

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{me}. BERKAN BEN KOUBICH Hala et M^{me}. ZEROUG Amina

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 *Lactobacillus*
*bulgaricus***

Soutenu le 00/00/2020

DEVANT LE JURY

Président	M. BEKADA	Professeur.	C.U. Tisemsilt
Encadreur	M. AIT SAADA. D	M.C.A.	U. Mostaganem
Examineur	M ^{me} . AIT CHABANE. O	M.C.B.	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition- université de MOSTAGANEM

Année universitaire :2019-2020

Remerciements

A cette honorable occasion, nous tenons à remercier infiniment le grand Dieu « ALLAH ».

D'abord, nous tenons à exprimer nos gratitudee à notre encadreur, M. AIT SAADA. D, pour le soutien et les conseils qu'il a fournis tout long de ce travail. Ainsi, notre appréciation s'étend à tous les membres du jury

- Madame GUEMIDI notre dirigeante et conseillère.
- Monsieur BEKADA. Professeur à l'université de Tisemesilt.
- Madame AIT CHABANE Ouiza.

Finalement, nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à nos familles pour leurs encouragements et soutien.

Résumé :

L'objectif assigné à travers ce travail expérimental consiste à déterminer l'effet antimicrobien des composés phénoliques de *Mentha piperita* L sur le germe lactique *Lactobacillus bulgaricus* spécifique du yaourt. Les composés phénoliques de la plante objet de l'étude récoltée dans la Wilaya de Ouargla ont été extraits par macération dans une solution aqueuse. Les mesures de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux riche en composés phénoliques ont été réalisées in vitro en triple essais sur la souche bactérienne *Lactobacillus bulgaricus* et ont concerné : les tests de croissance, le test des disques de diffusion sur gélose, la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide.

L'extrait aqueux de *Mentha piperita* L., riche en composés phénoliques (45.41 mgEAG/ml) et pauvre en flavonoïdes (0.43 mgEQ/ml) est doué d'une activité inhibitrice remarquable sur la croissance du germe *Lactobacillus bulgaricus*. Il semble exercer un effet inhibiteur de type bactéricide sur la croissance de ce germe lactique. La CMI et la CMB chez *Lactobacillus bulgaricus* ont été obtenues à des concentrations respectives de 40% et de 60% d'extrait aqueux de la menthe poivrée.

Mots clé : *Mentha piperita* L., composés phénoliques, activité antibactérienne, *Lactobacillus bulgaricus*.

Abstract:

The assigned objective to this experimental research work is to determine the antimicrobial effect of phenolic compounds "*Mentha piperita L*" on the lactic acid germ "*Lactobacillus bulgaricus*" specific to yogurt. Moreover, the phenolic components of the studied plant were collected and extracted (in the Wilaya of Ouargla) by maceration in an aqueous solution. Furthermore, the measurements of the antibacterial activity of the aqueous extract that is rich of phenolic compounds were carried out in vitro triplicate tests on the bacterial strain "*Lactobacillus bulgaricus*" that are concerned with the growth tests, the test of the diffusion discs on agar, the concentration minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration.

The aqueous extract of "*Mentha piperita L*" that is rich in phenolic compounds (45.41 mgEAG / ml) and poor in flavonoids (0.43 mgEQ / ml) results it a remarkable inhibitory activity on the growth of the germ "*Lactobacillus bulgaricus*". It seems to exert an inhibitory effect of the bactericidal type on the growth of this lactic acid germ. MIC and CMB in *Lactobacillus bulgaricus* were obtained at concentrations of 40% and 60%, of aqueous extract of peppermint.

Keywords: phenolic compounds, *Lactobacillus bulgaricus*, in vitro, polyphenols, *Mentha piperita L*.

الملخص:

يُكمن هدف هذا البحث التجريبي في تحديد تأثير المركبات الفينولية المضادة للميكروبات "*Mentha piperita L*" على جرثومة حمض اللاكتيك المسماة بـ "*Lactobacillus bulgaricus*" والخاصة بالرُّبَادِيّ. إضافة إلى ذلك، تم جمع المكونات الفينولية للنبات الذي تمت عليه الدراسة بالنقع في محلول مائي. علاوة على ذلك، تم إجراء قياسات للنشاط البكتيري المضاد للمستخلص المائي الغني بالمركبات الفينولية عبر الإختبارات العملية الثلاثية "in vitro en triple essais" على السلالة البكتيرية "*Lactobacillus bulgaricus*". الإختبارات التي تم إجرائها تتعلق بإختبار النمو، إختبار إقراص الإنتشار على مادة الأجار الهلامية، التركيز الأدنى المثبط والحد الأدنى لتركيز مبيد الجراثيم .

المستخلص المائي لـ "*Mentha piperita L*" الغني بالمركبات الفينولية (45.41 mgEAG / ml) والفقير في الفلافونيدات (0.43 mgEQ / ml) ينتج عنه نشاط مثبط ملحوظ على نمو جرثومة "*Lactobacillus bulgaricus*". يبدو أنه يمارس تأثيرًا مثبطًا للنوع المبيد للجراثيم على نمو جرثومة حمض اللاكتيك. تم الحصول على MIC و CMB في "*Lactobacillus bulgaricus*" بتركيزات 40% و 60% من المستخلص المائي للنعناع.

الكلمات المفتاحية: المركبات الفينولية، المستخلص المائي للنعناع، جرثومة حمض اللاكتيك، النشاط البكتيري المضاد، النعناع الفلفلي.

Liste des abréviations :

• CPs :	Les composés phénoliques
• URSS :	Union des républiques socialistes soviétiques
• Lb :	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
• MS :	Matière sèche
• EQ :	Equivalent querecetine
• mgEAG :	Milligramme équivalent acide gallique
• UFC :	Unité formant colonie
• FTAM :	Flore totale aérobie mésophile
• CMB :	Concentration minimale bactéricide
• CMI :	Concentration minimale inhibitrice

Liste des figures :

Figure 01.	Morphologie de la menthe poivrée	P6
Figure 02.	Principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques	P35
Figure 03.	Principales voies de lipolyse chez les bactéries lactiques	P36
Figure 04.	Situation géographique de la région d'étude	P40
Figure 05.	Méthode des disques par diffusion	P45

Liste des tableaux :

Tableau 01.	Classification botanique de <i>Mentha piperita</i> L.	P5
Tableau 02.	Dosage des composés phénoliques.	P12
Tableau 03.	Structure des squelettes des polyphénols.	P18
Tableau 04.	Activités des composés phénoliques.	P26
Tableau 05.	Teneurs en en principaux composés phénoliques de l'extrait aqueux de <i>Mentha piperita</i> L.	P48
Tableau 06.	Effet de l'extrait aqueux de <i>Mentha piperita</i> L sur la croissance du germe <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (revoir).	P49

Table des matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Partie 1 : Etude bibliographique

Chapitre I : Présentation de l'espèce *Mentha piperita* L.

1. Généralités :.....	3
2. Définition :.....	3
3. Avantages de la phytothérapie :.....	3
4. Les menthes :.....	4
4.1. Origines historiques :.....	4
4.1. Menthe poivrée :.....	4
4.2.1. Classification botanique :.....	5
4.3. Caractéristiques :.....	6
4.3.1. Description botanique :.....	6
4.3.2. Pays d'origine :.....	6
4.3.3. Principaux pays producteurs :.....	7
4.3.4. Culture :.....	7
4.3.4.1. Calendrier de culture :.....	8
4.3.5. Récolte :.....	8
4.4. Conservation :.....	9
4.5. Composition chimique :.....	10
4.5.1. Parties actives :.....	10
4.5.2. Constituants principaux de la plante :.....	11
4.5.3. Dosage :.....	11
5. Propriétés :.....	12
5.1. Données pharmacologiques :.....	12
5.2. Autres emplois :.....	13
6. Utilisations :.....	14
6.1. Usage interne :.....	14
6.2. Usage externe :.....	15
7. Toxicologie :.....	15

Chapitre II : Les composés phénoliques

1. Généralités :.....	16
2. Définition :.....	16
3. Biosynthèse des composés phénoliques :.....	16
3.1 Voie des Shikimate :.....	16
3.2. Voie des phénylpropanoïdes :.....	17

4. Classification des composés phénoliques.....	17
4.1 Flavonoïdes :	17
4.1.1. Flavonols :	18
4.1.2. Flavones :	19
4.1.3. Flavanones :	19
4.1.4. Flavan-3-ols ou flavanols :	19
4.1.5. Isoflavones :	19
4.2. Anthocyanosides :	19
4.3. Tannins :	20
4.3.1. Tanins condensés :	20
5. Composition phénolique des menthes :	21
6. Propriétés biologiques des polyphénols :	23
7. Effets bénéfiques des polyphénols :	23
8. Rôles et intérêts des composés phénoliques :	24
8.1. Chez les végétaux :	24
8.2. Chez l'homme :	25
8.3. Rôle nutritionnel et thérapeutiques :	25
8.4. Rôle physiologique :	25
8.5. Rôle technologique :	26
9. Mode d'action des polyphénols :	26

Chapitre III : Les bactéries lactiques

1. Généralités :	28
2. Groupes des bactéries lactiques :	28
2.1. Bactéries homolactiques :	28
3. Caractéristiques :	29
3.1. Caractères morphologiques :	29
3.2. Caractères physiologiques :	30
4. Classification des bactéries lactiques :	30
5. Habitat :	31
6. <i>Lactobacillus</i> :	32
7. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> :	32
7.1. Bactériologie :	32
7.2. Propriétés technologiques :	33
7.2.1. Propriétés génétiques :	33
7.3. Production des bactériocines :	33
7.4. Métabolisme des bactéries lactiques :	33
7.4.1. Métabolisme des sucres :	33
7.4.1.1. Activité protéolytique :	35

7.4.1.2. Activité lipolytique :	35
7.5. Métabolisme de citrate :	36
8. Rôles et intérêt des bactéries lactiques :	36
8.1. Domaine alimentaire :	36
8.1.1. Rôle sur la structure et la texture des laits fermentés :	36
8.1.2. Rôle dans la conservation :	36
8.1.3. Rôles sur les caractéristiques organoleptiques :	36
8.2. Domaine de santé :	37

Partie 02 : Méthodologie expérimentale

1. Objectifs :	38
2. Région de prélèvement et traitement préliminaires du matériel végétal	39
2.1. Situation géographique de la région de l'étude	39
2.2. Climat	39
2.2.1. Précipitations	40
2.2.2. Température	40
2.2.3. Humidité moyenne	40
2.3 Matériel végétal	40
3. Extraction des composés bioactifs à différentes polarités	40
4. Effets antimicrobiens de l'extrait aqueux de menthe poivrée	42
4.1. Activation de l'inocula microbien	42
4.2. Effet antimicrobien	42
4.2.1. Méthode de contact direct	43
4.2.2. Méthode des disques par diffusion sur gélose	43
4.2.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	45
4.2.4. Concentration minimale bactéricide (CMB)	46
5. Traitement statistique	46

Partie 03 : Résultats et discussion

1. Résultats	48
2. Discussion	50
Conclusion générale	52
Références	54

Introduction :

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leurs dispositions. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre ? le hasard ? la religion ? la superstition ? L'expérience, certainement. Plusieurs théoriciens ont entrepris d'expliquer l'action des plantes sur l'organisme (**Iserin, 2001**).

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes. Depuis le XVII^e siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et isoler les substances chimiques qu'elles contiennent, on considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs (**Iserin, 2001**).

En outre, chaque plante médicinale contient des centaines de composants. On sait que, parmi ceux-ci, certains jouent un rôle important dans l'activité thérapeutique et sont désignés comme « métabolisme secondaire ». Parmi ces plantes on a la menthe poivrée (**Rombi et Robert, 2015**)

La menthe est l'une des plantes médicinales les plus célèbres. Elle aurait des vertus digestives, spasmolytiques, carminatives, antiseptiques, toniques et stimulantes. Elle participerait à l'équilibre digestif et améliorerait le tonus général. La menthe poivrée est la plus utilisée en phytothérapie, pour ses propriétés, connues de la tradition et étudiées scientifiquement.

En dehors des glucides, lipides, protides et vitamines que l'on retrouve chez tous les êtres vivants, les menthes contiennent de très nombreux composés spécifiques comme les dérivés phénoliques. De très nombreuses activités ont été reconnues à ces composés (la plupart du temps, les effets sont liés à une famille chimique déterminée et comme une même plante possède plusieurs de ces familles dans sa composition, elle est susceptible d'agir dans des

domaines très variés). Dans les effets les plus fréquemment retrouvés, on trouve des activités antimicrobiennes.

L'objectif visé par cette présente étude est de déterminer l'effet antimicrobien in vitro des composés phénoliques des feuilles de *Mentha piperita* L sur une bactérie lactique la plus utilisée en yaourtière à savoir *Lactobacillus bulgaricus*.

Ce manuscrit comporte trois parties dont la première constitue un recueil bibliographique concernant l'espèce végétale (*Mentha piperita* L.), les composés phénoliques et les bactéries lactiques dont *Lactobacillus bulgaricus*. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées pour l'appréciation de l'activité antibactérienne des composés phénoliques contenus dans l'extrait aqueux de la plante objet de l'étude (menthe poivrée). La dernière partie est une présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion et les perspectives de recherche développement à entreprendre dans un futur proche.

Partie 01 : Etude bibliographique

Chapitre I : Présentation de l'espèce *Mentha piperita* L

Chapitre I : Présentation de l'espèce *Mentha piperita* L.

1. Généralités :

Depuis la nuit des temps les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie. D'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (**Iserin, 2001**).

2. Définition :

La phytothérapie est l'art d'utiliser les plantes pour se soigner. Du grec « phyton » qui signifie plante et « therapein » qui signifie soigner, il s'agit donc d'une thérapeutique allopathique (c'est-à-dire soigner par des substances qui ont l'effet inverse à la pathologie dont souffre le patient) destinée à prévenir et traiter des troubles fonctionnels et des états pathologiques bénins par des plantes médicinales dénuées de toxicité dans les conditions normales d'utilisation. (**Grenez, 2018**).

3. Avantages de la phytothérapie :

La phytothérapie est très certainement la meilleure approche d'une médecine de santé tournée autant vers la prévention que vers les soins. Les plantes constituent une réponse de choix pour fournir à l'organisme les substances nécessaires pour maintenir son équilibre, rester en bonne santé et le cas échéant corriger ses dysfonctionnements. L'un de ses atouts est le très grand nombre de remèdes et de préparations à base de plantes issus d'une utilisation pluriséculaire sur une base purement empirique. Non seulement de très nombreuses préparations de médecine traditionnelle chinoise, indienne sud-américaine et africaine sont à

notre disposition mais, en plus, près des deux tiers des 300000 espèces végétales connues n'ont pas encore été étudiées (**Rombi et Robert, 2015**).

4. Les menthes :

Le genre *Mentha* est un groupe qui comprend de nombreuses espèces : plus de 25, largement cultivées dans de nombreux pays, mais originaires de régions tempérées et subtropicales d'Europe et d'Afrique. Cette répartition fait de la menthe, aujourd'hui, la plante probablement la plus répandue et la plus célèbre de nos plantes médicinales et aromatiques. (**Carlier, 2015**).

4.1. Origines historiques :

La plante était déjà connue des Egyptiens. Il a été retrouvé des fragments de plante séchée dans des tombeaux remontant aux XIIe et XVIe siècles, elle était utilisée pour la conservation des momies. Probablement en raison de son fort arôme, la menthe était utilisée avec le myrte et le romarin durant les cérémonies funéraires, afin de masquer l'odeur de cadavres. (**Carlier, 2015**).

4.1. Menthe poivrée :

Le genre menthe (*Mentha sp*) fait partie de la famille des Lamiacées. Il existe plusieurs espèces de menthes, elle mêmes subdivisées en sous espèces. On trouve par exemple :

- La menthe poivrée (*Mentha piperita*) : hybride de la menthe aquatique et de la menthe verte.
- La menthe pouliot (*Mentha pulgium*).
- La menthe sylvestre (*Mentha silvestris*).
- La menthe aquatique (*Mentha aquatica*).
- La menthe verte (*Mentha viridis* ou *Mentha spicata*).

- La menthe des champs (*Mentha arvensis*).

La plus connue et là plus cultivée dans le monde est la menthe poivrée, la *piperita*. Décrite par Linné « comme une espèce distincte (*M. piperita*) dans la première édition du Species plantarum, les botanistes modernes s'accordent à voir en elle un hybride issu du croisement des *M. viridis* L. et *aquatica* L. qui aurait été fixé par la culture ». (Bois, 1934).

La menthe poivrée est cultivée en Europe (en France notamment), en Asie et en Amérique du Nord. C'est une petite plante de 80 cm de haut, vivace par son rhizome, aux tiges de section carrée. Les feuilles sont de couleurs sombres et ce sont les sommités fleuries qui sont utilisées pour produire son HE. (Teruin, 2018).

4.2.1. Classification botanique :

La systématique proposée ci-dessous (Tableau 01) est en accord avec la classification APG IV (Angiosperms Phylogeny Group quatrième version datant de 2016).

Tableau 01. Classification botanique de *Mentha piperita* L. (Erceau et Pasquier, 2016).

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordres	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Mentha
Espèce	<i>Mentha x piperita</i>

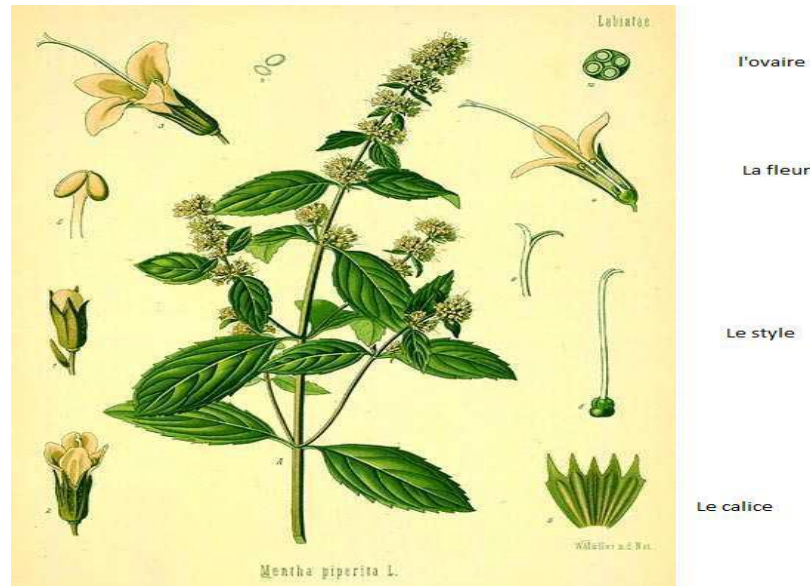


Figure 01. Morphologie de la menthe poivrée. (Eberhard, 2005).

4.3. Caractéristiques :

Ces herbacées vivaces peuvent s'élever jusqu'à 45 cm pour une envergure de 30 cm. Leurs tiges et racines, robustes et solides, rampent sous la terre et établissent de nouveaux plants au fur et à mesure de leur progression : une herbe, donc, difficile à éradiquer. Leurs petites fleurs mauves bleuté, qui fleurissent à la fin de l'été, sont portées en grappes ou sur des brins tubulaires. (Callery, 1998).

4.3.1. Description botanique :

Des tiges quadrangulaires vertes ou violacées, des feuilles simples, opposées décussées, dentées, des fleurs faiblement bilabiées à corolle pourpre groupées en épis très serrés caractérisent cet hybride vivace se multipliant par stolons (*M. aquatica* x *M. spicata* L.). (Rombi et Robert, 2015).

4.3.2. Pays d'origine :

La dénomination des différentes formes de cet hybride – apparu en Angleterre – est souvent confuse : la forme *officinalis rubescens* (Mitcham) est la plus cultivée (Etats-Unis,

Europe), la menthe blanche (formes *palescens*) est cultivée dans l'ex URSS et la menthe dite Hongroise, (*sylvestris rubescens*) çà et là. **(Rombi et Robert, 2015).**

4.3.3. Principaux pays producteurs :

Mentha x piperita s'est naturalisée dans de nombreux pays d'Europe : Royaume-Uni, Danemark, Irlande, Belgique, Pays-Bas, Allemagne, Autriche, Pologne, Ukraine, Bulgarie, ex-Yougoslavie, Grèce, Italie, Roumanie, France, Portugal, Espagne... Ainsi que dans les Açores, en Sibérie (Russie), Australie, Nouvelle-Zélande, et aussi en Amérique du Nord (Canada, États-Unis).

Les États-Unis sont les plus gros producteurs de menthe au niveau mondial. Mais il s'en produit aussi en Chine, aux Indes, en Australie, dans quelques pays d'Europe (France, Italie) et au Canada (Lachance, 2001).

En Afrique du Nord, l'espèce est retrouvée dans beaucoup de jardins et en culture pour des buts culinaires. **(Erceau et Pasquier, 2016).**

4.3.4. Culture :

La menthe se multiplie par transplantation de boutures prélevées sur la tige d'une plante établie, à environ 5 cm de profondeur, dans un sol fertile et humide, à n'importe quel moment de la saison de pousse ou presque. Les menthes doivent être contenues dans un espace réservé, ou, mieux encore être cernées de briques ou de dalles, on peut aussi enfoncer des piquets de plastique dans le sol pour mieux les cloisonner. La culture en conteneurs donne de bons résultats à condition d'arroser régulièrement -ou de ficher le conteneur dans la terre. On peut cultiver toutes les menthes à l'intérieur, à l'exception de la menthe pomme. Pour qu'il soit généreux, un parterre de menthe, dans un jardin aromatique, doit être déplacé et recréé

tous les trois ou quatre ans, afin de réduire les risques de maladies, principalement la rouille. (Callery, 1998).

En hiver, on peut mettre en assortiment de plants de menthe en jardinière ou en pot, et les rentrer au chaud sous une véranda ou une serre, ce qui stimulera la croissance de pousses fraîches, consommables alors au bout de trois ou quatre semaines.

4.3.4.1. Calendrier de culture :

Jan	Fév.	Mars	Avr.	Mai.	Juin.	Juil.	Août.	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
		•	•								



Semis en pleine terre.



Semis sous abri (en pot ou en pleine terre sous un tunnel).



Plantation en pleine terre.



Récolte.

4.3.5. Récolte :

Le moment de la récolte doit se faire à un moment bien particulier du cycle végétatif de la plante. En effet, en fonction de son stade, la quantité d'essence dans les organes producteurs sera plus ou moins importante. Dans le cas de la menthe poivrée, la récolte doit se faire avant la floraison car passé ce stade, la part de cétones va augmenter.

La récolte peut se faire tout au long de l'année surtout de juin à juillet. Elle se fait manuellement avec une petite faucille, ou de façon automatisée. La coupe s'effectue au ras du sol ou à quelques centimètres selon la hauteur de la tige. Les tiges feuillées sont récoltées avant floraison. Deux à trois récoltes sont possibles par an, selon la température et la luminosité. (Callery, 1998).

4.4. Conservation :

- **Fraîche** : Peut être conservée de quelques jours à une semaine au réfrigérateur. La manière la plus efficace de conserver les feuilles consiste à les envelopper dans un papier essuie-tout humide qu'on place ensuite dans un sachet de plastique.
- **Au congélateur** : on peut également les congeler en les étalant sur une plaque avant de les enfermer dans un sac de plastique. Ou, les hacher et les mettre dans un bac à glaçons avec de l'eau.
- **Séchée** : On peut sécher les feuilles dans un contenant hermétique au frais, au sec et à l'abri de la lumière. On peut facilement faire sécher ses surplus de menthe fraîche en débarrassant les tiges de leurs feuilles et en mettant ces dernières sur une toile moustiquaire de nylon. Ne les réduire en poudre qu'au moment de s'en servir afin qu'elles préservent leur arôme plus longtemps. Une fois les plantes sèches, les feuilles se détachent facilement de la tige. Leur conservation est sans problème.
- **Macérée** : hacher les feuilles et les mettre dans de l'huile ou du vinaigre et laisser macérer. (Iserin, 2001).

4.5. Composition chimique :

4.5.1. Parties actives :

Elle est constituée par la feuille séchée entière ou coupée de *M.x piperita*. Entière, elle doit contenir au minimum 1,2% d'HE. **(Rombi et Robert, 2015)**

La feuille de menthe poivrée a une odeur caractéristique et pénétrante et une saveur aromatique caractéristique ; la couleur est verte à vert-brun avec, dans certaines variétés, des nervures violet-brun. Les pétioles sont verts à violet-brun. **(Rombi et Robert, 2015).**

La feuille a un limbe d'une longueur de 3 à 9 cm sur une largeur de 1 à 3 cm, ovale ou lancéolé, acuminé au sommet, bordé de dents aigues, de base asymétrique. La nervation est pennée, proéminente à la face inférieure. La face inférieure est légèrement pubescente. Le pétiole, d'une longueur de 0,5 à 1 cm, est sillonné. **(Rombi et Robert, 2015).**

La poudre est verte-brun, au microscope, présente des stomates diacytiques nombreux surtout à la face inférieure ; des poils tecteurs coniques, courts, monocellulaires ou bicellulaire et d'autres plus effilés, unisériés, de 3 à 8 cellules à cuticule striée ; des poils sécréteurs à pied monocellulaire, arrondie, d'un diamètre de 15 à 25 μm et le second avec un tête renflée, ovale, d'un diamètre de 55 à 70 μm , composée de 8 cellules rayonnantes. **(Rombi et Robert, 2015).**

La CCM de l'extrait chlorométhylénique montre que le menthol donne « une bande intense » avec d'autres bandes correspondant au cinéole, thymol et acétate de menthyle entre autres. **(Rombi et Robert, 2015).** L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes fleuries est constituée de 2,8 à 10% d'acétate de menthyle, de 14 à 32% de menthone et de 30 à 55% de mentho. **(Rombi et Robert, 2015).**

4.5.2. Constituants principaux de la plante :

A côté de l'huile essentielle qui est considérée comme l'élément actif, la feuille renferme également des triterpènes, des caroténoïdes et des flavonoïdes. Plusieurs d'entre eux sont des flavones fortement oxygénés (gardénines B et D, xanthomicrol, 5-O-desméthylnobilétine, 5,6-dihydroxy-7, 8,3',4'-tétraméthoxyflavone...). Ce type de composés est identique à celui qui caractérise certains chimiotypes du thym. D'autres flavonoïdes et composés polyphénoliques sont présents : ériocitrine, lutéolol-7-O-rutinoside, diosmine, hespéridine, narirutine, isorhoifoline, acide rosmarinique et caféique. **(Rombi et Robert, 2015).**

Les constituants majoritaires d'HE est toujours le (1R, 2S, 5R) (-) -menthol (30 à 40%), accompagné de (-) -menthone (15-25% chez la Mitcham, moitié moins chez la menthe blanche) et d'acétate de (-)-menthyle (plus abondant chez la menthe blanche) et sont également présents : (+)-isomen-thone, (+)-néomenthol, cinéole, menthofurane, germacrène D et autres carbures.**(Rombi et Robert, 2015).**

Ces proportions varient selon les cultivars, ex : le (-) menthol peut dépasser 50%, le (+) -menthofurane et la (+) -isommenthone semblent varier entre 0 et 10%. Fleurs et feuilles fournissent une huile essentielle différente et de très nombreux facteurs influencent la composition : conditions culturales, variations climatiques, période de récolte mais aussi procédé d'obtention. **(Rombi et Robert, 2015).**

4.5.3. Dosage :

A partir de l'analyse chromatographique, 27 composés volatils ont été détectés avec un total de 99.51% de cette huile dont les composés majoritaires sont : le menthol (46.32%), le menthofurane (13.18%), l'acétate de menthyle (12.10%), le menthone (7.42%) ainsi que le

1.8-cineole (6.06%) (**Tableau 02**). Par conséquent, il est clair que le menthol est le principal composant majeur de cette huile essentielle.

Tableau 02. Composés chimiques d'HE de *Mentha piperita*. (Chraïbi, 2018).

Constituants	%
α -thujene	0.31
α -Pinene	0.32
verbenene	0.02
sabinene	1.38
β -pinene	0.53
α -Phellandrene	0.01
P-cymene	0.03
Limonene	3.01
1.8-Cinéole	6.06
Cis-	0.24
Linalool	0.05
Chrysanthone	0.42
Menthone	7.42
Menthofuran	13.1
Neomenthol	4.79
Menthol	46.3
Terpinen-4-ol	0.04
α -terpineol	0.03
Carvone	1.02
Neomenthylacétate	0.43
Menthyl acétate	12.1
Isomenthylacétate	0.82
α -terpinylacetate	0.03
β -Bourbonene	0.37
α -Gurjunene	0.03
β -caryophyllene	0.55
α -humulene	0.01
Total	99.5

5. Propriétés :

5.1. Données pharmacologiques :

La menthe jouit d'une solide réputation en particulier pour soulager les douleurs gastro-intestinales. L'huile essentielle et divers extraits ont été étudiés. C'est surtout l'activité spasmolytique de l'huile essentielle qui a suscité l'intérêt des chercheurs. Celle-ci, est active

sur l'iléon et, plus faiblement, sur la trachée de cobaye in vitro (EC50= 26 et 87 mg/l). D'autres travaux confirment son action antispasmodique et montrent que le menthol est le constituant le plus actif. Forster et al (1980) ont démontré l'action inhibitrice de la menthe sur les contractions de l'iléon de cobaye, induites par l'acétylcholine. **(Rombi et Robert, 2015).**

L'huile essentielle de menthe (3 mg/kg) est active sur le sphincter d'Oddi du cobaye : elle lève la contraction induite par la morphine. Par ailleurs, le menthol, comme d'autres terpènes, prévient la formation de plaques d'athérome chez le lapin soumis à un régime enrichi en cholestérol, augmente le HDL-cholestérol mais, curieusement, inhibe la lécithine cholestérol acyltransfère (enzyme impliquée dans le processus de transport du cholestérol par les HDL). Cet alcool, en mélange (32%) avec d'autres monoterpènes cycliques réduit l'activité de l'HMG-CoA-réductase chez le rat (2 g/kg). **(Rombi et Robert, 2015).**

Une action radioprotectrice (8 Gy/20j – rayonnement γ) d'un extrait de feuilles administré à des souris (1g/kg/j) a été observée (protection des ulcérations de la muqueuse intestinale, des chromosomes de la moelle osseuse). Elle s'accompagnerait d'un effet immunomodulateur, anti génotoxique et chimio protecteur. Le mécanisme de cet effet radioprotecteur est essentiellement lié à l'activité antiradicalaire et antioxydante des polyphénols et des flavonoïdes. Parmi ceux-ci l'ériocitrine (ériodicytol 7-O-rutinoside) semble jouer un rôle important. **(Rombi et Robert, 2015).**

5.2. Autres emplois :

La menthe, depuis longtemps en vente libre, est très largement utilisée en infusion (vrac, infusettes) comme « boisson hygiénique et d'agrément » pour « faciliter la digestion ». Sous ses différentes formes, en particulier en gélules de poudre totale, elle est indiquée dans le

traitement symptomatique des troubles digestifs mineurs : ballonnements, digestions lentes, flatulence, etc. et comme cholérétique. **(Rombi et Robert, 2015)**.

6. Utilisations :

L'HE de menthe poivrée doit être utilisée avec précaution du fait de sa richesse en composés cétoniques. Les cétones sont des molécules, qui, à faibles doses, possèdent une activité stimulante mais à des doses supérieures deviennent neurotoxiques, pouvant conduire à des convulsions et même jusqu'au décès. Comme cité dans la partie toxicité, il existe une classification de l'effet délétère de ces composés. L'HE de menthe poivrée en possède deux différentes, la menthone et l'isomenthone, qui sont considérées comme des cétones de toxicité moyenne. Il convient d'être donc particulièrement vigilant lors de l'emploi d'HE contenant ce type de composés. Les voies d'administration autorisées sont la voie orale et la voie cutanée à partir de 12 ans. En revanche, les diffusions sont à éviter, seules de très faibles quantités diluées peuvent être utilisées. Elle est déconseillée aux personnes asthmatiques et en utilisation sur une surface étendue (vasoconstriction induisent un effet froid). **(Teruin, 2018)**.

6.1. Usage interne :

L'HE de menthe poivrée est utilisée par voie orale pour ses propriétés toniques, en particulier sur le système nerveux. Elle est antiasthénique et peut être utilisée en préparation d'examen. L'action tonique agit également sur le cœur, ce qui lui confère des propriétés hypertensives. Elle possède aussi des propriétés digestives. Elle agit au niveau des dyspepsies, des nausées et des flatulences. Elle est aussi cholérétique et cholagogue, avec une action sur la reconstitution hépato-cellulaire. On préconise une goutte sur un comprimé neutre après le repas, en évitant le soir en raison de son action stimulante. Elle est enfin antalgique et anesthésiante, avec une composante anti-inflammatoire. Elle est donc souvent utilisée dans les

migraines et les céphalées. Elle possède aussi un pouvoir immunostimulant et anti-infectieux (bactéricide, virucide, fongicide et vermicide). On l'utilise lorsque les infections ORL sont accompagnées de signes inflammatoires dans les otites, les rhinites, sinusites et laryngites. La posologie usuelle est de 2 gouttes 3 fois par jour pour les adultes et 1 goutte 2 fois par jour à partir de 12 ans. (Teruin, 2018).

6.2. Usage externe :

En raison de la vasoconstriction entraînée par la menthone, l'usage externe doit toujours s'effectuer sur de petites zones et de manière très diluée. De plus, dans l'utilisation contre la migraine, il faut bien veiller à emprisonner l'HE dans une huile végétale avant de l'appliquer en massage sur les tempes. En effet, l'HE étant très volatile, cela pourrait entraîner une irritation oculaire, les tempes étant proches des yeux. Sa composante anti-inflammatoire est exploitée dans le cadre de névralgie, sciatique et tendinite. Les cétones qu'elle contient lui confèrent un pouvoir cicatrisant, elle est utilisée dans le cadre d'eczéma et d'urticaire. On l'applique à raison de 2 gouttes 3 fois par jour pour les adultes, diluée à 5% et 1 goutte 3 fois par jour à partir de 12 ans, dilué dans une huile végétale. (Teruin, 2018).

7. Toxicologie :

Même si un cas exceptionnel d'intoxication a pu être signalé la feuille est dépourvue de toxicité ; ce n'est pas le cas de l'huile essentielle et de ses constituants dont l'administration prolongée (un mois) induit, chez le rat, des modifications histopathologiques au niveau de l'encéphale (HE, 40-100 mg/kg) dues sans doute à la pulégone. La dose journalière de menthol à ne pas dépasser a été fixée à 0,2 mg/kg. (Rombi et Robert, 2015).

Chapitre II : Les composés phénoliques

Chapitre II : Les composés phénoliques

1. Généralités :

Chaque plante médicinale contient plusieurs centaines de composants. On sait que, parmi ceux-ci, certains jouent un rôle important dans l'activité thérapeutique et sont désignés comme « constituants actifs ».

En dehors des glucides, lipides, protides et vitamines que l'on trouve chez les êtres vivants, les plantes contiennent des très nombreux composés spécifiques comme les dérivés phénoliques (phénols, acides phénols, dérivés phénylpropaniques, coumarines, lignanes, flavonoïdes, anthocyanosides, tanins, quinones).

2. Définition :

Les composés phénoliques peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie de simples molécules (acides phénoliques simples) aux molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés), avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées. (Urquiaga et Leighton, 2000).

3. Biosynthèse des composés phénoliques :

3.1 Voie des Shikimate :

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique. Cette voie conduit à la formation des oses aux acides aminés

aromatiques (Phénylalanine et tyrosine), puis par désamination conduit aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénones, lignanes, et lignines, coumarines. **(Bruneton, 1993)**.

3.2. Voie des phénylpropanoïdes :

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose. **(Bruneton, 1993)**.

4. Classification des composés phénoliques :

Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones. Ces molécules sont généralement trouvées conjuguées aux sucres et les acides organiques **(Tableau 03)**.


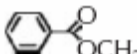
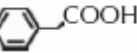
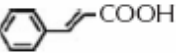
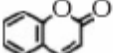

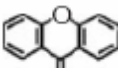
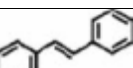
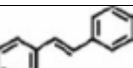
4.1 Flavonoïdes :

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres partie de la plante. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance **(Hysteen, 2002)**.

Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆

(revoir) de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao et al., 2004).

Tableau 03. Structure des squelettes des polyphénols (Crozier et al, 2006)

Nombre de carbone	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	acide phénols	acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	acétophénones	gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	acide phénylacétique	acide-hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	acide hydroxycinamique	acide-coumarique	
9	C ₆ -C ₃	coumarines	esculitine	
10	C ₆ -C ₄	naphthoquinones	juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	xanthones	mangiferine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbènes	resvertrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoïdes	naringénine	

4.1.1. Flavonols :

Ce sont les flavonoïdes les plus répons dans le règne végétal, ils essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés (Fraga, 2009).

4.1.2. Flavones :

Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent leur apport alimentaire est très faible (**Fraga, 2009**).

4.1.3. Flavanones :

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée (**Portet, 2007**).

4.1.4. Flavan-3-ols ou flavanols :

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C₃ et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C₄, elles sont souvent à l'origine de polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés (**Fraga, 2009**).

4.1.5. Isoflavones :

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes. Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C₃ plutôt qu'à la position C₂. Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal (**Fraga, 2009**).

4.2. Anthocyanosides :

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plante des fleurs et des fruits. Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont

des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylium. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux). (**Brouillard et al., 1997**).

4.3. Tannins :

Cette classe désigne le nom générale descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

Tannins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins. (**Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999**).

4.3.1. Tanins condensés :

Tannins condensés ou tanins catechiques ou proanthocyanidols qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères. (**Bruneton, 1999**).

5. Composition phénolique des menthes :

Plusieurs études ont démontré la richesse des menthes en composés phénoliques, particulièrement en acide phénoliques et en flavonoïdes. De tous les acides phénoliques, le genre *Mentha* est spécialement riche en acide caféique et ses dérivés. Ce dernier représente 60 à 80% des composés phénoliques totaux (**Dorman et al., 2003**).

De plus, la forme libre de l'acide, l'isomère glucuronide a été détecté chez l'espèce *M.* (**Taamalli et al., 2015**).

La présence de l'acide chlorogénique a été trouvée dans plusieurs menthes, citant comme meilleur exemple l'espèce *M. x piperita*. (**Misan et al., 2011**).

Par ailleurs, l'acide rosmarinique est l'acide phénolique le plus abondant chez les espèces de menthes. Son contenu rapporté chez la menthe poivrée est d'environ 30% des polyphénols totaux. (**Fecka et Turek, 2007 ; Dorman et al., 2009 ; Misan et al., 2011**).

En outre, il a été détecté dans les espèces sauvages de menthes, sept acides salvianoliques (**Taamalli et al., 2015**).

En plus de l'acide caféique et de ses dérivés, d'autres acides organiques ont été rapportés, par exemple l'acide caftarique, l'acide cinnamique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique, l'acide oléonolique et l'acide vanillique ont été trouvés chez différents espèces du genre *Mentha*.

Les menthes sont également riches en flavonoïdes, particulièrement en flavones et flavonones, ces derniers représentent 10 à 70% du contenu phénolique total. La lutéoline et ses dérivés sont les flavones majeurs décrits pour les menthes. Par ailleurs, les dérivés glucosiques comme lutéoline-O-glucoside et lutéoline-O rutinoside sont souvent décrits

comme composés phénoliques majoritaires. (**Hussain et al., 2010 ; Misan et al., 2011 ; Benedec et al., 2013**).

L'apigénine et ses dérivés comme les glucides et les rutinoside peuvent aussi être présents chez les espèces de menthes. D'autres flavone détectés chez les menthes incluent par exemple l'acacétine et ses glycosides, la diosmine, la salvigénine et la thymonine. (**Fecka et Tureck, 2007**).

Les espèces du genre *Mentha* sont riches en flavanones et en composés de cette classe incluant essentiellement les dérivés de l'eriodictyol, naringenine et hesperitine. Ces composés apparaissent fréquemment, comme dérivés du glucoside. Par exemple, l'hesperidine (hesperitine-7-O-rutinoside), eriodictyol-O-glucoside et naringenine-7-O-glucoside ont été décelé dans la menthe poivrée. D'autres part, l'eriocitrine (eriodictyol-7-O-rutinoside) est le flavone le plus abondant dans les menthes selon. (**Fecka et Tureck, 2007**).

La narirutine a été également détectée comme composé majoritaire chez l'espèce *M x piperita*. Les flavonols et les dihydroflavonols sont moins rapportés dans les menthes. Néanmoins, le flavonol kaempferol a été décelé chez plusieurs espèces de menthes, ainsi que ses glucosides, rhamnosides, rutinosides et sophorosides chez *M x piperita* ou *M longifolia*. (**Dolzhenko et al., 2010 ; Stanisajljevic et al., 2012**).

En outre la présence de rutine a été décrite par plusieurs auteurs. D'autres flavonols ou dihydroflavonols détectés incluant par exemple la quercétine et la myricétine. Les flavonoles rapportés dans les menthes sont par exemple la catéchine et l'épicatéchine. (**Bimakr et al., 2011 ; Igoumenidis et al., 2016**).

Les coumarines détectées sont l'esculetine et la scopoletine (**Adam et al., 2009**). Les anthocynidines cynidiques, delphinidine, luteolinidine, perlagronidine et petunidine, ont été

décélés chez l'espèce *M x rotundifolia L.* le resveratrol stillenoïde et le tyrosol phénylthanoïde ont également été trouvés chez l'espèce *M spicata*. (**Igoumenidis et al., 2016**).

6. Propriétés biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier, sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-arthérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire. Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes. (**Nijyeldt et al., 2001**).

7. Effets bénéfiques des polyphénols :

La phytothérapie et l'hygiène alimentaire. D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité anti-oxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes à la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes, chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Hennebelle et al., 2004**).

8. Rôles et intérêts des composés phénoliques :

Les composés phénoliques possèdent un ensemble de propriétés importantes. Leurs études deviennent de plus en plus un outil dans des recherches de physiologie, de biologie, de botanique et également de technologie alimentaire.

8.1. Chez les végétaux :

Selon certains auteurs, les composés phénoliques peuvent intervenir dans les aspects de la physiologie des plantes (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganisme symbiotiques ou parasites, ...) ; ou les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relation avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux ; ou les critères de qualités (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles, ...) qui orientent le choix de l'homme dans la consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules, ...) et des produits qui en dérivent de leur transformation ; ou les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées, ...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini. **(Fleuriet et al., 2005 ; Boutour, 2011).**

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment celle des fleurs : comme les anthocyanes qui constituent un groupe de pigments responsables de la couleur rouge, bleue ou violette de très nombreuses fleurs ou feuilles. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que le plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant ainsi une étape fondamentale de sa production. Il est également à noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur gout

désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Certains d'entre eux jouent un rôle de phyto-alexines. D'autres part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (Maillard, 1996 ; Hadi, 2004).

8.2. Chez l'homme :

Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés anti-oxydantes. Plusieurs propriétés sont attribuées aux 13 flavonoïdes : veinotonique, anti-tumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne et hépato-protective. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent les artères contre l'athérosclérose et réduisent la thrombose (Cruz et al., 2001 ; Mikkoen et al., 2001).

8.3. Rôle nutritionnel et thérapeutiques :

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale. A d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le (Tableau 04).

8.4. Rôle physiologique :

Des travaux très anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormances

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 rayonnement UV (Alibert et al., 1977).

Tableau 04. Activités des composés phénoliques. (Bahorum, 1997).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamique et benzoïques).	<ul style="list-style-type: none"> - Antibactérienne. - Antifongique. - Antioxydants.
Coumarines	<ul style="list-style-type: none"> - Protectrices vasculaires. - Anti-œdémateuses.
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Anti tumorale. - Anti carcinogène. - Anti-inflammatoires. - Hypotenseurs et diurétiques. - Antioxydants.
Anthocyanes	<ul style="list-style-type: none"> - Protectrices capillaire-veineux.
Proanthocyanidines	<ul style="list-style-type: none"> - Effets stabilisants sur le collagène. - Antioxydants. - Anti-tumorales. - Antifongiques. - Anti-inflammatoires.
Tanins galliques et catéchiques	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydants.

8.5. 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).

9. Mode d'action des polyphénols :

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

- Influence sur les parois cellulaires.
- 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. Les dérivés de l'acide benzoïques 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 pas possible que dans une phase aqueuse uniquement et la substance antimicrobienne doit être hydrosoluble afin de traverser la paroi de la cellule.

Chapitre III : Les bactéries lactiques

Chapitre III : Les bactéries lactiques

1. Généralités :

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries bénéfiques qui produisent toutes l'acide lactique comme produit majeur du métabolisme. Elles sont des Cocci ou des Bâtonnets, à gram positif, catalase négative, auxotrophes et généralement immobiles (**Badis et al., 2005**).

Selon les espèces et les conditions de culture, les bactéries lactiques peuvent être anaérobie facultatives ou micro-aérophiles. Elles sont mésophiles ou thermophiles qui peuvent se développer à des températures comprises entre 10°C et 45°C. Elles tolèrent des pH acides (entre 4 et 4.5).

2. Groupes des bactéries lactiques :

Selon la nature des produits du métabolisme obtenu à partir des glucides, on distingue deux groupes :

2.1. Bactéries homolactiques :

Toutes les bactéries lactiques (à l'exception des genres : *Leuconstoc*, *Oenococcus*, *Weissella* et certains membres du genre *Lactobacillus* empruntent la voie de la glycolyse et dégradent les hexoses en pyruvate qui sera réduit en acide lactique ; le produit unique de la fermentation. Dans les conditions défavorables telles la limitation du glucose, ces bactéries produisent également l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol et/ou CO₂ par la voie de fermentation des acides mixtes (**Mozzi et al., 2010**).

2.2. Bactéries hétéro-lactiques :

Ce groupe de bactéries lactique utilise des pentoses phosphate (ou 6-phosphogluconate) pour transformer le glucose en CO₂, éthanol ou de l'acétate en plus de l'acide lactique. (**Salminen et al., 2004**).

3. Caractéristiques :

Les bactéries lactiques présentent d'autres caractéristiques communes qui expliquent leur regroupement :

- Ce sont des bactéries gram positif, immobiles, jamais sporulées, catalase-négative, oxydase-négative, nitrate réductase négative.
- Leur capacité de biosynthèse est faible, sont poly auxotrophes pour divers acides aminés, des bases nucléiques, des vitamines et des acides gras mais aussi leur métabolisme fermentaire : incapable de synthétiser le noyau hème des porphyrines, elles sont dépourvues de cytochrome et en conséquence incapables de toutes respirations aérobie ou anaérobie.
- Ce sont des bactéries anaérobies facultatives : micro aérophiles, capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose. (Leveau et Bouix, 1993).

Il existe deux types de ferments lactiques : les mésophiles, composés de bactéries dont la température optimale de croissance est proche de 30°C et les thermophiles, pour lesquels la température optimale se situe entre 37 et 43°C. (Oteng Gyang, 1984).

3.1. Caractères morphologiques :

Groupe hétérogène, les bactéries lactiques sont représentées par plusieurs genres d'importance d'ailleurs différente. Leurs cellules sont soit des coques, soit des bacilles :

- Coques ou les Cocci : sont des petites sphères plus ou moins ovoïdes, de 0.5 à 1.5 µm de diamètre dont la division peut engendrer des paires, des tétrades, des chainettes ou des amas. C'est le cas de *Streptococcus*, mais aussi de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et de *Pediococcus*.

- Bacilles : sont des petits bâtonnets plus ou moins allongés de 0.5 à 2 μm de diamètre et de 1.5 à environ 10 μm de long, qui se présentent par paires ou en chainettes de longueur variable ; c'est le cas de *Lactobacillus* (Leveau et Bouix, 1993).

Ils se distinguent en plus par leur type fermentaire : homolactique ou hétéro lactique. A ces genres, a été ajouté le genre *Bafidobactetrium* (Leveau et Bouix, 1993).

3.2. Caractères physiologiques :

Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Seuls les cinq genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont communément propagés dans les salles à ferments des industries laitières. Le rôle principal des bactéries lactiques est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits fermentés. En effet, la production d'acide facilite la coagulation de protéines par la présure ainsi que la synérèse. L'abaissement de pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables. (Gilliland, 1985).

4. Classification des bactéries lactiques :

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des caractères phénotypiques : la morphologie, le type de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone (De Roissart et Luquet, 1994 ; Holzappel et al., 2001).

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen sur divers critères morphologiques et physiologiques (activité catalase et nitrite réductase, type de fermentation). (Stiles et Holzappel, 1997).

Cependant, les études basées sur la comparaison de séquences de l'ARN ribosomal 16s ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne

concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques. (Geves, 2002).

Par conséquent, les méthodes de typage moléculaire telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (PCR), ainsi que les Restriction Fragment Length polymorphism (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (Holzapfel et al., 2001).

Sur la base des données de séquençage de 16s et 23s de l'ADNr, les bactéries gram positif forment deux embranchements. Un embranchement de bactéries gram positif avec un pourcentage G+C inférieur à 50% (*Clostridium*) et un autre formé de bactéries ayant une teneur en G+C supérieure à 50% (*Actinomycètes*). (Holzapfel et al., 2001 ; Gevers, 2002).

Les bactéries lactiques typique ont une teneur en G+C inférieure à 50% alors que le genre *Bifidobactrium* qui, d'un point de vue physiologique, fait partie des bactéries lactiques, appartient à la branche des *Actinomycètes* qui comprend aussi *propionibacterium* et *Brevibacterium*. (Vandamme et al., 1996).

Il y a peu de corrélation entre la classification traditionnelle et la parenté phylogénétique des bactéries lactiques. Des genres morphologiquement distincts, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont phylogénétique entremêlés. (Scheleifer et Ludwig, 1995 ; Gevers, 2002).

5. Habitat :

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles ont pour habitat de nombreux milieux naturels. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples.

Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande et des végétaux (plantes et fruits). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelque espèce

colonisent le tube digestif et on peut les trouver aussi dans les cavités buccales, vaginales et dans les fèces. (Leveau et Bouix, 1993 ; Hassen et Frank, 2001).

6. *Lactobacillus* :

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs, parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes. Elles sont généralement immobiles à l'exception de quelques espèces qui possèdent des flagelles péritriches. Les souches sont acidophiles qui peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2.

La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais elles peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C jusqu'à 53°C. (Ababsa, 2012).

7. *Lactobacillus bulgaricus* :

7.1. Bactériologie :

Lactobacillus bulgaricus est un bacille gram positif, immobile, aspérulle, micro aérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chaînettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Embden Meyerhof. Il est incapable de fermenter les pentoses. *Lb bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt. Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le système le plus efficace pour éliminer le peroxyde d'hydrogène est l'utilisation d'une enzyme, la catalase, dont les bactéries lactiques sont déficientes. Ces dernières possèdent plutôt une peroxydase (pseudo catalase) qui est moins efficace que la

catalase. Comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont dites micros aérophiles. (Marty-teyssset et al, 2000).

7.2. Propriétés technologiques :

Les principales propriétés technologiques sont :

- Thermophile, homo fermentaire capable de produire 1.4 à 1.6 d'acide lactique.
- Fermente le glucose, le galactose, le lactose et le fructose.
- Responsable de la production d'acétaldéhyde (compose aromatique de yaourt par transformation de la thréonine).

7.2.1. Propriétés génétiques :

L'espèce *Lactobacillus bulgaricus* possède un génome de petite taille qui contient 2 Mpb et elle a un nombre de plasmide situé entre 0 et 4.

7.3. Production des bactériocines :

Les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites entre-autres, les bactériocines qui sont des métabolites aux propriétés antibactériennes. Il s'agit de peptides ayant la capacité d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes. Les souches de *Lb bulgaricus* produisent des bactériocines appelée la nisine (elle n'est pas utilisée dans les aliments acide). Les bactériocines issues de *Lb bulgaricus* sont considérées comme sécuritaire en raison de leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe).

7.4. Métabolisme des bactéries lactiques :

7.4.1. Métabolisme des sucres :

Les bactéries lactiques utilisent la fermentation lactique pour dégrader les glucides et synthétiser de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe deux voix principales de fermentation lactique :

L'homo fermentation regroupe la voie de la glycolyse, aussi connu sous le nom d'Embden Meyerhof, suivie de la conversion de deux molécules de pyruvate en deux molécules de lactate. Elle est surtout utilisée par les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et à certaines espèces de *Lactobacillus* comme *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb casei*, *Lb caucasicus*, *Lb lacti*, et *Lb plantarum* et de *Thermobacterium* comme *Thermobacterium yogharti*. Au cours de cette voie de fermentation, ces bactéries dégradent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le saccharose ou le lactose.

L'hétéro fermentation (**figure n°02**), communément appelée voie des pentoses, phosphate (transcétolases) se produit chez des espèces appartenant à *Lactobacillus*, telles que *Lactobacillus fermenté* et à *Leuconostoc*, telles que *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc pentosaceux*. Au cours de l'hétéro fermentation, les bactéries dégradent les hexoses avec formation quasi stœchiométrique d'une molécule d'acide lactique, d'une molécule de CO₂ et d'une molécule d'éthanol (**Kandler, 1983**).

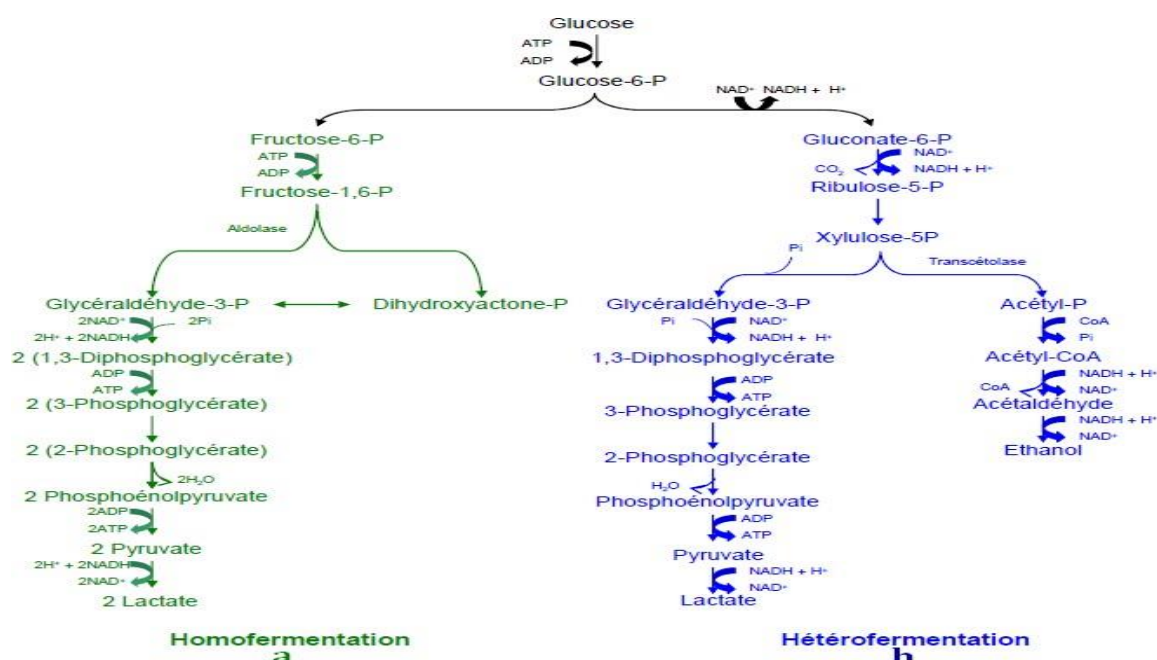


Figure 02. Principales voies fermentaires des hexoses chez les bactéries lactiques. (Makhloufi, 2012).

7.4.1.1. Activité protéolytique :

Le système protéolytique des bactéries lactiques est composé de protéases associées à la paroi cellulaire, qui catalysent l'hydrolyse de protéines en peptides contenant de 7 à 16 résidus aminés (**Kamaly et Marth, 1989**).

Ces peptides sont ensuite dégradés par des endopeptidases ou exopeptidases en unités transportables d'acides aminés et de petits peptides (**Lane et Fox, 1996 ; Lynch et al, 1997**).

Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure dans la formation de molécules aromatique (alcools, aldéhydes, acides organique, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (**Williams et al., 2001**).

7.4.1.2. Activité lipolytique :

L'activité lipolytique des bactéries lactiques est moins importante que leurs activités protéolytiques. Il paraît, au travers des publications scientifiques, que les connaissances sur l'activité lipolytique des bactéries lactiques soient encore fragmentaires. Néanmoins, les voies métaboliques liées à la lipolyse génèrent des acides gras libres et des précurseurs d'arômes qui entrent dans la saveur globale des produits alimentaires (**figure 03**). (**Bigret, 1994**).

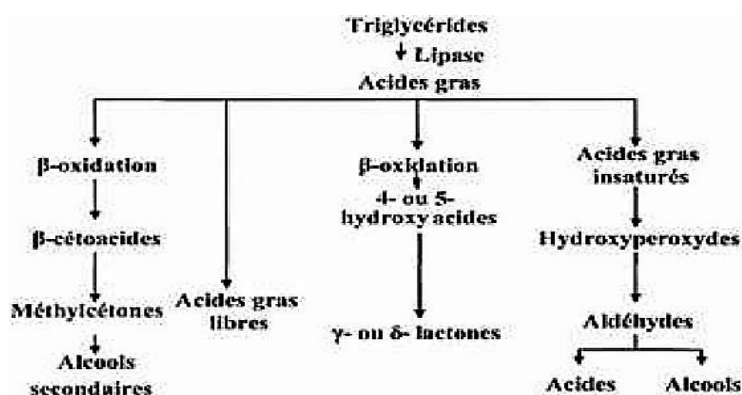


Figure 03. Principales voies de lipolyse chez les bactéries lactiques.

7.5. Métabolisme de citrate :

Malgré sa concentration relativement faible dans le lait (8-9 mM), le citrate est un constituant clef pour la formation du diacétyle, un composant volatil à l'arôme de beurre important dans les laits fermentés et les fromages frais. Environ 90% du citrate du lait est soluble et majoritairement perdu dans le lactosérum. (Amikunnas, 2006).

8. Rôles et intérêt des bactéries lactiques :

8.1. Domaine alimentaire :

8.1.1. Rôle sur la structure et la texture des laits fermentés :

Ce sont les laits fermentés, l'acidification provoque la formation d'un caillé plus ou moins ferme selon les bactéries lactiques présentes. Selon les produits, la texture recherchée est ferme (yaourt ferme) ou onctueuse (yaourt brassé). 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).

8.1.2. 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 lactiques, elles sont généralement thermorésistantes. (Boudjmaa, 2008).

8.1.3. Rôles sur les caractéristiques organoleptiques :

Lactobacillus bulgaricus par production en dehors de l'acide lactique, d'autres produits tels que le diacétyle et l'acétaldéhyde est responsable des saveurs caractéristiques des produits laitiers transformés (Boudjmaa, 2008).

8.2. Domaine de santé :

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du siècle, en **1907** par le russe **Metchnikoff**, selon lui les *Lactobacillus sp* pouvaient réduire la putréfaction intestinale en modifiant la flore intestinale. Le rôle des bactéries lactiques sur la santé était dans le cadre des probiotiques. Les bienfaits des bactéries lactiques sont de plus en plus étudiés, certains sont bien établis d'autres restent encore controversés :

- Améliorent la digestion de lactose.
- Traitement certaines infections ou diarrhées...etc. (**Metchnikoff, 1907**).

Partie 02 : 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 conduit à poser la question suivante : « est-ce que l'utilisation des extraits de plante comme adjuvant dans certains produit laitiers (tels les yaourts par exemple) peuvent avoir un effet sur la croissance des ferments lactiques tels que *Lactobacillus bulgaricus* qui présentent des intérêts variés (industriel et nutritionnel) ? ».

Pour cela, nous nous sommes proposé d'essayer de connaître le comportement *in vitro* des *Lactobacillus bulgaricus* (l'une des deux souches de levains lactiques) vis-à-vis des inhibiteurs de croissance tels que les polyphénols, les flavonoïdes et bien d'autres composés bioactifs contenues dans l'une des plantes cultivées depuis longtemps sous palmeraie à Ouargla-Algérie et très largement utilisé en médecine traditionnelle par la population à savoir la menthe poivrée (*Mentha piperita* L).

D'une façon générale les objectifs escomptés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de 2 points essentiels :

- Procéder à une extraction des principaux composés bioactifs de *Mentha piperita* L par usage de l'eau distillée stérile.
- Suivre les effets antimicrobiens de l'extrait aqueux de *Mentha piperita* L sur l'un des deux germes spécifiques du yaourt à savoir *Lactobacillus bulgaricus*,

en vue d'optimiser la manière dont il faut l'incorporer au cours du processus de fabrication d'un lait fermenté type yaourt étuvé.

2. Région de prélèvement et traitement préliminaires du matériel végétal

2.1. Situation géographique de la région de l'étude

La ville de Ouargla chef-lieu de la Wilaya de Ouargla est située au Sud-Est algérien au fond d'une cuvette synclinale qui est caractérisée par un remplissage sédimentaire près de l'oued Mya. Elle est à environ 800 km d'Alger. (**Rouvillois-Brigol, 1975**).

La région de Ouargla couvre une superficie de 99000 ha, elle est limitée : au nord par El-Haïra et Touggourt, au sud par Hassi Messaoud, à l'est par l'Erg oriental et à l'ouest par Ghardaïa.

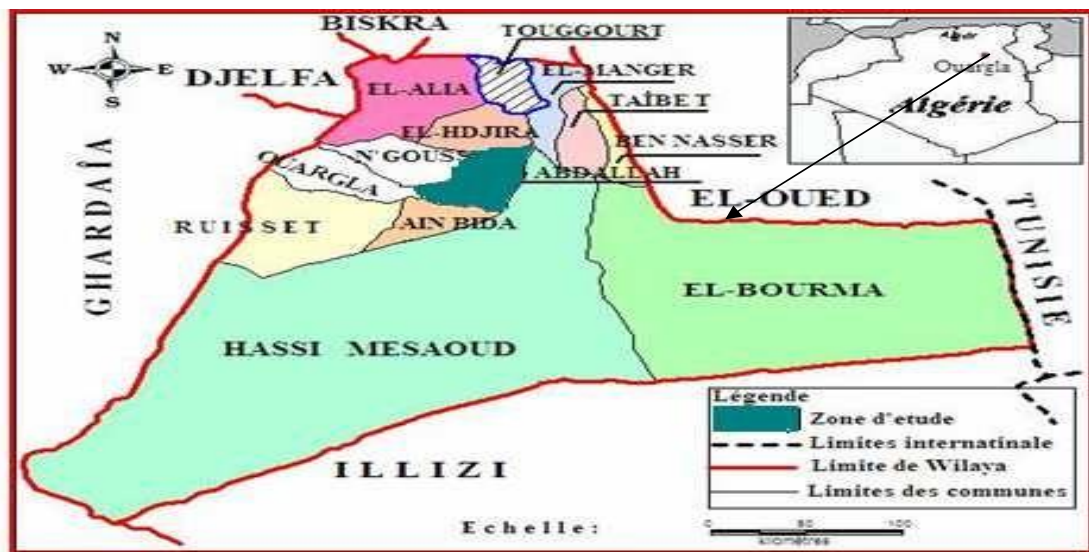


Figure 04. Situation géographique de la région d'étude

2.2. Climat :

La région de Ouargla est située en zone saharienne, son climat sec désertique possède une aridité bien exprimée par des précipitations faible et irrégulières et une sécheresse permanente.

2.2.1. Précipitations :

Les précipitations sont en effet très irrégulières. Le cumul annuel est de 36.6 mm/an. Le mois de Janvier est le mois le plus pluvieux (7.9 mm) ; alors que le mois de Juillet est considéré comme étant le plus sec (0.1 mm).

2.2.2. Température :

La température minimale du mois le plus froid (Janvier) est de 6°C, et la température moyenne du mois le plus chaud (Juillet) est 43.5°C.

2.2.3. Humidité moyenne :

L'humidité relative de l'air peut descendre jusqu'à 27.6% au mois de juin à cause des fortes évaporations ; alors que le maximum est de 62.37% en janvier.

2.3 Matériel végétal :

Un échantillon de 2 à 3 kg de menthe poivrée concernant uniquement 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).

La matière végétale a été ensuite étalée sur du papier aluminium, puis séchée à l'air ambiant. Les échantillons séchés ont été enfin broyés dans un broyeur à lame de cuisine puis mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) et à l'abri de l'humidité.

3. Extraction des composés bioactifs à différentes polarités :

Pour l'extraction des principaux composés bioactifs tels les polyphénols contenus dans la menthe poivrée (*Mentha piperita* L) on a opté pour l'utilisation d'une méthode rapportée par

(Sultana et al., 2009). Cette méthode d'extraction n'est qu'un procédé d'extraction discontinu solide-liquide par macération et qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante durant quelques temps et à extraire les constituants solubles par évaporation du solvant sous vide.

L'extraction des composés bioactifs a été réalisée par usage d'eau distillée stérile comme solvant d'extraction des principaux composés phénoliques de la plante objet de l'étude à savoir la menthe poivrée. Elle a été effectuée en triples essais sur des prises d'échantillon de matière végétale broyée de 10g chacune de broyat de matière végétale mélangé à 100 ml d'eau.

L'extraction par macération à froid de chaque mélange a été laissée ensuite se poursuivre pendant 6h à température ambiante sous agitation. La durée de l'extraction favorisera 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.

Les extraits à l'eau obtenus ont été chacun filtrés en utilisant un papier filtre Whatman n°3 ayant une porosité de 0.3µm et le filtrat a été ensuite concentré à 20 ml par évaporation sous vide à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif, ou rota vapeur en procédant comme suit :

1. Placer le macérât à évaporer dans le ballon d'évaporation ;
2. Mettre ensuite le ballon d'évaporation sous rotation ;
3. Ouvrir le robinet d'eau froide relié au réfrigérant ;
4. Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieure de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau ;
5. Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon d'évaporation contenant le macérât à évaporer dans le bain marie d'eau chaude ;
6. Procéder à l'évaporation ;
7. Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieure du dispositif ;

8. Enfin, couper l'eau du réfrigérant et de la trompe à eau Les extraits purs riches en composés biactifs récupérés ont été enfin dilués à l'eau distillée stérile à des taux variables a raison de 0, 20, 40, 60, 80, et 100%, respectivement.

4. Effets antimicrobiens de l'extrait aqueux de menthe poivrée :

4.1. Activation de l'inocula microbien :

L'étude concerne une souche pure de références et spécifique du yaourt à savoir *Lactobacillus bulgaricus*. L'espèce lactique a été tout d'abord activée avant son utilisation expérimentale.

Une prise de 0.25g de la souche lyophilisée conservée au froid à 4°C est au préalableensemencé dans 10ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37°C durant 3h. 0.1 ml de cette dernière solution constituant l'inoculum microbien a été pris pour êtreensemencée en surface d'une boîte de pétri contenant le milieu spécifique gélosé de croissance de l'espèce microbienne (MRS) (A défaut utiliser le milieu gélosé ou le milieu gélosé MH) puis le mélange a été incubé à 37°C pendant 24h.

4.2. Effet antimicrobien :

Quatre méthodes différentes ont été employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien de l'extrait aqueux des feuilles de *Mentha piperita* L., :

1. Méthode de contacte directe ;
2. Méthode des disques de diffusion sur gélose ;
3. Concentration minimale inhibitrice (CMI) ;
5. Concentration minimale bactéricide (CMB).

4.2.1. Méthode de contact direct :

Une colonie issue d'une culture jeune de l'espèce microbienne activée sur milieu solide gélose spécifique est prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile. Elle a été ensuiteensemencée dans un tube contenant 10ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 3h.

A partir de cette dernière solution constituant l'inoculum bactérien de l'espèce lactique étudiée *Lactobacillus bulgaricus*, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées allant à 10^{-5} . Des prélèvements de 01ml de la dernière dilution décimale ont été ensuite individuellement ajoutés à 09ml de chaque extrait de menthe dilué à l'eau distillée, respectivement à raison de 0, 20, 40, 60, 80, et 100%.

Les mélanges des solutions sont enfinensemencés en triple essais (03 boites de Petri) chacune en surface à raison de 0.1ml sur le milieu spécifique MRS de croissance spécifique de *Lactobacillus bulgaricus*. La lecture du nombre de colonies développé est effectuée après incubation des milieuxensemencés à 37°C pendant 24 heures (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

4.2.2. Méthode des disques par diffusion sur gélose :

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par l'extrait bioactif aqueux de la menthe poivrée (aromatogramme).

Les disques sont 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 sont stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclaves. Une colonie de chaque espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation estensemencée dans 10ml de bouillon nutritif ; ce mélange constituera l'inoculum bactérien.

Partie 2 : Méthodologie expérimentale

L'ensemencement des boîtes de Pétri contenant le milieu MRS est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé, il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution homogène. A raison de trois disques de papier filtre de 6mm de diamètre, préalablement stérilisés ont été ensuite déposés pendant 5 minutes dans chaque concentration d'extrait de la plante préparée à (0, 20, 40, 60, 80 et 100%), ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la gentamicine. Les disques imbibés dans chaque solution expérimentale ont été enfin déposés à la surface de chaque boîte gélosée ensemencée au germe lactique. La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Petri à 37°C pendant 24 et ceci par l'usage d'un pied à colis. (Guignar, 1998).

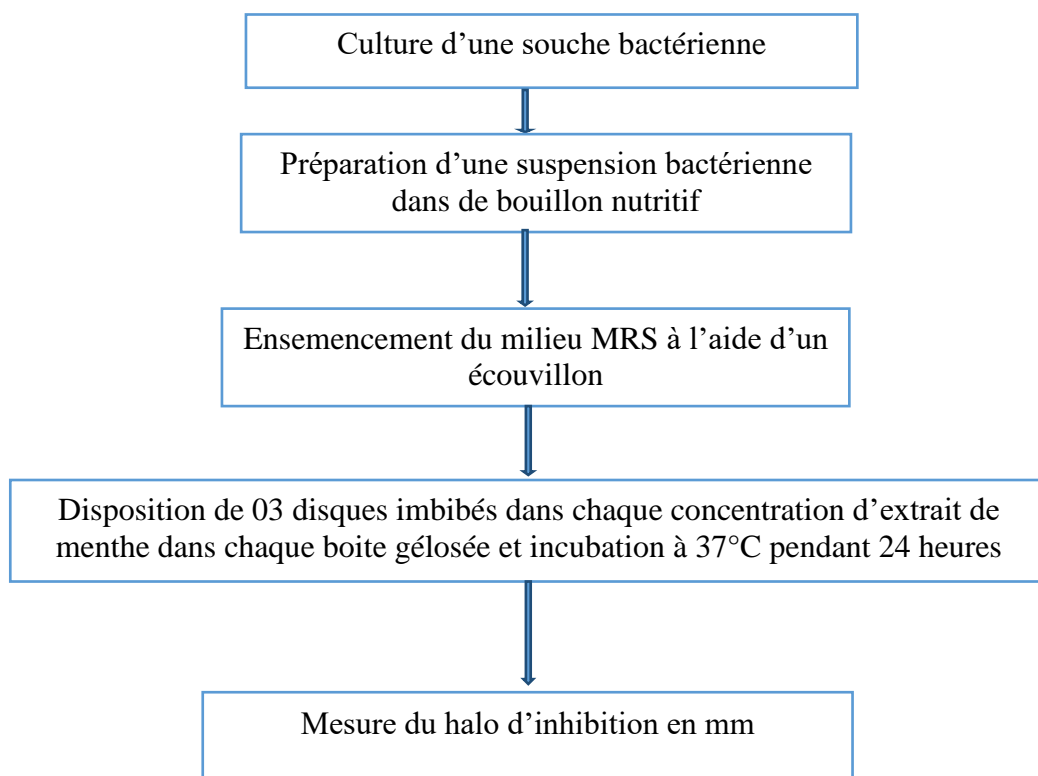


Figure 05. Méthode des disques par diffusion sur gélose.

4.2.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

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

Une colonie jeune de *Lactobacillus bulgaricus* a été prélevée à l'aide d'une anse à platine estensemencée dans 10ml de bouillon nutritif, puis incubée pendant 3h à 37°C en vue d'obtenir l'inoculum. Des prises de 0.2ml de chaque inoculum ont été introduites respectivement dans 2ml de l'extrait de menthe poivrée dilué au bouillon Mueller Hinton.

Les 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 18 à 24h.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice est 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 sera égale d_f ($d_i=d_f$).

Le taux de survie du microorganisme a été mesuré à spectrophotomètre réglé à 560nm comme suit :

$$s = \frac{d_f - d_i}{D_f - D_i} \times 100$$

S : taux de survie du microorganisme en %.

d_f-d_i : différence de densité optique dans la solution phénoliqueensemencée au germe étudié avant et après incubation à 37°C durant 18h.

D_f-D_i : différence de densité optique dans la solution d'eau distillée sans extraits de menthe (etensemencée au germe étudié) avant et après incubation à 37°C durant 18h.

4.2.4. 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^{-5} . Cette dilution représente 0.01% de survie du microorganisme. Elle estensemencée par strie de 5cm sur une gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24h. le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-5} est 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 24h. 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.

5. Traitement statistique :

Les résultats des données expérimentaux ont subi une analyse de la variance de la variance en randomisation totale et une comparaison des moyens deux à deux selon le test selon de Newman et Keuls en appliquant un logiciel de statistique Software le STAT BOX 6.4.

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Résultats :

1.1. Composés phénoliques et flavonoïdes :

Les composés phénoliques sont fortement représentés dans l'extrait aqueux 45.41 mgEAG/ml d'extrait et les feuilles (454.1 mgEAG/g MS) de *Mentha piperita* L. En revanche, de faibles teneurs en flavonoïdes ont été enregistrées ; 0.43 mgEQ/ml d'extrait vs 4.30 mgEQ/g MS, respectivement (**Tableau 5**).

Tableau 5. Teneurs en en principaux composés phénoliques et flavonoïdes dans l'extrait aqueux et dans les feuilles 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 ±

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 quercetine ; MS : Matière sèche.

1.2 Effet antimicrobien :

En fonction de la concentration d'extrait aqueux de *Mentha piperita* L. variable de 0, à 20, 40, 50, 80 et 100% la méthode de contact direct a montré une baisse significative ($p < 0.01$) de la croissance microbienne du germe *Lactobacillus bulgaricu* ; de $193 \cdot 10^5$, à $123 \cdot 10^5$, à $84 \cdot 10^5$, à $35 \cdot 10^5$, et à $3 \cdot 10^5$ UFC/ml, respectivement.

D'après la méthode des disques, les solutions d'extrait préparées à 40, 60, 80 et 100% d'extrait de menthe ont enregistré des zones d'inhibition vis-à-vis du germe étudié qui ont augmenté remarquablement ($p < 0.01$) de 6.66 à 28.33 mm. Néanmoins, l'extrait pur à

présenter un diamètre d'inhibition chez *Lactobacillus bulgaricus* très faible ($p < 0.01$) comparativement à la gentamicine ; avec un taux d'inhibition de l'ordre de 94.44%.

La concentration minimale inhibitrice chez l'espèce bactérienne lactique testée (*Lactobacillus bulgaricus*) a été obtenue à 40% d'extrait ; alors que la concentration minimale bactéricide à été noté à une concentration plus élevée d'extrait aqueux de *Mentha piperita* L., : de 60%.

Apparemment, l'extrait de la menthe poivrée semble exercer un effet inhibiteur de type bactéricide contre le germe spécifique du yaourt à savoir le Apparemment (**Tableau 6**).

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

Germe s	Mesures	Concentrations en extrait aqueux De <i>Mentha piperita</i> L (%)						Effet de l'extrait
		Témoin	20%	40%	60%	80%	100%	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Test de croissance (UFC/ml)	193 10 ⁵ a	123 10 ⁵ b	84 10 ⁵ c	35 10 ⁵ d	10 10 ⁵ d	3 10 ⁵ d	P<0 ,01
	Diamètre d'inhibition(mm)	30 ^a	6,66 ^e	7 ^e	11,33 ^d	22,33 ^c	28, 33 ^b	P<0 ,01
	Taux D'inhibition (%)	100 ^a	22,22 ^e	23,33 ^e	37,77 ^d	74 ,4 ^c	94,44 ^b	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 Keul

2. Discussion :

Depuis l'antiquité l'être humain s'est soigné avec des produits issus de la nature comme les plantes médicinales. Aujourd'hui il est face au problème de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, dont l'efficacité semble décroître de jour en jour et d'additifs alimentaires synthétiques à effets néfastes sur la santé. La recherche de nouvelles molécules naturelles des plantes médicinales riches en composés bioactifs ayant plusieurs vertus (antimicrobiens, antioxydant...etc.) peut constituer une alternative intéressante susceptible d'être exploitée dans les domaines de la santé et des industries agroalimentaires.

Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire des plantes. Environ 10.000 composés ont été caractérisés (**Guiganrd, 2000**). Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale. A ce titre, l'homme peut consommer jusqu'à 10g de polyphénols par jour.

De très nombreux composés phénoliques présentent des activités antimicrobiennes. (**Bouarab-Chibane et al., 2018**). Les principales familles concernées sont les phénols simples, les acides phénoliques et les flavonoïdes. D'autres familles, telles que les tannins (condensés et hydrolysables) et les néolignans, présentent également des activités antimicrobiennes mais plus anecdotiques. (**Daglia, 2012**).

Il est relativement difficile de comparer toutes les études réalisées sur l'activité antimicrobienne des composé phénoliques car elles sont souvent réalisées sur des microorganismes différents : bactéries, virus, moisissures et pour les bactéries, sur des

espèces et souches différentes. De plus, les techniques utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne peuvent être différentes.

Les mécanismes antimicrobiens des composés phénoliques sont encore loin d'être entièrement compris. Il existe une disparité entre les différentes classes de composés : les phénols simples ont des mécanismes d'action relativement bien connus, au contraire des acides phénoliques et des flavonoïdes. La complexité des modes d'action de certaines molécules vient du fait qu'elles peuvent avoir plusieurs cibles cellulaires et que celles-ci ne sont pas indépendantes : ainsi, l'atteinte d'une cible peut avoir des conséquences sur d'autres fonctions physiologiques (**Burt, 2004 ; Cushnie et Lamb, 2005**).

Certains composés phénoliques, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, peuvent traverser la membrane bactérienne et atteindre le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, plusieurs phénomènes peuvent se produire impliquant tout d'abord une acidification du cytoplasme ou les acides phénoliques pourraient agir comme des acides faibles. Lorsque leur forme indissociée traverse la membrane et atteint le cytoplasme bactérien, elle se dissocie en libérant un proton. (**Lambert et Straford, 1999 ; Naitali et Dubois-Brissonet, 2017**). Concernant les flavonoïdes, deux principaux mécanismes d'action antimicrobiens ont été rapportés en plus de la perturbation de l'intégrité membranaire : l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques et l'inhibition du métabolisme énergétique. Cette acidification du cytoplasme entraîne une altération des fonctions enzymatiques et/ou des molécules structurelles ainsi qu'une perte d'énergie nécessaire à l'efflux des protons. (**Cushnie et Lamb, 2005 ; Cushnie et Lamb, 2011**).

Dans un contexte d'amélioration continue de la qualité des produits alimentaire dans toutes ses composantes (organoleptique, nutritionnelle et sanitaire), l'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'activité antimicrobienne des composés phénoliques de la plante *Mentha piperita* L. Ces composés ont été choisis de par leurs propriétés multiples, en vue de suivre l'effet particulier de leur pouvoir antimicrobien vis-à-vis de *Lactobacillus bulgaricus*, considérée comme étant l'une des bactéries lactiques spécifique du yaourt (**Pernin, 2018**).

L'extrait aqueux de *Mentha x piperita* L., riche en composés phénoliques a montré un effet antibactérien de type bactériostatique vis-à-vis du microorganisme testé (**Oliver, 2007**). Il semble, toutefois possible de l'incorporer dans le yaourt à un taux de moins de 20% ou la prolifération du germe étudié peut tout de même être réduite d'environ 22%.

La menthe poivrée semble contenir l'essentiel des composés bioactifs capables de freiner la croissance des microorganismes pathogènes pouvant altérer les aliments transformés au cours de la conservation. L'ajout d'extrait aqueux de menthe poivrée à de faibles doses dans le yaourt semble préserver à 80% l'intégrité de la souche *Lactobacillus bulgaricus* recherchée dans le yaourt. Sa valorisation comme additif naturel dans l'intention d'améliorer la conservation des laits fermentés peut contribuer aussi à la conception d'un nouveau produit alicament ayant toutes les vertus d'un aliment fonctionnel.

Conclusion générale

Conclusion :

La thérapeutique des pathologies humaines se base principalement sur l'usage des médicaments de synthèse. La prescription, à grande échelle et parfois inappropriée, de ces agents a entraîné un certain nombre d'effets indésirables ou encore la sélection des souches résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voie et surtout vers les végétaux.

Produites comme métabolites secondaires par les plantes médicinales, les composés actifs sont toujours utilisés comme agent antimicrobiens en médecine alternative, en industrie agroalimentaire, en cosmétique...etc.

Eu égard de l'importance des composés actifs de la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.) dans ces divers domaines d'intérêt, il nous a semblé nécessaire de leur consacrer cette étude pour vérifier les activités antimicrobiennes des principaux composés phénoliques de la plante vis-à-vis d'un germe lactique très utilisé en industrie laitier dont.

La menthe poivrée objet de l'étude (*Mentha piperita* L) s'est avérée très riche en composé phénolique (45.41 mgEAG/ml); alors qu'elle ne compte que de faibles teneurs en flavonoïdes (0.43 mgEQ/ml). Par ailleurs, l'extrait aqueux de la plante semble aussi contenir de fortes quantités de polyphénols totaux (45.41 mgEAG/ml) ; mais plutôt pauvre en flavonoïdes (0.43 mgEQ/ml).

Les composés phénoliques de l'extrait aqueux de la menthe ont montré un pouvoir inhibiteur important sur la souche bactérienne *Lactobacillus bulgaricus*.

En fonction de la concentration d'extrait aqueux de *Mentha piperita* L, variable de 0 à 100% une augmentation remarquable ($p < 0.01$) de 6.66 à 28.33 mm des zones d'inhibitions et

une baisse significative ($p < 0.01$) de $193 \cdot 10^5$ à $3 \cdot 10^5$ UFC/ml de la croissance microbienne du germe étudié *Lactobacillus bulgaricus* ont été respectivement constatées. Néanmoins, la gentamicine a présenté le plus fort pouvoir antimicrobien ; 30 mm, en moyen.

La Concentration Minimale Inhibitrice de la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* a été observée avec la solution préparée à 40% de *Mentha piperita* L ; alors que la Concentration Minimale Bactéricide a été enregistrée à 60% d'extrait de la plante.

Les substances phénoliques de la menthe ont dévoilé ainsi une action de type bactéricide chez le germe lactique étudié ; *Lactobacillus bulgaricus*.

En perspective, il serait très intéressant de procéder à l'identification par HPLC couplée à la spectroscopie de masse du profil en composés phénoliques totaux de la menthe afin de déterminer avec précision les composés bioactifs intervenant efficacement dans l'inhibition du germe lactique étudié (*Lactobacillus bulgaricus*) ce qui permettra sans doute de les exclure lors de l'ajout d'extrait de la plante comme additif aux produits fermentés comme le yaourt sans autant affecter de leurs qualité rhéologique. D'autres travaux peuvent aussi être menés, sur les germes spécifiques du yaourt tout en utilisant d'autres plantes médicinales et divers autres solvants organiques (éthanol, acétone, méthanol...etc.) lors de l'extraction des composés bioactifs constitutifs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

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

ANONYME. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition, 28.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R (2005). Caractérisation Phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines Locales « Arabia et Kabyle ». *Sci. Technol*, 23 : 30-37.

Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles actives : La flore mauricienne une source

Baliarda, A. (2003). Evaluation de la Réponse au stress chez les bactéries Lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *tetragenococcus* approches physiques et génétiques. Thèse de doctorat, université Bordeaux, 394p

Bourgeois, C. M. and 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.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Callery, E. (1998). *Le grand livre des herbes : Le guide pratique de la culture, du séchage et des vertus de plus de 50 herbes* (1998 ed.). Cologne : Könemann.

Chevallier, A. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales* (2001 ed.). Paris : Larousse.

Chraibi, M., Fikri-Benbrahim, K., Amrani, M., Farah, A., Bari, A., & Ouaritini, Z. B. (2018). Etude Ethnobotanique Sur L'utilisation De *Mentha Pulegium*, *Mentha Piperita* Et

Pelargonium Graveolens Au Nord Du Maroc (Taounate) Et Évaluation De Leur Pouvoir Antimicrobien. *European Scientific Journal, ESJ, 14(24)*, 113. doi:10.19044/esj.2018.v14n24p113

Crozier A., Clifford M.N. & Ashihara H., 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Ed. Blackwell Publishing Ltd, UK.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd. d'approvisionnement potentielle. Université de Maurice. AMAS, Food and agricultural

Denis, F., E. Bingen, C. Martin, M.C. Ploy and R. Quentin, 2011. Bacteriologie Medicale. 2ndEdn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages 640.

Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540 : 1–18.

Etant donné que M. x p. est un groupe hybridogène Jacquín-Dubreuil A et Aymonin GG précisent que l'on doit préférentiellement parler de nothomorphes (nm), les trois nm. Majeurs du groupe étant : *M. x piperita* nm. *Piperita* (M. noire), nm. *Officinalis* (M. blanche), nm. *citrata* (M. citronnée). Chaque nm. Est subdivisé en races et cultivars ! (la revue Phytothérapie du pharmacien, sup. au n° 10, 1989 ;02-03).

Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar *Cinnamosma fragrans*, alternative aux antibiotiques en crevetticulture (Unpublished master's thesis). Thesis / Dissertation ETD. (2010).

Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobiennes

extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.

doi:10.1007/s10298-015-0944-4

Gilliland S.E., 1985. Bacterial starter cultures for foods crc press, Boca Raton, Florida.

Gilly G, Garnero J, Racine P. Menthes poivrées. Composition chimique, analyse

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.

Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96 : 67– 202

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.

Lamaison JL, Carnat AP, Carnat A. Différenciation des menthes poivrées, *Mentha x piperita* L. type Mitcham et type Hongrie, cultivées en Auvergne. *Plantes Méd. Pytothér.*

Leong, LP., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*, 76 : 69-75.

Leveau J-Y. et Bouix M., 1993. Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel.Sciences et Techniques Agro-Alimentaire. Tec et Doc Lavoisier, Paris, France.Pp. 170-330.

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

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

- Macheix J.J., Fleuriet A. & Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechnologiques et universitaires romandes, Collection Biologie, Lausanne. pp : 4-5, 192.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruits phenolic acids.CRC Press Boca Raton Florida 1990. 3 :105-110.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839
- Moroh, J.L.A., C. Bahi, K. Dje, Y.G. Loukou and F. Guede-guina, 2008.** Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides*(Baker) milne-redhe (rubiaceae) acetatic extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. Bulletin Societe Royale des Sciences Liege, 77 : 44-61.
- Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G.M. (2010).** Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. Blackwell publishing. Singapore. p 3-73.
- Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978).** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.
- Nijveldt, R. J., Nood, E., Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Norren, K., Leeuwen, P. (2001).** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr*, 74: 418–425.
- Orla jensen S. (1919).** The lactic acid bacteria in classification and physiology in lactic acid bacteria, (Teuber M.). In (Ayad, 2002).
- Oteng-Gyang K., 1984.** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Ed.Tec et Doc (Lavoisier) Paris.260p.research council, Réduit, Mauritius, p83.

Pasdeloup-Grenez, E., & Sahpaz, S. (n.d.). *Phytothérapie: Exemples de pathologies courantes à l'officine: Fatigue, insomnie, stress, constipation, rhume, douleur et inflammation* (Unpublished master's thesis). Thèse d'exercice : Pharmacie : Lille.

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

Rombi, M., Robert, D., Guedon, D., Rosier-Sala, C., & Renzacci, E. (2015). *Le dictionnaire des plantes médicinales* (2015 ed.). Monaco : Éd. Alpen.

ROUVILLOIS-BRIGOL. M ; 1975-Le pays de Ouargla (Sahara Algérien) variation et organisation d'un espace rural en milieu désertique. Pub départ. Géog. Paris, Sorbone 316p.

Salminen, S., wright, A, Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. Marcel Dekker. Inc., U.S.A.

Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 :113-122.