parfois signalées(**Eberhardetal.,2005**).

**Chapitre II :**  
**Les composés phénoliques des plantes**

## Chapitre II: Les composés phénoliques des plantes

### 1 Définition et caractéristiques:

Largement distribué dans le règne végétal et abondant dans nos régimes alimentaires, « les composés phénoliques » sont aujourd'hui les composés phyto -chimiques les plus étudiés (**Knežević et al., 2012**).

D'après **Hurtado-Fernandez et al.,(2010)** beaucoup de travaux ont été présentés par la communauté scientifique, qui se concentre sur:

- La structure chimique des phénols antioxydants dans les différents aliments végétaux, des plantes aromatiques et des matières végétales les plus diverses.
- Le rôle probable des composés phénoliques dans la prévention de diverses maladies associées aux stress oxydatifs telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et le cancer
- La capacité de certaines catégories de composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes pour se lier aux protéines.
- La stabilisation des huiles comestibles, la protection de la formation de saveurs et la stabilisation de saveurs.
- Préparation de compléments alimentaires.

Plus de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille et le nombre ne cessent de croître (**Ignat I. et al., 2011**). Ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle. Ils comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes et lignines. Ils peuvent être conjugués avec plusieurs résidus sucrés liés ou ils peuvent également être liés avec d'autres composés chimiques, tels que des acides carboxyliques, des amines ou des lipides ou avec d'autres phénols existants (**Martin et Andrantsitohaina., 2002**).

### 2 Biosynthèse :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (**Pereira Nunes et al., 2012**)

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- ✓ **Celle de l'acide shikimique:** qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- ✓ **Celle issue de l'acétate/malonate:** qui conduit à des polys  $\beta$ -coesters (poly-acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les
- ✓ dihydroxy 1,8-anthraquinone ou les naphthoquinones. De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée de deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, « les flavonoïdes » (Martin et Andrantsitohaina., 2002).

### 3 Classification des composés phénoliques :

D'après Harbone (1994), les polyphénols sont classés en fonction de leur squelette carbonée en quatre principales classes présentées dans le tableau 2 .

**Tableau2.** Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone (Harbone, 1994).

Nombre de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	$C_6$	Phénols simples Benzoquinones	Catéchol
7	$C_6- C_1$	Acides phénoliques	p-Hydroxybenzoïque salicylique
8	$C_6- C_2$	Acétophénone Phénylacétiques acides	p-hydroxyphénylacétique
9	$C_6- C_3$	Acides hydroxyl- cinnamique Phényle propènes coumarique Isocoumarique Chromone	Caféique, férulique Eugénol
10	$C_6- C_4$	Nafthoquinone	Pulmbagin
13	$C_6- C_1- C_6$	Xanthone	Mangiférine
14	$C_6- C_2- C_6$	Stilbenes : Anthraquinones	Acide coumarique
18	$(C_6- C_3)_2$	Ligans	Podophyllotoxine
30	$(C_6- C_3- C_6)_2$	Biflavonoid	Amentoflavone
N	$(C_6- C_3)_n ; (C_6)_n ;$ $(C_6- C_3- C_6)_n$	Lignines ; Catécholmelanine Flavolants (Tanins condensés)	

de même qu'ils peuvent être classés en trois groupes selon leurs répartitions:

- ✚ Les composés phénoliques largement répondus.
- ✚ Les composés phénoliques peu répondus (exemple: le cathécol et l'acide caféique).
- ✚ Les composés phénoliques présents dans la nature sous forme de polymères.

### 3.1 Composés phénoliques largement répondus :

#### 3.1.1 Flavonoïdes :

Comme le laisse supposer, sa dénomination historique (du latin ;*flavus* = jaune). Ce groupe est très important et très étendus et comprend des composés de couleur jaune. Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques présents dans les végétaux, dont on a pu identifier plus de 4000 différents types (**Hollman, 1997**). D'après **Shahidi et Naczk (1995)**, ces composés appartiennent aux groupes des phénols, qui possèdent un squelette de base diphényle-propane (C6-C3-C6), avec différents niveaux d'oxydation au centre du cycle pyrane . La plupart des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycones liés à des glucosides. Ces constituants glycosidiques sont fixés aux groupes hydroxyles du cycle A et plus fréquemment à la position 3 de l'hétérocycle (**Richter,1993**). Parmi les flavonoïdes présentant le plus intérêt, nous citerons :

#### 3.1.2 Les anthocyanes :

Les anthocyanes sont des pigments, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour divers pH, de rouge orange en milieu acide au bleu mauve en milieu alcalin ; et dans certain cas forment des complexes avec les métaux (**Richter, 1993**). Les anthocyanes existent chez la quasi-totalité des espèces du règne végétal. En effet plus de 200 anthocyanes différents ont été identifiés dans les plantes et environ 70 uniquement dans les fruits.

La plupart d'entre eux sont des monoglycosides , diglycosides de pelargonidine, cyanidine, malvidine et peonidine (**Shahidi et Naczh, 1995**). Ils dérivent du phenyl-2-benzopyrylium ou flavylium La structure aromatique est dûe à la présence de doubles liaisons conjuguées responsables de la stabilité de la molécule(**Aissani et Maata, 1998**). Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidiques ou anthocyanidines, cependant le nombre d'aglyco nes, ou l'anthocyanidines est assez limité (**Ribereau et al.,1968**).

#### 3.1.3 Flavones et flavonoles :

En générale, les flavonoles , responsable de la teinte jaune, sont caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement glucidique est le plus souvent

relié en position 7. Parmi les flavonoles les plus répandus, on trouve essentiellement le quercétol et le myricétol.

Les flavones proprement dites se trouvent dans les plantes sous forme O-glucoside, ils ont un rôle moins important que le flavonoles. La seule différence entre ces deux composants réside en la présence de groupe hydroxyle en C3 dans les flavonoles qui peut être considéré comme trois hydroxy flavonole (**Hertog et al., 1992**).

#### **4 Localisation des composés phénoliques:**

Les composés phénoliques sont omniprésents dans les végétaux, mais leur répartition au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire n'est pas uniforme. Les composés phénoliques solubles sont présents dans les vacuoles tandis que celles insolubles se trouvent au niveau des parois cellulaires.

Ces dernières sont plus ou moins riches en polyphénols selon la localisation de la cellule : les parties charnues du fruit en sont pauvres (les polyphénols sont alors 14 principalement contenus dans la vacuole), contrairement aux cellules dont la paroi a atteint le stade supérieur de rigidité (cellules de la peau et des pépins, épicarpes des grains de blé) (**Knežević et al., 2012 ; Macheix et al., 1990**).

#### **5 Rôles et propriétés des composés phénoliques :**

Les composés phénoliques participent à deux principaux processus de l'activité des plantes : La photosynthèse et la respiration. De plus, ils interviennent dans d'autres processus tels que : la croissance, la germination, la morphogénèse des tiges et dans le processus de lignification. On sait que les polyphénols agissent sur les auxines et les enzymes responsables de leur destruction catabolique, en particulier l'AIA (Acide B-indoyl acétique) oxydase, enzyme ayant un rôle dans la dégradation de l'auxine (**Merghem, 2009**).

Les composés phénoliques peuvent avoir un rôle de signal (**Treutter, 2006**) ; des flavonoïdes permettent par exemple la mise en place de la symbiose entre des fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont responsables de la coloration des fleurs (**Macheix et al., 2005**).

De plus, les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (**Gould et Lister, 2006**). Enfin, les flavonoïdes tels qu les

dérivées hydroxycinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (Walton et Brown, 1999).

## 6 Intérêts des composés phénoliques :

### 6.1 Rôle nutritionnel et thérapeutique :

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature , et que l'homme en consomme jusqu'à 10g par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Activités biologiques des composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Protectrices vasculaires Et Antiœdémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Antiinflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro- veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le coolegène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Antiinflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydantes

Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur d'implication des polyphénols dans la prévention des maladies dégénératives telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, ostéoporoses et/ou les maladies inflammatoires (Rock, 2003).

## 6.2 Rôle physiologique :

Des travaux très anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Alibert *et al.*, 1977).

## 6.3 Rôle technologique :

Généralement, les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (Lugasi *et al.* 2003). Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur d'implication des polyphénols dans la prévention des maladies dégénératives telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, ostéoporoses et/ou les maladies inflammatoires (Rock, 2003).

## 7 Mode d'action des composés phénoliques :

L'action des polyphénols sur les cellules des microorganismes est basée sur une multiplicité d'influences individuelles. Celles-ci n'incluent pas seulement un mécanisme physique et physicochimique mais aussi une réaction biochimique. Globalement, l'action antimicrobienne peut être expliquée par les étapes suivantes :

- Influence sur l'ADN,
- Influence sur synthèse des protéines,
- Influence sur l'activité des enzymes

Les polyphénols considérés comme des substances lipophiles agissent sur la cellule en perforant la membrane cellulaire. Cette perforation augmente le flux des protons vers l'intérieur de la cellule ce qui accroît le besoin en énergie (Luck *et al.*, 1995).

Les différences dans le contenu des lipides de la paroi cellulaire expliquent la différence du degré de l'activité inhibitrice entre les bactéries gram négatif et gram positif ou ce degré est plus élevé. Les dérivés de l'acide benzoïque sont les plus efficaces principalement contre les levures et moisissures. L'activité antimicrobienne exige une certaine solubilité dans l'eau et dans les lipides. La croissance des microorganismes n'est possible que dans une phase aqueuse uniquement et la substance antimicrobienne doit être hydrosoluble afin de traverser la paroi de la cellule (Luck *et al.*, 1995).

## **Chapitre III:**

**Le germe *Streptococcus thermophilus***

## Chapitre III: Le germe *Streptococcus thermophilus*

### 1 Généralités sur les bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques sont des microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer et de conserver un nombre important de ses aliments. Elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons (EUFIC,1999). Elles sont devenues les principaux candidats probiotiques et bénéficient d'un statut GRAS (Generally Regarded AS Safe) (Ait-Belgnaoui, 2005).

#### 1.1 Définition et caractérisation des bactéries lactiques:

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes unicellulaires, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (De Roissart, 1986) c'est-à-dire qu'elles tirent leur énergie de la dégradation de matière organique. Il s'agit de réaction d'oxydation qui se fait par déshydrogénation (parfois couplée à une hydratation ou à une décarboxylation) (Guiraud, 1998).

En plus de ces caractères biochimiques, il convient de prendre en compte leurs caractères microbiologiques :

- Les bactéries lactiques sont à Gram (+).
- Elles ne sont pas sporulées.
- Elles sont pour la plupart immobiles.
- Elles sont dépourvues de cytochromes, étant incapable d'effectuer la synthèse du noyau hème des porphyrines donc sont incapables de respirer mais peuvent seulement effectuer un métabolisme fermentaire (Guiraud, 1998).

#### 1.2 Habitat :

- ✓ Les bactéries lactiques sont ubiquistes : elles sont retrouvées dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales ainsi que dans le tractus digestif, ce qui explique leur température de croissance hétérogène (Mayo et al., 2010; Klein et al., 1998) ; mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (De Roissart, 1986). Parmi les espèces du genre

*Streptococcus*, *Streptococcus thermophilus* est isolée du lait pasteurisé, du matériel de laiterie et de levains artisanaux (Jones, 1978).

### 1.3 Rôle et intérêt des bactéries lactiques

#### 1.3.1 Domaine alimentaire

##### 1.3.1.1 Rôle sur la structure et la texture:

L'acidification provoque la formation d'un caillé +ou- ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchées est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé ; kéfir). Pour obtenir une consistance déterminée, l'utilisation des souches plus ou moins acidifiantes peut être couplée à celle des souches productrices de polysaccharides (Satura et Federighi, 1998).

##### 1.3.1.2 Rôle dans la conservation:

**\*Production d'acide lactique :** Les bactéries lactiques ont un rôle important dans l'inhibition des flores non lactiques.

**\*Production de bactériocine :** Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés par un très grand nombre de souches de bactéries lactique, ils sont généralement thermorésistants.

##### 1.4.1.3. Rôle sur les caractéristiques organoleptiques :

Par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyle et l'acétaldéhyde, qui sont responsables des saveurs caractéristiques des produits finis transformés (Boudjemaa, 2008).

## 2 *Streptococcus thermophilus* :

*Streptococcus thermophilus* est l'un des plus importants sur le plan commercial de toutes les bactéries lactiques car ces bactéries sont utilisées dans la production de yaourt et de nombreux fromages. Bien que principalement utilisées dans l'industrie alimentaire, ils ont le pouvoir acidifiant et l'aptitude à la production de composés aromatiques en plus. *S. thermophilus* a un rôle important comme un probiotique capable d'atténuer les symptômes de l'intolérance au lactose et autres troubles gastro-intestinaux.

Il appartient à la famille des *Streptococcaceae*, à Gram-positif et se présente microscopiquement sous la forme de coques généralement regroupées en paires ou en chaînes à des longueurs variables. Il s'agit d'un germe à cytochrome négatif, oxydase et catalase négatif, il est immobile, asporulé et homofermentaire.

*Streptococcus thermophilus* est un alpha-hémolytique appartient au groupe *viridans* (Ghuiraud ; 1998). Il fait partie des levains thermophiles (yaourts, fromages) qui dégradent plus rapidement le K-caséine que l' $\alpha$ S1 ou B caséine (Bourgeois et Larpent ; 1996). En plus, les ferments lactiques thermophiles comme *Streptococcus thermophilus* excrètent de l'acétylaldéhyde à partir de certains acides aminés comme thréonine issus de protéolyse.

Les *S. thermophilus* se développent symbiotiquement avec les *Lactobacillus bulgaricus* en stimulant la croissance. Chez les *S. thermophilus*, la présence de plasmide est rare ou en contiennent seulement un petit nombre (Bourgeois et Larpent ; 1996).

### 2.1 Caractéristiques de *S. thermophilus* :

Les caractéristiques de *S. thermophilus* sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 4.** Caractéristiques de *S. thermophilus* (Ghuiraud, 1998 ; Bourgeois et Larpent, 1996).

Les caractères biochimiques	<i>S. thermophilus</i>	Les caractères biochimiques	<i>S. thermophilus</i>
Groupe sérologique	-	Arabinose	±
Hémolyse	<b>Alpha</b>	Galactose	-
Croissance à pH9.6	+	Glucose	+
ADH	-	Maltose	-
CO <sub>2</sub>	-	Raffinose	±
Acétonine	-	Saccharose	+
Croissance à 6.5% NaCl	-	Tréhalose	-
Arginine	<b>V</b>	Dextrine	-

**V** : Variable, (+) : positif pour la plupart des souches, (±) : variable.

## 2.2 Fermentation par *Streptococcus thermophilus*

Il semble que les *S.thermophilus* ont un métabolisme homofermentaire et le transport du lactose se fait par un système actif de lactose perméase.

Après sont entré dans la cellule, le lactose est hydrolysé par la  $\beta$ -galactosidase en glucose et galactose, le galactose sera excrété vers le milieu extracellulaire ; alors que le glucose sera métabolisé en acide lactique selon la voie glycolytique (EMP: EMDEN MEYERHOF PARNAS) .

L'acide lactique produit par *S.thermophilus* se présente uniquement sous la forme de l'isomère lévogyre (L+). Selon (**Benateya et al, 1986 ; Hemme et al, 1980**), la répression catabolique du lactose par le glucose chez *S.thermophilus* n'existe pas. Au contraire, il y aurait dérèpression du système de prise du lactose car l'activité de perméation du diholoside est fortement stimulée par le glucose (**Bourgeois et Larpent ; 1996**). Les Streptocoques possèdent des enzymes protéolytiques (protéases) de type exopéptidasique neutre (6.5) et un équipement amino-peptidasique (pH 6.5) et Dipeptidasique (pH 7.5) ont été aussi purifiés et reconnus (**Eck, 1996**).

## 2.3 Technique d'isolement:

Les *Streptococcus thermophilus* comme d'autres types de streptocoques ne se multiplient pas convenablement sur les milieux courants tels le bouillon nutritif ou le gélose nutritif ordinaire. Le bouillon glucosé tamponné ou le bouillon M17 (bouillon de Terzarghi) conviennent généralement bien pour la culture en milieu liquide, de même que le milieu Todd-Hewitt. Pour l'isolement sur milieu solide, la gélose au sang, la gélose typicase soja plus 5% de sang, la gélose Columbia, le milieu Milk agar et la gélose M17 ou la gélose Terzarghi sont des milieux qui s'apprêtent bien au développement des *Streptococcus thermophilus* (**Guiraud, 1998**).

## **Partie 2 : Méthodologie expérimentale**

## 1 Objectifs:

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes ayant des vertus thérapeutiques dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie. Ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques.

Ces effets antibactériens nous ont conduits à poser la question suivante : « Est ce que l'utilisation des extraits de plante comme adjuvant dans certains produits laitiers (tels les yaourts par exemple) peuvent avoir un effet sur la croissance des ferments lactiques tels, que les *Streptococcus thermophilus* qui présente des intérêts variés (industriel et nutritionnel) » ?

Pour cela, nous nous sommes proposé d'essayer de connaître le comportement *in vitro* d'une bactéries spécifiques du yaourt, à savoir *Streptococcus thermophilus*, vis-à-vis des inhibiteurs de croissance tels les polyphénols, les flavonoïdes et bien d'autres composés bioactifs contenus dans l'une des plantes cultivée sous palmeraie à Ouargla- Algérie et très largement utilisée en médecine traditionnelle par la population à savoir la **Menthe poivrée ou (*Mentha pipérita L.*)**.

D'une façon générale les objectifs escomptés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de 3 points essentiels :

Procéder à une extraction aqueuse des principaux composés bioactifs de la plante

Déterminer la teneur en composés phénoliques des extraits de ***Mentha pipérita L.***

Suivre les effets antimicrobiens de l' extrait aqueux de ***Mentha pipérita L.***

sur la croissances *in vitro* des *Streptococcus thermophilus* spécifiques du yaourt .

## 2 Région de prélèvement et traitements préliminaires du matériel végétal:

Le matériel végétal objet de l'étude la Menthe poivrée (***Mentha pipérita L.***) a été prélevé durant les mois de septembre dans la région de Ouargla - Algérie ou elle est introduite expérimentalement et cultivée sous palmeraie.

Un échantillon de 1 à 2 kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce étudiée a été récolté aléatoirement dans une station d'étude propre à la région expérimentale et relevant de l'Institut Technique de Développement de l'Agronomie Saharienne (ITIDAS- Hassi Ben Abdallah)

### 3 Préparations des échantillons:

La matière végétale collectée dans la zone d'étude a été ensuite étalée sur du papier journal , puis séchée à l'air ambiant. Les échantillons de feuilles séchés ont été enfin broyés par l'entremise d'un broyeur à lame de cuisine, puis mis dans des bocaux hermétiquement stériles et conservés à sec à température ambiante et à l'abri de l'humidité ainsi que de la lumière.

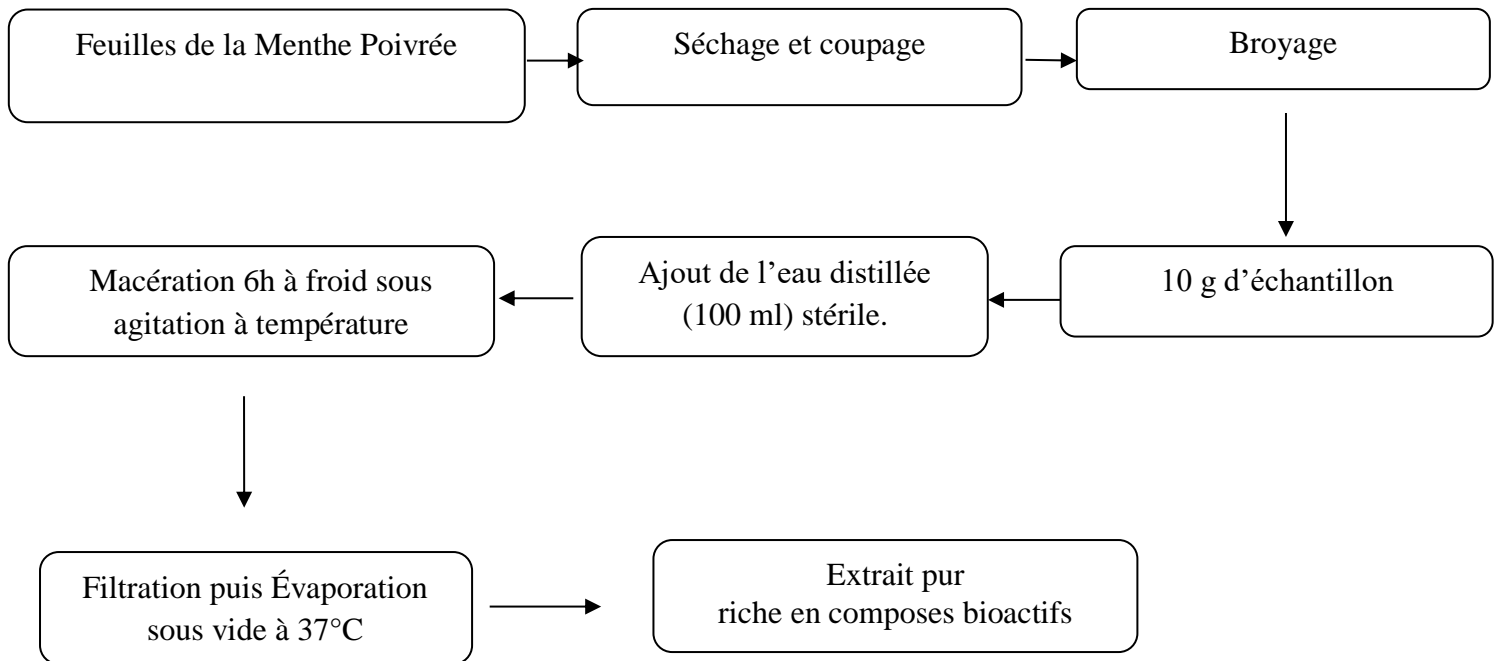
### 4 Extraction des composés bioactifs :

Selon **Almas et Al-Bagich (1999)** et **Almas(2001)**, les extraits à l'eau arrivent à agir en générale sur la croissance de certaines bactéries appartenant au genre *Streptococcus* à des taux d'extraction de 5 g/100 ml de matière végétale de Kikar (*Acacia arabica*) provenant du Pakistan et de l'Arak (*salvadora persica*) d'Arabie Saoudite. L'extraction des composés bioactifs de la plante objet de l'étude (*Mentha Pipérita L*) a été effectué donc sur des prises en triple essai de 10g de feuilles séchée et broyée. Chaque échantillon de broyat a été mélangé avec 100ml d'eau distillée stérile.

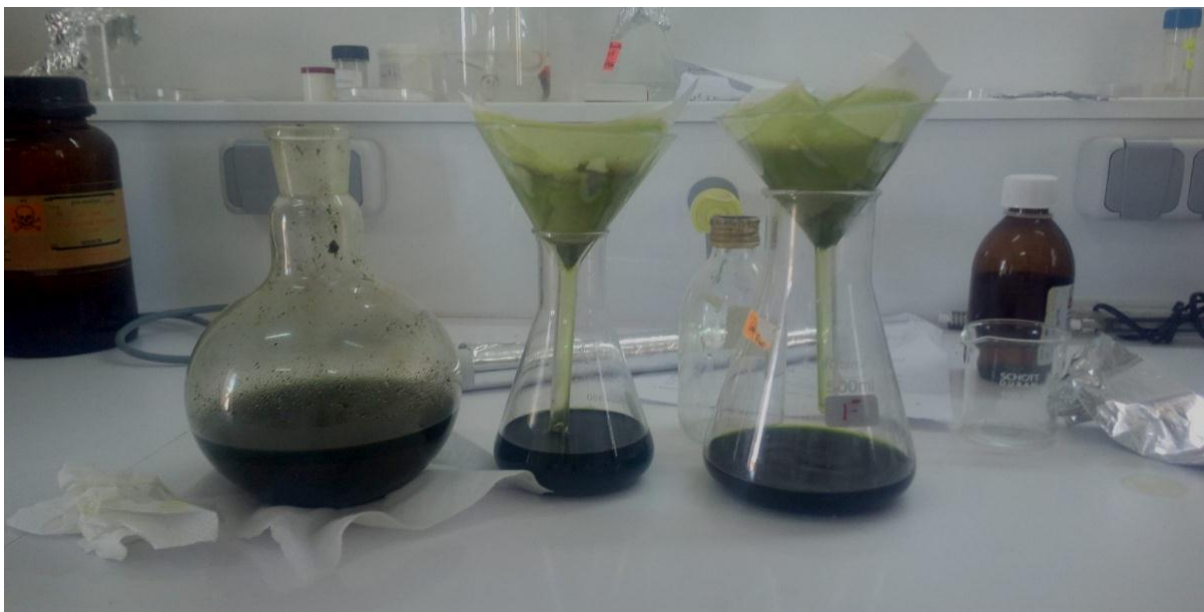
L'extraction par macération à froid de chaque mélange a été laissée ensuite se poursuivre pendant 6 heures à température ambiante sous agitation (figure3). La durée de l'extraction favorise ainsi la dépolymérisation des principaux composés constitutifs de la plante, tels que la lignine ainsi que les substances pectiques et permet une meilleure solubilisation des principaux composés bioactifs dont les composés phénoliques visés par cette extraction.

Les extraits à l'eau obtenus ont été filtrés en utilisant un papier filtre Wattman N°3(figure4), ayant une porosité de 0,3µm et débarrassés du solvant (l'eau) par évaporation sous vide à 45 °C (figure5), pour l'obtention d'un extrait pure (**Sultana et al., 2009**) .

Des solutions filles ont été enfin préparées à partir de la solution mère d'extrait de *Mentha Pipérita*, récupérée après extraction, par dilution avec une eau stérile déminéralisée selon les concentrations suivantes : 0(eau distillée),20 ,40,60,80 et 100% (extrait pur).



**Figure 3.** Protocole d'extraction.



**Figure 4.** Filtration après macération (Amara, 2019).



**Figure 5.** Évaporation du solvant (eau) sous vide par Rota vapor (Amara, 2019).

## **5 Dosage des polyphénols totaux de *Mentha pipérita* L:**

La teneur totale en composés phénoliques des extraits de *Mentha pipérita* L a été estimée par le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de Li *et al.* (2007).

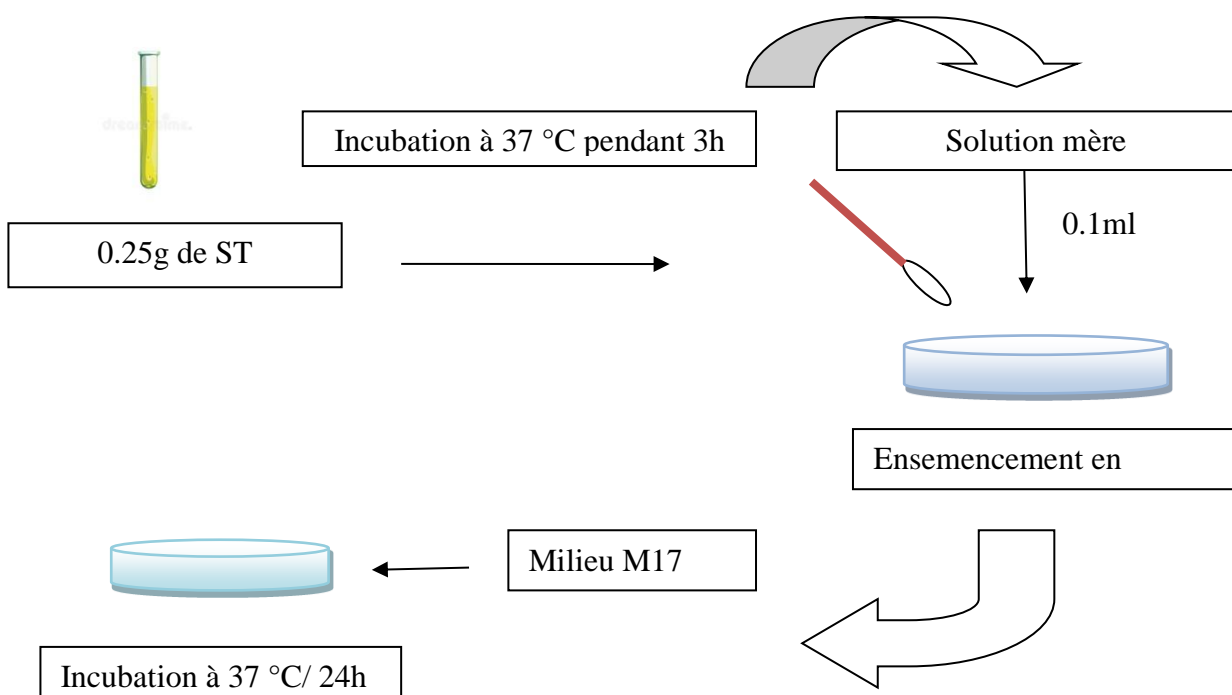
Cette méthode qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphomolybdique (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Brièvement, 100 µl de chaque extrait ou de différentes concentrations l'acide gallique sont mélangés avec 500 µl du réactif du Folin-Ciocalteu dilué au 1/10. Après 4 min, 400 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%) sont ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 765 nm après 1 h 30 min d'incubation contre un blanc dépourvu d'extraits à tester qui seront remplacés par le solvant. La concentration en polyphénols dans chaque extrait a été exprimée en mg d'équivalent

d'acide gallique par ml d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/ml d'extrait), et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

## 6 Etude des effets antimicrobiens des extraits de Menthe poivrée (*Mentha pipérita* L):

### 6.1 Activation des inocula microbiens :

L'étude concerne l'une des deux souches pure de référence et spécifique du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus*. La bactérie lactique a été tout d'abord activée avant son utilisation expérimentale. Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée conservée au froid à 4 °C est au préalable ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37°C durant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution constituant la solution mère a été pris pour être ensemencée en surface d'une boîte de Petri contenant un milieu de croissance gélosé spécifique dont le (M17) (A défaut utiliser le milieu gélosé ou le milieu gélosé MH) puis le mélange est incubé à 37°C pendant 24 heures (figure 6).



**Figure 6.** Activation de la souche lactique *Streptococcus thermophilus*.

### 6.2 Méthode de contact direct :

Une colonie issue d'une culture jeune de l'espèce microbienne activée comme préalablement sur milieu solide gélosé spécifique a été prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile et ensemencée ensuite dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37°C durant 03 heures. A partir de cette dernière solution, qui constitue l'inoculum de la bactérie lactique étudiée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant jusqu'à  $10^{-5}$ . Des prélèvements de 01 ml de cette dernière dilution décimale ont été ensuite individuellement ajoutés à 09 ml de chaque extrait de Menthe poivrée (*Mentha pipérata* L) dilué à l'eau distillée, respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100% (figure 7).

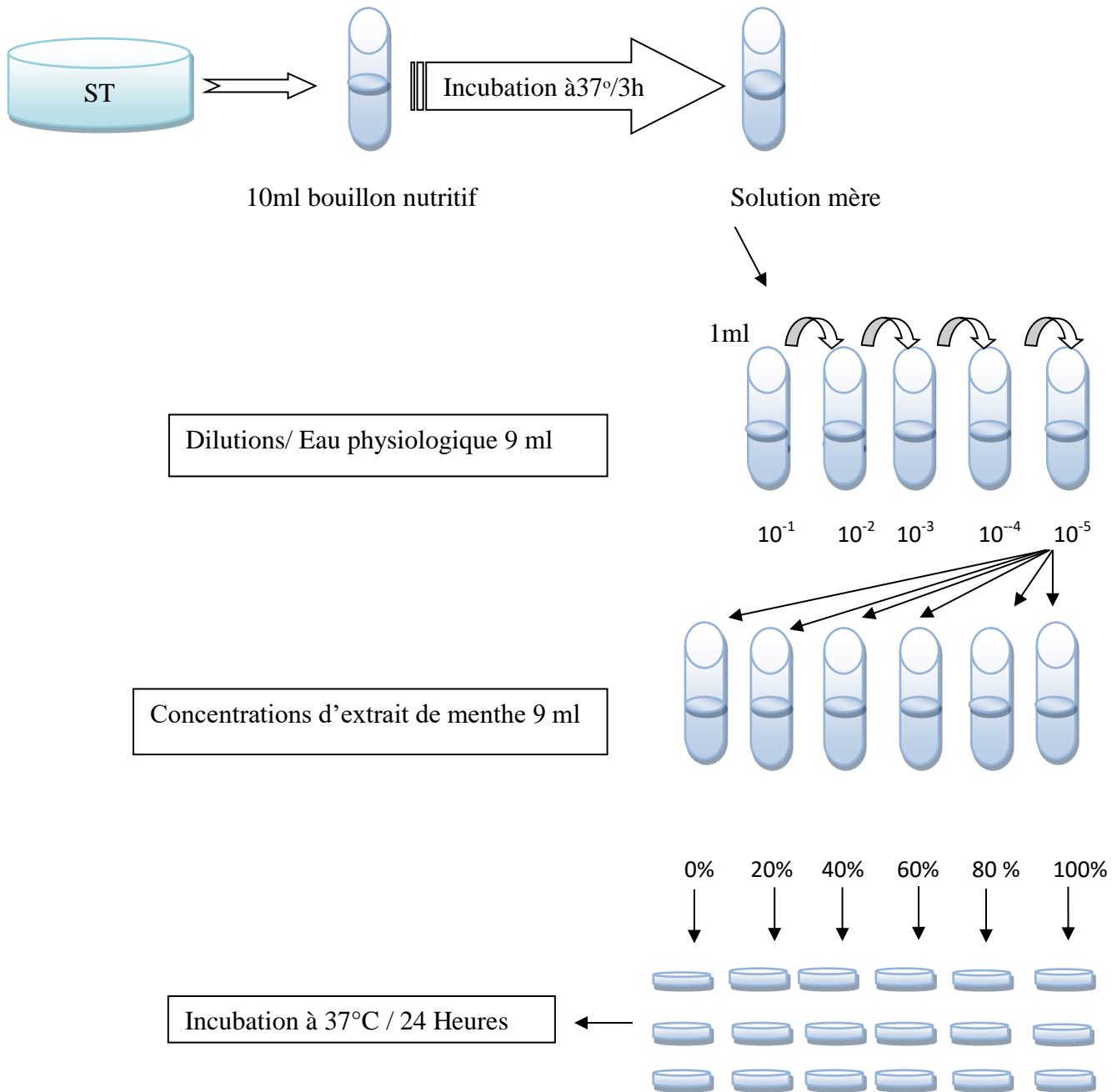
Les mélanges des solutions ont été enfin ensemencés en triple essais (03 boîtes de Pétri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance pour chaque espèce microbienne. La lecture du nombre de colonies développées a été effectuée après incubation des milieux ensemencés à 37°C pendant 24 heures (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

### 6.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose :

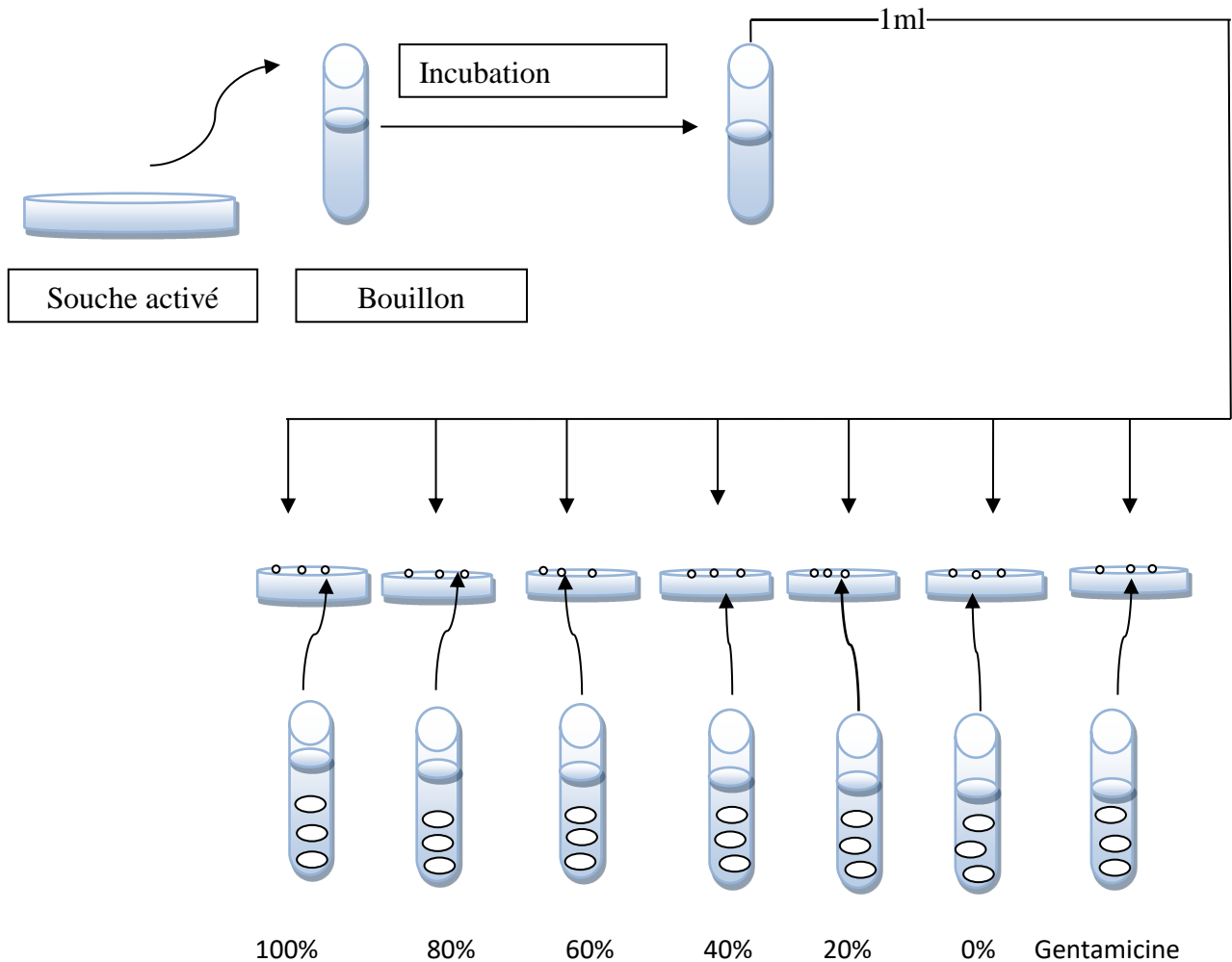
Les disques ont été confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

Une colonie de l'espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif ; ce mélange a constitué l'inoculum microbien. Des prises de volume de 1ml de cette dernière solution ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu (M17) spécifique à l'espèce microbienne étudiée (A défaut utiliser le milieu gélosé ou le milieu gélosé MH). Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Gentamicine (figure8), ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Petri contenant le milieu gélosé spécifique ensemencé (**Prescott et al., 2003**).

La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Petri à 37°C pendant 24 heures à l'aide d'un pied à colis (**Guignar, 1998**).



**Figure 7.** Méthode de contact direct.



**Figure 8.** Méthode des disques par diffusion sur milieu de Muller Hinton.

#### 6.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI:

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et/ou en composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Denis *et al.*, 2011).

Dans le cas de notre étude, c'est les principes actifs des extraits de Menthe obtenus par extraction aux différents solvants qui sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice du les bactéries *Streptococcus thermophilus* spécifiques du yaourt. Ainsi, une colonie jeune du germe étudié prélevée à l'aide d'une anse à platine dans 10 ml de bouillon nutritif a été incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir les inocula. Des prises de 0,2 ml de l'inoculum ont été introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton (figure 9).

Les mélanges des tubes contenant séparément chaque extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie lactique ont été ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures (**Moroh et al., 2008**).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI a été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspond donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur  $d_i$  est égale à  $df$  ( $d_i = df$ ).

Le taux de survie du microorganisme sera mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

$$S=100 \times (df-d_i/DF-DI)$$

**S** : Taux de survie du microorganisme en %.

**df-di** : Différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.

**Df-Di** : Différence de densité optique sans extraits de Menthe avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (**Kra et al., 2001 ; Zrihi et al., 2007**).

### 6.5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La concentration minimale bactéricide d'une espèce de germe *lactique* étudié représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum initial après incubation (**Moroh et al., 2008**).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à  $10^{-4}$ . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle estensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution  $10^{-4}$  a été comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, égalementensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5cm et incubé à 37 °C durant 18 à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution  $10^{-4}$  correspondra à la CMB (figure 10).

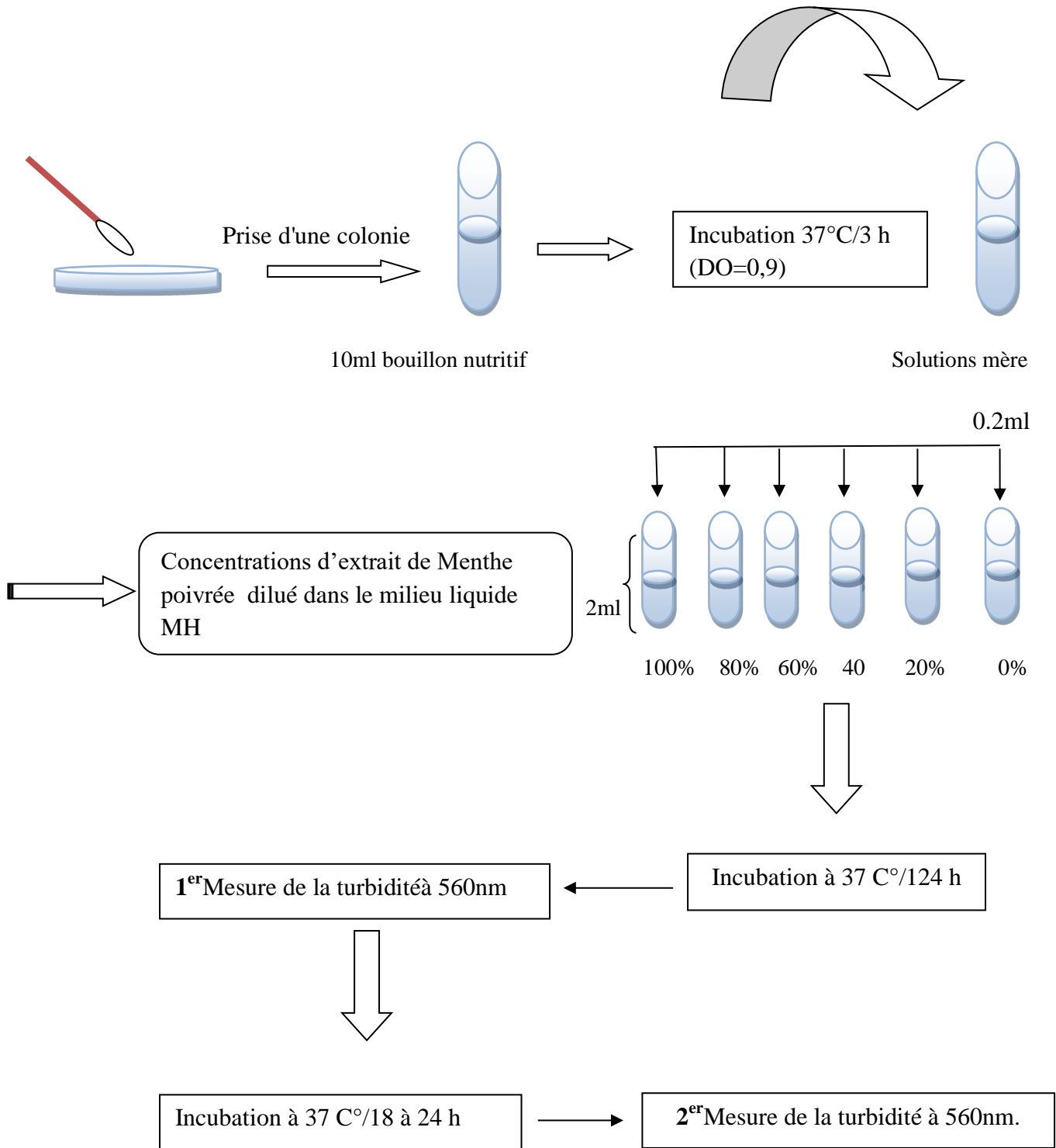


Figure 9. Détermination de CMI.

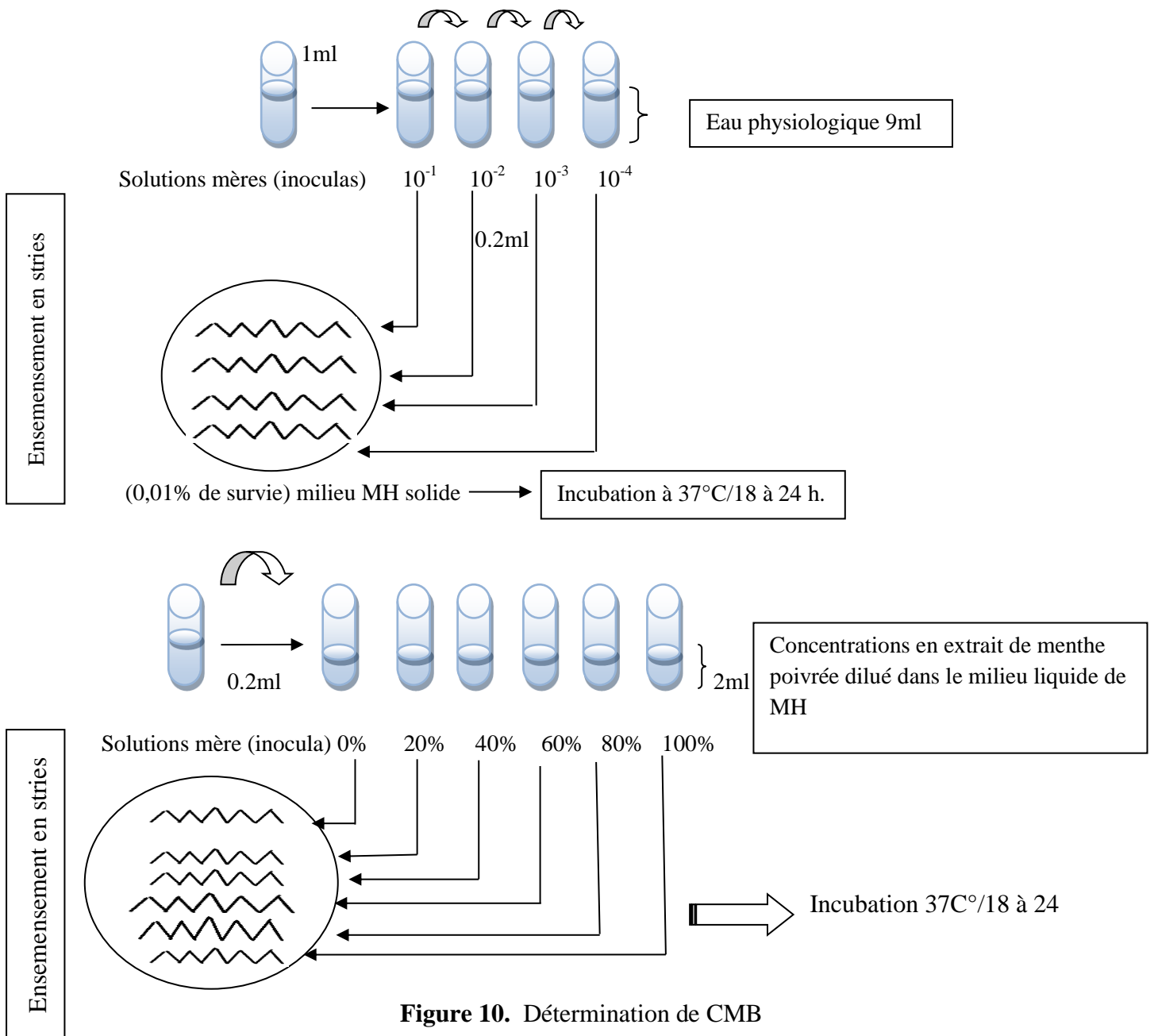


Figure 10. Détermination de CMB

## 7 Traitement statistique :

Les résultats paramétriques ont été traités statistiquement par une analyse de variance mono factorielle en randomisation totale suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de NEWMAN et KEULS (**STAT BOX 6.4**). Les résultats ont été exprimés en valeurs moyennes, accompagnées des écart-types correspondants. Les effets du facteur étudié (Traitement) sur les variations des variables mesurées ont été démontrés à des seuils de probabilité de  $p < 0.05$  et à  $p < 0,01$ . Le logiciel de statistique utilisé est le (**STAT BOX 6.4**).

## **Partie 3 : Résultats et discussion**

## 1 Résultats :

### 1.1 Composés phénoliques et flavonoïdes :

Les teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait aqueux et de matière végétale de *Mentha piperita*.L sont représentées dans le (**Tableau5**).

L'extrait aqueux de menthe s'avère très riche en composés phénoliques (45.41 mgEAG/ml d'extrait) et pauvre en composés flavonoïdes (0.43 mgEQ/ml d'extrait). Extrapolées en gramme de matière sèche de la plante étudiée les valeurs enregistrées ont été évaluées à 454.1 mgEAG/g MS et 04.30 mgEQ/g MS, respectivement.

**Tableau 5.** Teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait aqueux et de matière végétale de *Mentha piperita*.L .

Polyphénols		Flavonoïdes	
mgEAG/ml d'extrait	mgEAG/g MS	mgEQ/ml d'extrait	mgEQ/g MS
45.41	454.1	0.43	04.30
±	±	±	±
01.25	02.75	0.02	0.03

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes plus ou moins écarts types correspondants, avec un nombre de répétitions n égal à 03 ; mg EAG : milligramme équivalent acide gallique ; EQ : équivalent quercétine ; MS : Matière sèche.

### 1.2 Effet antimicrobien :

Les résultats de l'effet inhibiteur l'extrait aqueux de *Mentha piperita* L. sur la croissance du germe *Streptococcus thermophilus* caractéristique du yaourt sont illustrés dans le (**Tableau6**).

Le test de croissance a révélé que le nombre de germes *Streptococcus thermophilus* est d'autant plus diminué que la solution en poly phénols est fortement concentrée de 0 à 20, à 40, à 60, à 80 et à 100% d'extrait aqueux de *Mentha piperita* L; soit des baisses du nombre de germes de  $260 \cdot 10^5$ , à  $207 \cdot 10^5$ , à  $122 \cdot 10^5$ , à  $70 \cdot 10^5$ , à  $20 \cdot 10^5$  et à  $0 \cdot 10^5$  UFC/ml, respectivement. Aucune croissance du germe étudié n'a été enregistrée au contact de l'extrait pur aqueux de la plante.

La gentamicine a présenté le diamètre d'inhibition le plus élevé ( $p < 0.01$ ) chez *Streptococcus thermophilus* (21.66 mm). Les solutions d'extrait aqueux de menthe concentrées à 20, 40, 60, 80 et 100%

ont présenté des diamètres qui diminuent significativement ( $p < 0.01$ ) de 7, à 7.66, à 14.66, à 17.66 et à 19 mm, successivement.

Les solutions préparées à 80 et 100 % d'extrait de *Mentha piperita* L. ont accusé des taux d'inhibition du germe proches de la gentamicine ; 81.56 et 87.71 %.

Par ailleurs, la CMI et la CMB vis-à-vis de *Streptococcus thermophilus* ont été obtenus successivement à 40 et 60% d'extrait aqueux phénolique de menthe.

Enfin, l'extrait aqueux a démontré un effet de type bactéricide à l'égard du germe spécifique du yaourt ; *Streptococcus thermophilus*.

**Tableau 6.** Effet de l'extrait aqueux de *Mentha piperita*.L sur la croissance du germe *Streptococcus thermophilus* caractéristique du yaourt.

Mesures		Concentrations en extrait aqueux de <i>Mentha piperita</i> .L (%)						Effet de l'extrait
		Témoin	20% (mg EAG/ml)	40% (mg EAG/ml)	60% (mg EAG/ml)	80% (mg EAG/ml)	100% (mg EAG/ml)	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Test de croissance (UFC/ml)	260 10 <sup>5a</sup>	207 10 <sup>5b</sup>	122.10 <sup>5c</sup>	70 10 <sup>5d</sup>	20 10 <sup>5e</sup>	0 <sup>e</sup>	$p < 0,01$
	Diamètre d'inhibition (mm)	21,66 <sup>a</sup>	7 <sup>d</sup>	7,66 <sup>d</sup>	14,66 <sup>c</sup>	17,66 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	$p < 0,01$
	Taux d'inhibition (%)	100 <sup>a</sup>	32,31 <sup>d</sup>	35,39 <sup>d</sup>	67,71 <sup>c</sup>	81,56 <sup>b</sup>	87,71 <sup>b</sup>	$p < 0,01$
	CMI	40 %						
	CMB	60%						
	CMB/CMI	1.5						
	Effet inhibiteur	Bactéricide						

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes, avec un nombre de répétitions  $n$  égal à 03 ; mg EAG : milligramme équivalent acide gallique ; FTAM : Flore totale aérobie mésophile ; UFC : Unité formant colonie ; CMI : concentration minimale inhibitrice ; CMB : concentration minimale bactéricide ; a,b,c,d,e : Groupes homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls.

## 2 Discussion :

D'après (Cox et al., 2000), l'activité antimicrobienne des extraits d'une plante médicinale est étroitement liée au profil chimique de ses constituants en principaux composés bioactifs et confirment que la plupart de ces composés sont dotés de propriétés antimicrobiennes remarquables ; mais c'est surtout les constituants, volatiles majeurs qui présentent, souvent, les propriétés inhibitrices vis-à-vis des microorganismes dont principalement les polyphénols, les composés alcaloïdes et les huiles essentielles.

Ces composés sont des molécules qui appartiennent aux métabolites secondaires des plantes. Environ 1000 substances ont été caractérisées (Dibong et al., 2011). Ils sont essentiellement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait constituent, sans doute, des éléments qui forment la partie intégrante de la plante médicinale étudiée à savoir *Mentha × piperita* L.

L'extraction aqueuse des composés bioactifs de Menthe par la méthode de (Soltana et al., 2009) a permis de séparer les principes actifs de la plante (*Mentha Piperita*) selon leur degré de solubilité dans l'eau utilisé comme solvant d'extraction et dont la plupart des effets antibactériens constatés sont attribués, certainement à leur grande richesse en composés phénoliques ayant un effet antimicrobien avéré contre de nombreux germes gram+ et à gram-incluant tels que (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus*) (Luck et al., 1995).

En effet, les taux de polyphénols totaux enregistrés dans l'extrait aqueux de l'espèce de la Menthe testée à savoir *Mentha × piperita* L. est remarquablement élevé (45.41 mgEAG/ml d'extrait) ; alors qu'au contraire les teneurs en flavanoïdes semblent notablement très faibles (0.43 mgEQ/ml d'extrait).

Selon François (2012), la Menthe poivrée (*Mentha piperita* L) peut être une source non négligeable en plusieurs composés phénoliques bioactifs, très intéressants pour la santé humaine constitués surtout de flavonoïdes dont : hétéroside d'apégénine, diosmétine, lutéoline, éridictiol, flavonepolyméthoxilé...etc.

D'après les résultats des tests antimicrobiens préliminaires effectués, il s'avère que la croissance du germe étudié *Streptococcus thermophilus* est inversement proportionnel aux taux en polyphénols dans les solutions d'extrait aqueux de Menthe poivrée. En effet,

l'accroissement des concentrations en extrait aqueux de la Menthe poivrée prélevée dans la région d'Ouargla-Algérie a induit des baisses hautement significatives ( $p < 0.01$ ) de la croissance de *Streptococcus thermophilus* et la prolifération du germe a été totalement réduite avec la solution d'extrait pur concentré à 100% d'extraits. Par ailleurs, l'extrait aqueux pur non dilué a présenté un taux d'inhibition proche de la gentamicine considéré comme étant un puissant antibiotique contre la plupart des germes pathogènes ou non( **Amara Mouloud, 2019**)

Apparemment l'extrait aqueux de *Mentha piperita* L semble exercer un effet antimicrobien de type bactéricide vis-à-vis du germe étudié. Cette action antimicrobienne de composés phénoliques sur les cellules des microorganismes peut être expliquée par une multitude d'influences : sur les parois cellulaires, sur l'ADN microbien, sur la synthèse des protéines et sur l'activité des enzymes (**Cowan, 1999**). Les composés phénoliques considérés comme des substances lipophiles agissent sur la cellule en perforant la membrane cellulaire. Cette perforation augmente le flux des protons vers l'intérieur de la cellule ce qui accroît le besoin en énergie (**Luck et al., 1995**).

En fin, d'après cette étude, il apparaît possible d'ajouter l'extrait de la Menthe poivrée (*Mentha piperita* L) riche en composés phénoliques dans le yaourt à une concentration de moins de 20% et de fabriquer un lait fermenté ayant les vertus d'un aliment santé pour le consommateur Algérien.

## **CONCLUSION GENERALE**

# Conclusion

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparaît que l'extrait à l'eau de la menthe poivrée *Mentha pipérta* L., récoltée dans la région de Ouargla au sud est d'Algérie, exerce un effet antimicrobien certain contre la croissance du germe spécifique du yaourt *Streptococcus thermophilus*.

La méthode des disques a montré que le diamètre d'inhibition des germes lactiques est d'autant plus augmenté que les solutions en extrait de menthe sont fortement concentrées.

La méthode de contact direct a dévoilé que la prolifération de ces germes lactiques sur milieu spécifique est inhibée totalement à des concentrations d'extrait de menthe poivrée supérieures à 80%.

La Concentration Minimales Inhibitrice de la croissance de *Streptococcus thermophilus* a été observée avec la solution préparée à 40% d'extrait de *Mentha pipérta* L ; alors que la concentration Minimale Bactéricide a été enregistrée à 60% d'extrait de la plante.

Les substances phénoliques ont démontré ainsi une action de type bactéricide vis-à-vis du germe lactique étudié *Streptococcus thermophilus*.

En perspective, Il est intéressant de mener une étude détaillée sur les principaux composés bioactifs constituant la menthe poivrée *Mentha pipérta* L afin de montrer leur importance et la possibilité de leur exploitation dans certains domaines d'intérêts: pharmaceutique, cosmétique, insecticide, alimentaire.

## **Références bibliographiques**

## A

**Alibert ,J.,Ranjeva,R.,Boudet,M.A.(1977).**Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15,279-301.

**Aissani.,Set,Maata,k. (1998).**Variation de la phenylamine Ammonialyase et la peroxydase au cours de la germination de l'onion sec (*Allium cepa* L). Mémoire d'ingénieur d'état, Institut de biologie (Univ.Mostaganem), 65 page

**Almas, K.N.H.Al-Bagieh.(1999).** The Antimicrobial effects of bark and pulp extracts of miswak, *Salvadora persica*. *Biomed Letters.*, 60: 71-75.

**Almas,K.(2001).**The Antimicrobial effects of seven different types of asian chewing sticks. *Odonto-Stomatologie Tropicale.*, 96: 17-20.

**Ait-Belgnaoui,A.,Lamine,F.,Han,W., Eutamene,H., Fioramonti,J., Bueno,L., Theodorou ,V.(2005).** A probiotic strain (*Lactobacillus farciminis*) prevents stress-induced increase of colonic permeability and visceral sensitivity to distension in rats *Nutr. Ali. Fonct.*. 3 : 59-63.

**Arumugam,P.,Ramamurthy,P.,Santhiy.,Sand Ramesh,A.2008.**Antioxidant activity measured in different solvent fraction obtained from menthe spicata Linn :An analysis by ABTS(+)decolorization assay. *asia pacific J of Clin Nutri* 15(1):119-124

## B

**Bahorun,T.(1997).** Substances Naturelles actives : La flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius, p83.

**Bourgeois,C.M.J.Y., Leveau .(1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique. Lavoisier : Tech. Et Doc., pp : 331.

**BABA AISSA,F. (1999).**Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). Ed Librairie moderne. ROUIBA. p 172.

**BRUNETON,J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Paris pp 533-536.

**Boudjemaa Khaled. (2008).**Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactisérum par streptococcue thermophilus. Mémoire de magister. option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés.

**BELAIDI,S.,BELAOUEDJ,A.(2018).** Effet des extraits de la Menthe Poivrée (Mentha Peperita) chez Staphylococcus aureus responsable des infections uro-génitales.

## *D*

**De Roissart H.B. (1986).** Les bactéries lactiques. Dans : le lait et les produits laitiers. Luquet F. M., 3, Ed. Techniques et Documentations Lavoisier. Paris, pp: 343-407.

**DANIEL,J.,RODOLPHE.,EDOUARD,S., VINCENT V,S. (2002).**Botanique systématiques des plantes à fleurs (Collection biologique). 2ème Edition. PPUR. 328 p.

**Denis, F. E., Bingen, C., Martin, M.C. Ploy ., R. Quentin. (2011).** Bacteriologie Medicale. 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.

**Dibong,SD.,Mpondo , E., Ngoye, A., Betti JL.(2011).** Ethnobotanique et phtytomédecine des plantes médicinales vendues sur les marchés de Douala, Cameroun. Journal of Applied Biosciences.

**Delachaux ., Nieslés.( 2013).** 500 plantes comestibles « Histoire. Botanique. Alimentaire » : 260-261.

## *E*

**ECK ,A. (1987).** Le fromage. Technique et documentation Lavoisier Paris 2ième édition: p1-15, 22, 55, 57,539, p 220-224,479, 499,501.

**EHRlich, S.D.(2005).** Complete genome sequence and comparative analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus. Unité Génétique microbienne. INRA. Domaine de Vilvert.

## *F*

**FREEMAN,L.,CAREL,Y. (2006).** Aromathérapie. *NUTRA NEWS* Science, Nutrition, Prévention et Santé).

**François ,C.( 2012).** Les plantes et leurs noms « Histoires insolites » : 152.

## G

**Guiraud ,J.P.(1998).**Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris., Microbiologie alimentaire, Paris Dunod. p90-91, 283, 288, 291,293, 294, 423, 567,572.

**Guignard ,J. L. (2000).** Biochimie végétale. Dunod, Paris., pp: 274.

## H

**Hertog,M.g.L ., Hollman,P.CH ., Venema.D.P. (1992).**Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially and carcinogenic flavonoids in vegetables and fruits.

J.agric food chem. 40 :1591-1598.

**Harbonne, J.B., Davidson,R.S., Hobbs, J.B., Banthorpe,D.V.(1994).** Their chemistry and biological significance.Longman scientific and technical, Eds natural products Polyphenolics London, pp 361-388.

**Hollman, P.C.H .,Katan, N.B .(1997).** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed and pharmacotherapy, 51 :305-310.

**Hammami,S.,Abdeselem, M. (2005).**Extraction et analyse des huiles essentielles de la menthe poivrée de la région de Ouargla. Thèse IngUniv Blida P69.

**Hurtado-Fernandez, E., Romero, M.G., Pancorbo A.C. (2010).** Application and potential of capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53: 1130-1160.

## I

**ISERIN,P.(2001).**Encyclopédie des plantes médicinales. Ed ISBN. 70p.

**Ignat,I.,Volf ,I.,Popa ,I.V. (2011).** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food chemistry 126: 1821-1835.

## K

**Kokate, CK., Varma, KC.** Antibacterial activity of volatile oil of seven species of Mentha Indian J Microbiol .1970,10(2),45.

**Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998).** Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria International. Journal of Food Microbiology., 41: 103-125.

**Kra, A.K.M.( 2001).** Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISCA contre *Aspergillus fumigatus*. *Thèse de doctorat 3ème cycle* UFR Biosciences.Univ. Abidjan., pp: 126.

**Knežević,S.V., Blazekwic, B.,Stefan, M.B., Babac, M.(2012).**Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In "Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao: 155-180.

## L

**Luck,E.,Jager,M.(1995).** Antimicrobial action of preservatives antimicrobial food additives.VERLAGE : 38-42.

**Lugasi ,A., Hovari,J., Sagi, K V ., Biro, L.(2003).** The role of antioxydant phytonutrients in the prevention of diseases. Acta biologica Szegedientis.1-4, 119-125p.

**Li HB.,Cheng, KW., Wong, CC., Fan, KW., Chen, F ., Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, 102, 771-776.

## M

**Macheix ,JJ., Fleuriet, A., Billot, J.**Fruits phenolic acids.CRC Press Doca Ratov Florida 1990. 3 :105-110.

**Martin,S.,Andriantsitohaina,R.(2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angiologie 51, 304-315.

**Moroh, J.L.A., C., Bahi, K., Dje, Y.G. Loukou .,F., Guede-guina.2008.** *Study of the antibacterial activity of Morinda morindoides(Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of Escherichia coli strains. Bulletin Societe Royale des Sciences Liege, 77: 44-61.*

**Merghem ,R. (2009).** Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine: 107-133.

**Mayo, B., Aleksandrak -piekarczyk ,T., Fernández ,M., Kowalczyk, M., Alvarez-Martín,P., Bardowski, J. (2010).** Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications Blackwell Publishing (3-34).*

## O

**OURGEOIS.LAPRENT, J.P .(1996).** Microbiologie alimentaire, Tome 2. Tec&Doc. P, 12, 321, 323,355.

**Olivier ,G. (2007) .**Caractéristique et mode d'action des antibiotiques.

## P

**Prescott, L.M., J.P. Harley .,D.A.,Klein.(2003).** Microbiologie. De Boeck-Supérieur., pp: 1137.

**Pereira Nunes, X., Souza Silva ,F., Alneida J.R.G. ,al.(2012).** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère edition Venketeshwer Rao. Pp 1-20.

## R

**Riberteau – Gayon, P .,Ganthert, R.J .(1968).**Les composés phénoliques des végétaux. Dunord, paris 243p.

**Richter,G.(1993).** Métabolisme des végétaux, physiologie et biologie et biochimie, les composés phénoliques, Edition press polytechnique, France, pp 302-304.

**Rock, E. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra- CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition–Clemont-Fenaud, 37-42.

## S

**Shahidi, F., Naczk, M.(1995).**Food phynolics : sources, chemistry, effects and application. Technologic publishing, Laucaster, 331p.

**Satura., Federighi .(1998).** In Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de magister. Option biochimie et microbiologie appliquées. Université M'Hmed Bougara –Boumerdés.

**Sultana, B, F., Anwar ., M, Ashraf. (2009).** Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules.*, 14: 2167-2180.

## Z

**Zrihi, G.N., A.K.M. Kra ., D.T. Etien .(2007).** Étude botanique et évaluation des activités antifongiques de *Mitracarpus villosus* (MV) (Rubiaceae) et *Spermacoce verticillata* (SV) (Rubiaceae) sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus*. *Revue Méd. Pharm. Afr.*, 20: 9-17.

# **ANNEXES**

## Composition des milieux de culture :

### Annexe A

#### • Milieu bouillon nutritive :

##### Composition :

Pour 1 litre d'eau distille

- Extrait de viande..... 1g
- Extrait de levure ..... 2,5g
- Peptone ..... 5g
- Chlorure de sodium ..... 5g
- Agar ..... 18g

PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :  $7 \pm 0,2$ . Autoclaver à 120°C/30 minute.

### Annexe B

#### • Gélose Mueller Hinton

##### Composition :

Pour 1 litre d'eau distille

- Extrait de viande..... 3g
- Hydrolysate de caséine (Tryptone) ..... 17,5g
- Amidon ..... 1,5g
- Agar agar ..... 18g

PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :  $7 \pm 0,2$ . Autoclaver à 120°C/30 minute.

### Annexe C

#### • Bouillon Mueller Hinton

##### Composition :

Pour 1 litre d'eau distille

- Extrait de viande.....3g
- Hydrolysate de caséine (Tryptone).. .....17,5g
- Amidon.....1,5g

PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C :  $7 \pm 0,2$ . Autoclaver à 120°C/30 minute.

## Annexe D

**Gélose M17 (pH = 6,2 ± 0,2)** pour préparer 1 litre de milieu :

- Tryptone .....	5,0 g
- Peptone de soja .....	5,0 g
- Infusion de viande .....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure .....	2,5 g
- Glycérohydrogénophosphate de sodium1 .....	9,0 g
- extrait de Lactose .....	5,0 g
- Acide ascorbique.....	0,5 g
- Sulfate de magnésium.....	0,25 g
- Agar .....	11,0g

## Annexe E

•**Eau physiologique** (Composition pour 1 litre d'eau distille) :

•Chlorure de sodium .....	9g
---------------------------	----

Autoclaver à 120°C/30 minute.