

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

## MEMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

Mme. BENZIANE Abir Chahrazed & Mlle. BEZIDANE Karima

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

Spécialité : **Microbiologie Fondamentale**

THÈME

**Effet de l'extrait hydro- méthanolique de *Mentha piperita*.L  
sur le germe *Lactobacillus bulgaricus* caractéristiques du yaourt.**

DEVANT LE JURY :

<b>Président :</b>	M. BEKADA	Professeur.	C.U. Tisemsilt
<b>Encadreur :</b>	M.AIT SAADA. D	M.C.A.	U. Mostaganem
<b>Examineur :</b>	M <sup>me</sup> . AIT CHABANE. O	M.C.B.	U. Mostaganem
<b>Invitée :</b>	M <sup>me</sup> . GUEMIDI. C	Doctorante	U. Mostaganem.

*Thème réalisé au laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition- Université de Mostaganem*

**Année Universitaire : 2019/2020**

# Remerciements

*Nous tenons à remercier « Dieu » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*A cet effet, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur Mr AIT Saada. D Maître de Conférences classe A pour les consignes et la grande volonté qu'il n'a pas cessé de nous témoigner, pendant tout notre travail.*

*Nous tenons à remercier les membres de jury en l'occurrence M. BEKADA A.M.A, Professeur à l'université de Tissemsilt d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent à*

*Mme AIT CHABANE.O. MCB à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner cette étude et d'apporter ses appréciations sans doute très enrichissantes.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent enfin à Mme GUEMIDI Chafika pour sa disponibilité, générosité, conseils précieux et pour toutes les orientations qui nous a apporté durant la réalisation de ce modeste projet de fin d'études.*

Merci vivement.

# Dédicaces

Je dédié ce lapidaire travail à :

- ❖ Ma chère mère Pour tout ce que tu as fait comme efforts avec moi dès mon jeune âge pour tant de Sacrifices consentis.
  - ❖ A mon très cher père que dieu vous garde.
- ❖ Nos belles familles ainsi que toute la famille BENZIANE et BENZIDANE
- ❖ Une spéciale dédicace à une personne qui a été très paternaliste avec nous : MR AIT SAADA Djamel. Trouvez dans ce modeste travail nos sincères gratitude et reconnaissance. Ce travail est le votre.

## Résumé

L'étude expérimentale est consacrée à l'évaluation des effets antimicrobiens des poly phénols de l'extrait hydro-méthanolique de *Mentha piperita* L sur la croissance d'un germe spécifique du yaourt à savoir : *Lactobacillus bulgaricus*. Les composés phénoliques de *Mentha piperita* L récoltée dans la wilaya de Mostaganem ont été extraits par macération de la plante dans du méthanol aqueux. L'extrait pur récupéré après évaporation a été concentré à l'eau distillée à 0, 20, 40, 60, 80 et 100% , respectivement. Les mesures et contrôles réalisées en triples essais ont concerné : dosage des poly phénols totaux, dosage des flavonoïdes, tests de croissance, test de diffusion sur disque, concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB).

L'extrait hydrométhanolique de *Mentha x piperita* L., s'avère très riche en Poly-phénols totaux (39.48 mgEAG/ml d'extrait) et relativement pauvre en Flavonoïdes (0.47 mgEQ/ml d'extrait).

Il semble exercer à de fortes concentrations de 60, 80 et 100% un effet inhibiteur de type bactéricide vis-à-vis de la croissance du germe lactique *Lactobacillus bulgaricus*.

Cependant, à moins de 40% l'extrait n'a engendré aucun effet néfaste sur la prolifération du germe étudié.

**Mots clés :** *Mentha piperita* L , antimicrobien, extrait, poly-phénols, hydro-methanolique, *Lactobacillus bulgaricus*

## Abstract

The experimental study is devoted to the evaluation of the antimicrobial effects of the polyphenols of the hydro-methanolic extract of *Mentha piperita L* on the growth of a specific germ of yoghurt, namely: *Lactobacillus bulgaricus*. The phenolic compounds of *Mentha piperita L* collected in the wilaya of Mostaganem were extracted by maceration of the plant in aqueous methanol. The pure extract recovered after evaporation was concentrated in distilled water to 0, 20, 40, 60, 80 and 100%, respectively. The measurements and controls carried out in triple tests concerned: dosage of total polyphenols, dosage of flavonoids, growth tests, diffusion test on disc, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CMB).

The hydromethanolic extract of *Mentha x piperita L* is found to be very rich in total poly-phenols (39.48 mgEAG / ml of extract) and relatively poor in Flavonoids (0.47 mgEQ / ml of extract).

It seems to exert at high concentrations of 60, 80 and 100% an inhibitory effect of the bactericidal type vis-à-vis the growth of the lactic acid germ *Lactobacillus bulgaricus*.

However, at less than 40% the extract had no detrimental effect on the proliferation of the germ studied.

**Key words:** *Mentha piperita L*, antimicrobial, extract, poly-phenols, hydro-methanolic, *Lactobacillus bulgaricus*

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
1	Principaux défauts rencontrés dans la fabrication des yaourts.	11
2	Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone.	19
3	Activités biologiques des composés phénoliques.	21
4	Teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait hydro-éthanolique et de la matière sèche de <i>Mentha piperita</i> . L	42
5	Effet antimicrobiens de l'extrait hydro-métanolique de <i>Menthe piperita</i> .L sur le germe <i>Lactobacillus bulgaricus</i> caractéristique du yaourt	43

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	Aspect microscopique des bactéries lactiques du yaourt.	3
<b>2</b>	Métabolisme complémentaire de <i>Streptococcus thermophilus</i> et de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dans le lait.	6
<b>3</b>	Diagramme des principales étapes de fabrication du yaourt.	7
<b>4</b>	Effet du traitement thermique sur la microstructure du yaourt	13
<b>5</b>	Structure de base des flavonoïdes.	21
<b>6</b>	Structure de base des anthocyanes	21
<b>8</b>	Etape d'extraction des composés phénoliques de <i>Mentha pipérита</i> L.	30
<b>9</b>	Préparation des différentes solutions expérimentales.	31
<b>10</b>	Activation de bactérie lactique <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	33
<b>11</b>	Méthode de contact direct.	35
<b>12</b>	Méthode des disques par diffusion sur gélose.	37
<b>13</b>	Détermination de la CMI.	31
<b>14</b>	Détermination de la CMB. (Moroh et al., 2008).	40

# Table des matières

## Introduction

## Partie 1 : Etudes bibliographique.

### Chapitre I : Présentation du yaourt

1. Définition-----	01
2 . Historique -----	01
3. Classification des différents types de yaourt -----	02
3-1. Selon la texture -----	02
3-2-. Selon le goût -----	02
4. Bactéries caractéristiques du yaourt -----	02
4-1. Caractéristiques générales des bactéries du yaourt -----	02
4-1-1. <i>Streptococcus thermophilus</i> -----	02
4-1-2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> -----	03
5. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt-----	03
5-1. Production d'acide lactique -----	03
5-2. Activité protéolytique -----	04
5-3. Activité aromatique -----	04
5-4. Activité texturante -----	05
6. Comportement associatif des deux souches -----	05
7 . Technologie du yaourt -----	06
7-1. Standardisation du mélange -----	06
7-2. Traitement thermique -----	07
7-3. Ensemencement -----	08
7-4. Réchauffage -----	08
7-5. Etuvage/ brassage -----	08

7-5-1. Phase d'incubation (étuvage)-----	08
7-5-2. Brassage -----	09
7-6. Conservation des yaourts -----	09
8. Qualités du yaourt-----	10
8-1. Aspects physico-chimiques -----	10
8-2. Aspects hygiénique -----	10
8-3. Défauts et altérations du produit-----	10
8-4. Qualité organoleptique-----	10
8-4-1. Gélification acide -----	10
8-4-2. Comportement rhéologique-----	13
8-4-3. Propriétés et analyses sensorielles -----	14
8-4-3-1. Propriétés organoleptiques -----	14
8-4-3-2. Analyse descriptive quantitative-----	15
8-4-3-2-1. Sélection du jury -----	15
8-4-3-2-2. Choix des descripteurs -----	15
8-4-3-2-3. Echelle de notation -----	16
8-4-3-2-4. Entraînement des sujets et le contrôle des performances-----	16
8-4-3-2-5. Organisation des séances-----	16

## **Chapitre II : Les Polyphénols.**

1. Généralités biochimiques -----	18
2. Localisation et rôle dans les plantes -----	18
3. Classification des composés phénoliques-----	19
3.1. Composés phénoliques largement ré pondus -----	19
3.1.1. Flavonoïdes -----	19
3.1.2. Anthocyanes -----	20

3.1.3. Flavones et flavonoles-----	20
4. Intérêts des composés phénoliques -----	21
4-1. Rôle nutritionnel et thérapeutique-----	21
4.2. Rôle physiologique -----	22
4.3 Rôle technologique -----	22
5. Mode d'action des polyphénols -----	22

### **Chapitre III : Généralité sur les espèces de la Menthe poivrée .**

1. Introduction -----	25
2. Phyto-aromathérapie -----	25
3. La menthe poivrée -----	26
3.1. Classification -----	26
3.2. Composition: -----	26
4. Propriétés-----	26
4.1. Activité anti-oxydante-----	26
4.2. Activité antimicrobienne-----	26
4.3. Activité antifongique -----	27
4.4. Toxicologie -----	27

### **Partie 2 : Méthodologie expérimentale**

1. Objectifs -----	29
2. Région de prélèvement et traitements préliminaires du matériel végétal. -----	29
3. Extraction des composés bioactifs -----	29
4. Préparation des différentes solutions expérimentales -----	29
5. Dosage des polyphénols totaux -----	31
6. Dosage des flavonoïdes -----	31

7. Etudes des effets antimicrobiens de l'extrait de <i>Mentha pipéríta</i> : -----	32
7.1 Activation des inocula microbiens :-----	32
5-2. Méthode de contact direct -----	33
5-3. Méthode des disques par diffusion sur gélose -----	34
5-4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) -----	34
5-5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	37
6. Traitement statistique.....	40

### **Partie 03 :résultat et discussion**

1-Résultats -----	42
1.1. Composés phénoliques et flavonoïdes -----	42
1.2 Effet antimicrobien -----	42
2- Discussion -----	44
Conclusion -----	47

## Introduction

La menthe est, avant tout, une plante bienfaitrice ayant un pouvoir positif sur la santé. On prête d'ailleurs à cette plante d'innombrables vertus antibactériennes, antidouleur, anti-inflammatoire ... etc., qui ont été vérifiés scientifiquement. Ces effets sont dus à la présence de certains composés bioactifs tels que l'eugénol, l'acide caféique et l'acide rosmarinique (**Arumugam et al., 2009**).

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

Ces effets antibactériens nous a conduit à poser la question suivante : « Est ce que l'utilisation des extraits de menthe comme adjuvant dans les produits laitiers (production de yaourt par exemple) peuvent avoir un effet sur la croissance des ferments lactiques tels, que les *Lactobacillus bulgaricus* qui présentent des intérêts variés (industriel et nutritionnel) » ?

Pour cela, nous nous sommes proposé de connaître le comportement in vitro des souches de levains lactiques *Lactobacillus bulgaricus* vis-à-vis des inhibiteurs de croissance tels les polyphénols totaux contenus dans l'extrait hydro-méthanolique de *Mentha piperita* L.

L'effet antimicrobien de l'extrait hydro-méthanolique de *Mentha piperita* L riche en composés phénoliques à été étudié principalement par la méthode de contact direct, la méthode de diffusion sur disques, la détermination de la concentration minimale inhibitrice et la détermination de la concentration minimale bactéricide.

Le manuscrit est scindé en trois parties :

- Une première partie bibliographique relatant l'essentiel des connaissances sur le yaourt, le germe *Lactobacillus bulgaricus* et *Mentha piperita* L (menthe poivrée).
- Une deuxième partie, retraçant le protocole expérimental et les méthodes utilisées dans cette étude.

- La dernière partie a été consacrée à la discussion des résultats obtenus et les différentes perspectives de recherche développement à entreprendre dans un future proche.

# **Partie 1:Etude bibliographique**

# **Chapitre I : Présentation du yaourt**

## 1. Définition :

D'après le Codex Alimentaire, le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* sous-espèce *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) et de *Streptococcus salivarius*, sous-espèce *thermophilus* (*St. thermophilus*) à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) (FAO, 1975), avec ou sans addition de substances (lait en poudre, poudre de lait écrémé, les protéines lactosériques concentrées ou non, la caséine alimentaire ...etc.). Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants.

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. Certains pays néanmoins admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation, le produit ne contienne plus de bactéries vivantes. Cette pratique n'est toutefois pas recommandable, car elle modifie les propriétés

## 2. Historique :

Le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) originaire d'Asie, vient de « yoghurmark » mot turc signifiant « épaissir » (Tamime et Deeth, 1980). Dans le sillage des découvertes de Louis Pasteur sur la fermentation lactique, de nombreux chercheurs s'intéressent aux micro-organismes présents dans le lait. En 1902, Ris et Khoury, deux médecins français, isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien.

Metchnikoff (1845-1916) isole ensuite la bactérie spécifique du yaourt « le bacille bulgare », analyse l'action acidifiante du lait caillé et suggère une méthode de production sûre et régulière (Rousseau, 2005).

De nombreux autres produits sont arrivés par la suite sur le marché : laits fermentés probiotiques, laits fermentés de longue conservation (pasteurisés, UHT, lyophilisés ou séchés) et produits « plaisirs » (à boire, pétillants ou glacés). Traditionnellement, c'est le yaourt dit « nature » et ferme qui constituait l'essentiel des productions de laits fermentés. Dans les années 1960-1970, sont apparus les produits sucrés puis aromatisés et aux fruits. Actuellement, ils sont majoritaires sur le marché.

L'apparition du yaourt brassé a constitué une autre étape importante de la commercialisation des laits fermentés. En outre, le développement commercial des produits probiotiques est important et correspond à une demande du consommateur (Brule, 2003).

Les bactéries dans le produit fini doivent être vivantes et présentes en abondance. Le yoghurt ou le yaourt est un lait fermenté obtenu par la multiplication dans le lait de deux bactéries lactiques spécifiques associées : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Ces bactéries lactiques sont cultivées sur du lait préalablement pasteurisé, dans le but d'éliminer la plus grande partie ou la totalité de la flore microbienne préexistante. Après la fermentation, le yaourt est refroidi à

une température comprise entre 1 et 10°C, à l'exclusion de tout autre traitement thermique, il est alors prêt à être consommé»

(Luquet, 1990).

### 3. Classification des différents types de yaourts

#### 3-1. Selon la texture :

Selon la texture il est distingué trois types de yaourts :

**-Yaourts fermes:** Ce sont les yaourts coagulés en pots, selon (Veisseyre, 1997) généralement des yaourt nature ou aromatisés, dont la fermentation s'opère après la mise en pot à une température comprise entre 42 et 44°C dans le cas des yaourt sucre, aromatisés, aux fruits, à la confiture, etc.....l'apport des additifs se fait avant ou après le remplissage des pots.(Keddar et Koubich, 2009).

**-Yaourts brassés :** Ce sont les yaourts coagulés en cuve et brassés avant la mise en pot.

**-Yaourts à boire :** C'est des yaourts dont la texture est liquide.

#### 3-2. Selon le goût :

Selon le goût il est retrouvé trois types de yaourts :

**-Yaourts sucrés :** C'est des yaourts additionnés de saccharose à un taux variable de %.

**-Yaourts aux fruits :** C'est des yaourts qui peuvent subir une addition inférieure à 30% de miel ou de confiture de fruit.

**-Yaourts aromatisés :** Les produits contiennent des arômes naturels renforcés par un produit de synthèse.(Keddar et Koubich, 2009).

### 4. Bactéries caractéristiques du yaourt :

#### 4-1. Caractéristiques générales des bactéries du yaourt :

##### 4-1-1. *Streptococcus thermophilus* :

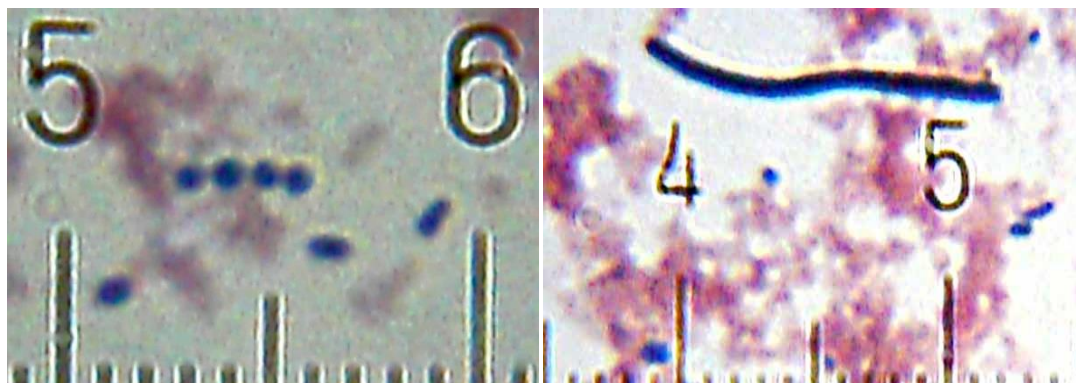
*St. thermophilus* est une bactérie cocci Gram positive, aéro-anaérobie facultative, non mobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages (Dellaglio et al., 1993 ; Roussel et al., 1994). C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques. Elle est aussi résistante au chauffage à 60°C pendant 30 minutes (Dellaglio et al., 1994).

Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposées en chaînes de longueurs variables ou par paires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C. Son métabolisme est du type homo-fermentaire (**Lamoureux, 2000**).

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique et en plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés et augmente aussi la viscosité du lait par production de polysaccharides (composés de galactose, glucose, ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et de marmose) (**Bergamaier, 2002**).

#### 4-1-2. *Lactobacillus bulgaricus* :

*Lb. Bulgaricus* est un bacille Gram positif, immobile, asporulé, microaérophile. 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'Emden 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 (**Marty-Teyssset et al., 2000**). Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 d'hydrogène, elles sont dites micro-aérophiles (**Doleyres, 2003**).



**Figure 1.** Aspect microscopique des bactéries lactiques du yaourt.

## 5. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt

### 5-1. Production d'acide lactique :

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (**Schmidt et al., 1994**).

Le métabolisme est du type homo-fermentaire (production exclusif de l'acide lactique). L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic ( $1^{\circ}\text{D} = 0,1 \text{ g/l}$  d'acide lactique). Elle se situe entre 100 et 130 °D (**Loones, 1994**).

L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit : - Il aide à déstabiliser les micelles de caséines, ce qui conduit à la formation du gel, - Il donne au yaourt son goût distinct et caractéristique, comme il contribue à la saveur et l'aromatisation du yaourt (**Tamime et Robinson, 1999, Singh et al., 2006**), - Intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (**Leory et al., 2002**).

### **5-2. Activité protéolytique :**

Pour satisfaire leurs besoins en acides aminés, les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséine et de protéines sériques ; leur système protéolytique est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases.

*Lb. bulgaricus* possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire. Cette activité protéasique permet d'hydrolyser la caséine en polypeptide.

*St. thermophilus* est considérée comme ayant une faible activité endopeptidasique. Elle dégrade les polypeptides par son activité exopeptidasique en acides aminés libres.

### **5-3. Activité aromatique :**

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés dans une fermentation de type hétéro-fermentaire. Parmi ceux-ci, l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde, qui provient en grande partie de la thréonine, joue un rôle essentiel dans ces caractéristiques organoleptiques recherchées. La concentration optimale de ce métabolite est estimée à environ 10 ppm. Sa production, due principalement au lactobacille, est augmentée lorsque ce dernier est en association avec le streptocoque qui en élabore de faibles quantités.

L'acétaldéhyde peut provenir du pyruvate, soit par action du pyruvate décarboxylase ou par action du pyruvate déshydrogénase (appelée aussi pyruvate formate lyase). Il peut aussi résulter de la Thréonine par l'action de la Thréonine-aldolase.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat qui est dû à la transformation de l'acide citrique, et secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne, ...etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Ceci résulte d'un choix

avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (**Anonyme, 1995**).

Notons que la saveur caractéristique du yaourt, due à la production du diacétyle et de l'acétaldéhyde et qui est recherchée dans les produits type « nature », est en partie masquée dans les yaourts aromatisés.

#### **5-4. Activité texturante :**

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui, en formant des filaments, limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt.

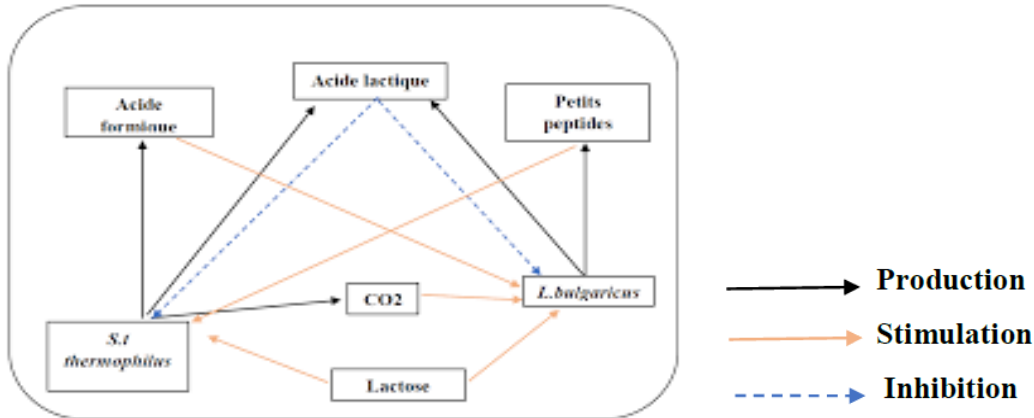
L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (EPS) qui, selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composée de rhamnose, arabinose et marmose (**Schmidt et al., 1994**).

Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*. Mais, d'après **Tamime (1999)**, *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose a des rapports de 4/ 1/ 1.

#### **6. Comportement associatif des deux souches :**

*St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* se développent en association (appelée protocoopération) dans des cultures mixtes (figure2) ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel.

Ces bactéries, par leur activité acidifiante, ont un effet bénéfique du point de vue qualité hygiénique du produit. En parallèle, elles engendrent des produits secondaires qui contribuent à la qualité organoleptique du yaourt. D'un point de vue nutritionnel, l'activité fermentaire de ces espèces lactiques favorise une solubilisation des différents constituants du lait, améliorant ainsi leur biodisponibilité (**Courtin et al, 2002 ; Ngounou et al., 2003**).



**Figure 02.** Métabolisme complémentaire de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* dans le lait (Litim, 1984).

## 7. Technologie du yaourt :

La fabrication du yaourt, même si elle est connue depuis des temps très lointains, demeure un procédé assez complexe et en perpétuelle évolution car, il intègre à chaque fois les connaissances et les progrès réalisés dans des domaines variés tels : la biologie moléculaire et cellulaire, la chimie, la biophysique . . . etc.

Les étapes de fabrication (**figure2**) peuvent différer selon qu'on a affaire à un yaourt « étuvé » dont la fermentation se fait après conditionnement en pots et le yaourt « brassé », dont la fermentation se fait en cuve. Le coagulum obtenu dans ce dernier cas est dilacéré et brassé pour être rendu plus ou moins visqueux, puis conditionné en pots.

Globalement, nous distinguons dans le processus d'élaboration les étapes énumérées ci-dessous :

### 7-1. Standardisation du mélange :

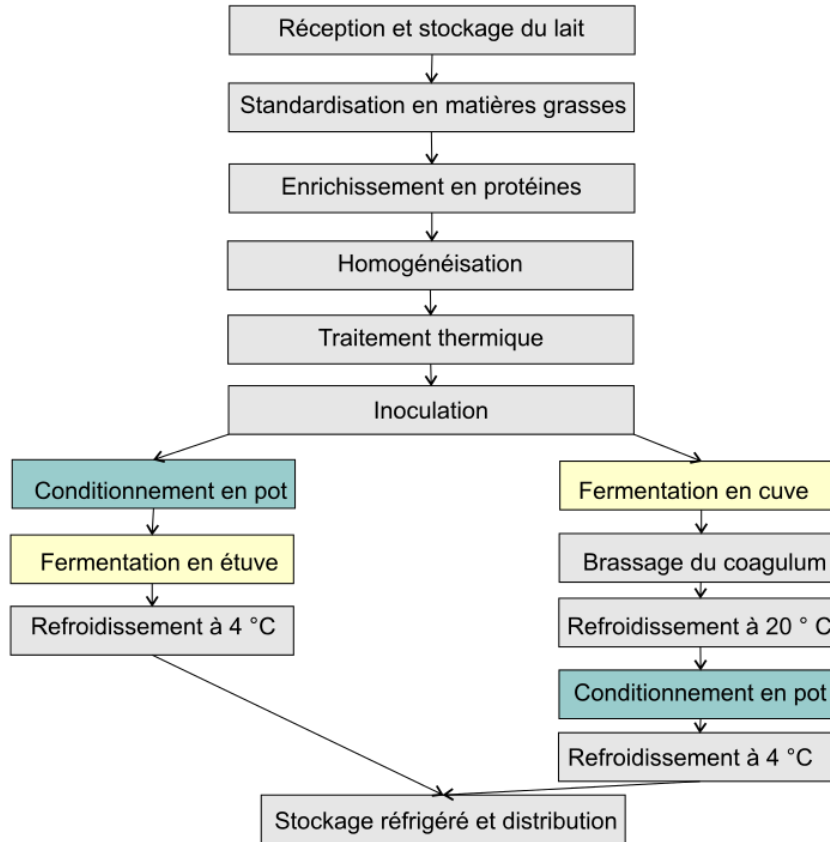
La matière première utilisée (lait frais, lait reconstitué, mélange des deux) doit être de bonne qualité microbiologique, exempte d'antibiotiques ou autres inhibiteurs et parfaitement homogénéisée.

La teneur en matière grasse du yaourt est variable. Généralement, elle est ajustée de sorte que le produit entre dans l'une des catégories ci-après :

- Yaourt entier : au minimum 3 % (en poids) de matière grasse ;
- Yaourt partiellement écrémé : moins de 3 % de matière grasse ;

- Yaourt écrémé : au maximum 0,5% de matière grasse.

L'homogénéisation (à des pressions de 250 atmosphères) réduit le diamètre des globules gras et permet ainsi une meilleure dispersion de celle-ci dans le produit, limite sa remontée au cours de l'incubation et donnent une consistance plus uniforme au yaourt fabriqué (Litim, 1984).



**Figure 3.**Diagramme des principales étapes de fabrication du yaourt (Anonyme, 1995).

La consistance et la viscosité du yaourt sont pour une grande partie sous la dépendance de la matière sèche du lait. La matière grasse confère de l'onctuosité, masque l'acidité et améliore la saveur. Les protéines améliorent la texture et masquent aussi l'acidité. Selon le code des recommandations **FAO/OMS (1975)**, la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse doit être de 8,2 % (en poids) quelle que soit la teneur en matière grasse.

### 7-2. Traitement thermique :

Lorsque la préparation du lait terminée, celui-ci est soumis alors à un traitement thermique de pasteurisation (de 94 à 96°C pendant 3 à 5 minutes).

Ce traitement a pour but de:

- Détruire les micro-organismes pathogènes pouvant être présents et la plus grande partie de la flore banale. Il permet aussi la suppression éventuelle d'inhibiteurs naturels et la stimulation des bactéries par l'apparition de facteurs de croissance ;
- Provoquer un déplissement par dénaturation partielle des protéines solubles et leur fixation sur les caséines. Cet effet a pour conséquence d'augmenter les capacités de rétention d'eau du yaourt entraînant la modification des propriétés rhéologiques du coagulum acidifié. Le caillé devient plus ferme et la tendance à l'expulsion de sérum au cours du stockage est réduite. Avec ce traitement, le yaourt brassé présente une structure plus homogène et visqueuse (**Anonyme, 1995**).

Immédiatement après le traitement thermique, le lait reconstitué est refroidi à une température de 6°C puis stocké dans des tanks pour être, par la suite ensemencé.

### **7-3. Ensemencement :**

Elle se fait à l'aide d'un levain comprenant exclusivement chacune des deux bactéries spécifiques du yaourt : *Streptococcus salivarius, sub sp. thermophilus*, et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. La culture utilisée est ensemencée à raison de 2%. Une bonne agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange lait/ferment.

### **7-4. Réchauffage :**

Le lait reconstitué ainsi ensemencé est amené à une température généralement voisine de 45°C par passage à travers des réchauffeurs à plaques. La température optimale de développement du Streptocoque est de 42- 45°C ; celle du Lactobacille de 47 -50°C.

### **7-5. Etuvage/ brassage :**

Selon la nature du yaourt à fabriquer, on procède soit à une incubation au niveau des chambres chaudes (dans le cas du yaourt ferme) ou à une fermentation en cuve (dans le cas d'un yaourt brassé).

#### **7-5-1. Phase d'incubation (étuvage) :**

Dans le cas des yaourts étuvés (dit aussi en pot, fermes ou traditionnels), le lait ensemencé est rapidement réparti en pots en plastique (poly-vinyl). Dans le cas des yaourts sucrés, aromatisés, aux fruits, à la confiture... etc., l'apport des additifs se fait avant le remplissage des pots.

Après le capsulage (fermeture étanche par une membrane en aluminium), les pots sont acheminés vers une chambre chaude pour incubation qui dure environ de 2 à 3 heures.

L'acidification dépend de la température et de la durée d'incubation. Les pots sont maintenus dans l'étuve jusqu'à l'obtention d'une acidité de 0,75 (au minimum) à 1% environ d'acide lactique, soit

75 à 100° Dornic. Le caillé obtenu dans ces conditions doit être ferme, lisse et sans exsudation de sérum.

Une fois l'acidité attendue est atteinte, les pots de yaourts sont alors immédiatement sortis des locaux d'étuvage, refroidis le plus rapidement possible à la température de +4°C, ce qui a pour but d'arrêter l'acidification par inhibition des bactéries lactiques. Les pots sont ensuite stockés à cette température pendant 12 à 24 heures pour augmenter la consistance du produit sous l'effet du froid.

#### **7-5-2. Brassage :**

En vue de fabriquer des yaourts brassés, le laitensemencé est maintenu en cuve à la même température que dans le cas des pots (entre 42 et 46 °C) jusqu'à obtention de l'acidité voulue. On procède par la suite au découpage et au brassage du caillé pour le rendre onctueux.

Ce traitement, qui doit se faire avec précaution pour ne pas induire des transformations indésirables, a pour but de rendre le caillé onctueux. Il doit être réalisé avec précaution en optant par l'un des procédés suivants :

- Agitation mécanique à l'aide d'un brasseur à turbine ou à hélice ;
- Passage du gel à travers un tamis ;
- Homogénéisation à basse pression.

Une fois ce traitement opéré, le caillé est immédiatement et rapidement refroidi à une température inférieure à 10 °C. La réfrigération dans le tank se fait trop lentement et peut provoquer une sur acidification. C'est pour cette raison qu'elle doit être réalisée par passage dans un échangeur-réfrigérant à plaques ou tubulaire. Le brassage du caillé au cours de la réfrigération améliore l'onctuosité du produit.

Le yaourt est ensuite conditionné en pots et conservé entre 2 à 4°C. L'addition éventuelle d'arômes, de pulpes de fruits, etc., se fait au moment du remplissage des pots.

Notons que le yaourt à boire se différencie du brassé par son état liquide qui l'assimile à une boisson. Sa fluidité est obtenue par une diminution de la teneur en matière sèche. Le brassage, effectué par passage à l'homogénéisateur sous pression inférieure à 50 atmosphères, donne une viscosité inférieure d'environ 50 % à celle obtenue par brassage mécanique.

#### **7-6. Conservation des yaourts :**

Préparés selon une technologie rigoureuse et dans des conditions hygiéniques strictes, ces produits peuvent se conservés environ 3 semaines jusqu'à la vente au consommateur sous réserve d'être maintenus au froid (entre 4 et 8°C).

Si le maintien des yaourts au froid empêche la multiplication bactérienne, il n'arrête pas complètement leur activité métabolique. Bien que lente, la production d'acide lactique se poursuit. De plus, des enzymes hydrolysent les protéines avec, comme conséquences, une diminution de la fermeté et de la viscosité et l'apparition de peptides à goût amer. Pour ces raisons, on procède parfois, quand la réglementation le permet, à un traitement thermique après la fermentation.

## **8. Qualités du yaourt :**

### **8-1. Aspects physico-chimiques :**

Le yaourt doit répondre aux caractéristiques suivantes :

- Couleur franche et uniforme ;
- Goût franc et parfum caractéristique ;
- Texture homogène (pour le yaourt brassé) et ferme (pour le yaourt étuvé).

### **8-2. Aspects hygiéniques :**

Selon la norme nationale de 1998, N°35 parue au Journal Officiel, les yaourts ne doivent contenir aucun germe pathogène.

Le traitement thermique appliqué sur le lait avant fabrication du yaourt est suffisant pour détruire les micro-organismes non sporulés pathogènes ou non. Leur présence dans le yaourt ne peut être que de manière accidentelle. Le pH acide du yaourt le rend hostile aux germes pathogènes, comme pour la plupart des autres germes indésirables.

Les levures et les moisissures peuvent se développer dans le yaourt. Ces dernières proviennent principalement de l'air ambiant dont la contamination se situe au stade du conditionnement (**Larpen et Bourgeois, 1989**).

### **8-3. Défauts et altérations du produit :**

Comme l'élaboration du yaourt fait intervenir plusieurs étapes clés où la fermentation et la formation du gel doivent être minutieusement dirigées et surveillées, il est fréquent que des altérations de goût, d'apparence et de texture (résumés dans le Tableau 1) apparaissent et dont certaines sont préjudiciables à la qualité finale du produit (**Luquet, 1985**).

### **8-4. Qualité organoleptique :**

#### **8-4-1. Gélification acide :**

Les structures principales impliquées lors de la gélification acide du lait sont les micelles de caséines. Lors de la baisse du pH, due à la fermentation lactique, les micelles de caséines subissent des changements substantiels. Le déplacement de l'équilibre acido-basique entraîne une diminution

progressive de la charge ionique des micelles qui devient nulle. En parallèle, une solubilisation du phosphate de calcium micellaire est observée, entraînant la dissolution de la structure micellaire. Le pH auquel commence la gélification du lait dépend de la température et des prétraitements thermiques (Tamimeet Robinson, 1985).

**Tableau 1.** Principaux défauts rencontrés dans la fabrication des yaourts.

(A)

Nature	Causes
<b>Amertume</b>	Trop longue conservation ; Activité protéolytique trop forte des ferments ; Contamination par des germes protéolytiques.
<b>Goût levuré, fruité, alcool</b>	Contamination par des moisissures ; Fruits de mauvaises qualités pour les yaourts aux fruits.
<b>Goût plat, absence d'arôme</b>	Mauvaise activité des levains (déséquilibre de la flore, incubation trop courte ou à trop basse température), teneur en matière sèche trop faible.
<b>Manque d'acidité</b>	Mauvaise activité des levains (taux d'ensemencement trop faible, incubation trop courte ou a basse température, inhibiteurs dans le lait, bactériophages).
<b>Trop d'acidité</b>	Mauvaise conduite de la fermentation (taux d'ensemencement trop fort, incubation trop longue ou a température trop élevée ; Refroidissement pas assez poussé, trop lent ; Conservation a trop haute température.
<b>Rancidité</b>	Contamination par les germes lipolytiques et traitement thermique trop faible.
<b>Goût farineux, de poudre</b>	Poudrage trop poussé.
<b>Goût oxydé</b>	Mauvaise protection contre la lumière (pots en verre surtout) ; Présence de métaux (fer, cuivre)
<b>Goût de cuit</b>	Traitement thermique trop sévère.
<b>Goût aigre</b>	Mauvaise conduite des levains (contamination par une flore lactique sauvage – coliformes).
<b>Goût gras</b>	Teneur en matière grasse trop élevée.

**(B)**

Nature	Causes
<b>Déculottage</b>	Agitation ou vibration pendant le transport faisant suite à un refroidissement mal conduit en chambre froide (pour le yaourt ferme).
<b>Manque de fermeté (pour yaourt étuvé)</b>	Ensemencement trop faible ; Mauvaise incubation (temps et ou température trop faible) ; Agitation avant complète coagulation ; Matière sèche trop faible.
<b>Trop liquide (pour le yaourt brassé)</b>	Brassage trop violent ; Mauvaise incubation (temps trop faible) ; Matière sèche trop faible ; Mauvais ferments (pas assez épaississants) ; Fruits ou arômes pas assez concentrés.
<b>Trop filant</b>	Mauvais ferment (trop filant) ; Température d'incubation trop faible.
<b>Texture sableuse</b>	Chauffage du lait trop important ; Homogénéisation à température trop élevée ; Poudrage trop fort ; Mauvais brassage ; Acidification irrégulière et trop faible.
<b>Texture granuleuse</b>	Mauvais brassage ; Teneur en matière grasse trop élevée ; Mauvais choix des ferments.

Activer Win

**(C)**

Nature	Causes
<b>Décantation, synérèse</b>	Suracidification ou post acidification (mauvaise conduite de la fermentation) ; Température trop élevée pendant le stockage ; Conservation trop longue ; Refroidissement trop faible ; Agitation trop poussée et admission exagérée d'air (pour le yaourt brassé) ; Mauvaise adjonction des fruits ou des pulpes de fruits ; Agitation des yaourts (yaourt ferme) ; Teneur en matière sèche trop faible.
<b>Production de gaz</b>	Contamination par des levures et des coliformes.
<b>Colonies en surface</b>	Contamination par des levures et moisissures.
<b>Couche de crème</b>	Mauvaise ou absence d'homogénéisation.
<b>Produit sur le couvercle</b>	Mauvaise manutention.
<b>Produit non homogénéisé</b>	Mauvaise agitation (dans le cas des yaourts aux fruits).

Activer Win

L'abaissement du pH par acidification entraîne une déminéralisation progressive des micelles de caséines. Celles-ci vont s'associer entre-elles par formation de liaisons hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques pour former un réseau protéique retenant la phase aqueuse. A un pH inférieur au point isoélectrique (pH=4,6), les micelles qui flocculent, précipitent, du fait de leur densité, et le réseau formé se stabilise et n'évolue pratiquement plus.

Les études réalisées sur la microstructure du gel ainsi formé montrent que celle-ci dépend de plusieurs facteurs dont la concentration en matière sèche (Schkoda et al., 1998 ; Van marle, 1998), la

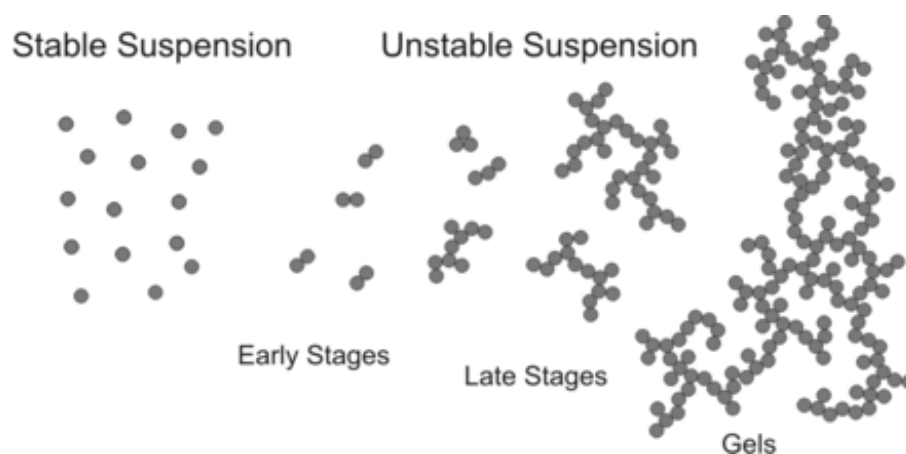
méthode d'enrichissement du lait (**Tamime et al., 1984**), le traitement thermique subi (**Kessler, 1998**) et enfin, la nature des souches bactériennes utilisées et de leur capacité à synthétiser des polysaccharides exocellulaires (EPS) capables d'augmenter la viscosité du gel (**Hassan et al., 1995**).

Ainsi, les travaux de **Kessler (1998)** montrent que les micelles de caséines issues d'un yaourt fabriqué à partir de lait chauffé forment des chaînettes bien liées entre elles ; tandis qu'elles forment des agrégats dans un yaourt fabriqué à partir du lait non chauffé.

Cette différence est essentiellement due au comportement de la *β-Lactoglobuline* (protéine sérique majoritaire) qui a la propriété de former un complexe protéique avec la caséine kappa (**Dalgleish, 1990**).

#### 8-4-2. Comportement rhéologique :

La transformation du lait en yaourt s'accompagne aussi d'un changement des propriétés rhéologiques en passant d'un liquide à un gel à destruction non réversible. Les additifs et les étapes du procédé de fabrication jouent également un rôle sur ce comportement (**Paci kora, 2004**).



**Figure 4.** Effet du traitement thermique sur la microstructure du yaourt (**Kessler et al., 1998**)

La connaissance précise de ce comportement rhéologique est nécessaire pour la conception et le dimensionnement des installations de transformation. Elle permet également d'appréhender la texture des produits finis.

Le yaourt est défini comme un fluide viscoélastique. Il possède donc à la fois les propriétés visqueuse d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. Le comportement rhéologique du yaourt est de type non newtonien, dans ce sens où la viscosité du produit dépend de la vitesse de cisaillement ou de la contrainte exercée.

$$\text{La loi de Newton s'écrit : } \mu = \tau / \dot{\gamma} = \text{constant}$$

$\mu$  = viscosité (Pa.s),

$\tau$  = contrainte de cisaillement (Pa),

$\dot{U}$  = vitesse de cisaillement (s<sup>-1</sup>).

Dans le cas des yaourts, la viscosité diminue quand la vitesse de cisaillement augmente. On parle dans ce cas de viscosité apparente à une vitesse de cisaillement donnée.

Différents appareils de laboratoire sont utilisés pour caractériser les propriétés rhéologiques, à savoir le viscosimètre Brook-field, le rhéomètre rotatif, les pénétromètres ou encore l'entonnoir de Posthumus.

Généralement, les viscosimètres permettent de mesurer uniquement les propriétés visqueuses (viscosité apparente), tandis que les rhéomètres mesurent les propriétés viscoélastiques. En fonction de la géométrie du module de mesure, des contraintes ou des vitesses de cisaillement appliquées, les analyses réalisées déstructurent plus au moins le gel lactique.

### **8-3-3. Propriétés et analyses sensorielles :**

#### **8-3-3-1. Propriétés organoleptiques :**

L'analyse sensorielle constitue une approche indispensable à l'évaluation de la qualité organoleptique d'un produit alimentaire. Etroitement associée à la caractérisation des propriétés physico-chimiques, elle peut être un outil d'aide à la maîtrise de la qualité et la formulation des produits transformés.

La qualité organoleptique des aliments regroupe les propriétés d'un produit perceptibles par les organes des sens (**norme ISO 5492,1992**). Nous développerons ci-après seulement les aspects liés aux sensations en bouche perçues par le panel entraîné lors de la consommation du produit à savoir : l'odeur, le goût et la texture.

L'odeur et l'arôme sont perceptibles par l'organe olfactif. Pour l'arôme « yaourt », l'acétaldéhyde est considéré comme le principal composé d'arôme, mais la 2, 3 pentanedione, le dimethylsulfure, le limonène et l'undecanal ont également un impact (**Imhof et al., 1994**). Par ailleurs, de nombreuses notes aromatiques supplémentaires peuvent être apportées au yaourt par ajout de composés d'arôme et de préparation de fruits.

La saveur correspond à la sensation perçue par l'organe gustatif lorsqu'il est stimulé par certaines substances solubles. Le yaourt est caractérisé par une saveur acide due à la présence d'acide lactique. D'autres saveurs, mais moins intenses, sont les saveurs sucrée et amère. La saveur sucrée est due à la présence du lactose non hydrolysé et du galactose produit au cours de la fermentation. Elle peut être renforcée par l'ajout du saccharose. La saveur amère, considérée indésirable, est due aux peptides amères produits par certains ferments ou à une contamination par des germes protéolytiques (**Biliaderis et al., 1992 ; Weber, 1994**).

La texture est définie comme l'ensemble des propriétés mécaniques, géométriques et de surface d'un produit, perceptibles par les mécanorécepteurs, les récepteurs tactiles, et éventuellement les récepteurs visuels et auditifs.

Les propriétés mécaniques sont celles liées à la réaction du produit à une contrainte. Elles sont subdivisées en cinq caractéristiques primaires : dureté, cohésion, viscosité, élasticité et adhérence.

Les propriétés géométriques sont celles liées aux dimensions, à la forme et à l'arrangement des particules dans un produit. Les propriétés de surface sont celles liées aux sensations telles que celles produits par l'eau et la matière grasse.

Enfin, la texture en bouche des yaourts est caractérisée le plus fréquemment par le caractère épais, nappant et « mouthfeel » qui est une sensation relative à la densité et la viscosité. Elle est faible pour les produits liquides et importante pour les produits qui replissent et restent en bouche.

#### **8-3-3-2. Analyse descriptive quantitative :**

L'analyse sensorielle met en œuvre le sujet comme « instrument de mesure ». Son but est de décrire la nature des perceptions et de quantifier leur intensité, de manière à donner une carte d'identité du produit précise, reproductible et compréhensible par tous.

**Barthelemy (1998)** définit l'analyse descriptive comme : «la recherche d'un nombre minimum de descripteurs qui permettront de donner le maximum d'informations sur les propriétés sensorielles du produit à analyser ; la mesure de l'intensité de la sensation perçue pour chacun des descripteurs choisis ; la construction du profil du produit à l'aide de l'ensemble des descripteurs quantifiés ».

L'application de cette méthode passe par les étapes clés de sélection du jury, de choix des descripteurs, de choix de l'échelle de notation, d'entraînement des sujets et le contrôle des performances, d'organisation des séances et la compilation des résultats.

#### **8-4-3-2-1. Sélection du jury :**

La littérature répertorie quatre critères sur lesquels doit porter la sélection (**Lesschaeve, 1997**) :

- Les aptitudes sensorielles : sensibilité normale, capacité discriminative, aptitude à décrire les sensations perçues, capacité à analyser des aliments complexe, aptitude à mémoriser et à reconnaître les arômes,
- La personnalité du sujet, sa motivation à participer à l'étude,
- L'état de santé du sujet, le suivi d'un régime alimentaire spécifique ou l'existence d'allergies particulières,
- Enfin la disponibilité du sujet.

#### **8-4-3-2-2. Choix des descripteurs :**

Les descripteurs doivent répondre aux critères de pertinence, précision, pouvoir discriminant, exhaustivité et éventuellement indépendance (**MacLeod et al., 1998**).

Le choix des descripteurs peut être effectué selon une des trois procédures suivantes ; une liste préétablie est imposée aux sujets, la liste est élaborée par les sujets ou une combinaison des deux procédures précédentes.

#### **8-4-3-2-3. Echelle de notation :**

L'échelle de notation permet de quantifier l'intensité des perceptions. Les échelles d'intensité les plus souvent utilisées sont : ordinale (classement), d'intervalle, structurée en catégories numériques ou non structurées et de rapport. Les différentes expérimentations réalisées pour comparer plusieurs types d'échelle donnent des résultats contradictoires. Elles ne permettent pas d'établir, de façon évidente, la supériorité d'une échelle sur une autre (**Montet, 2001**).

#### **8-3-3-2-4. Entraînement des sujets et le contrôle des performances :**

Après avoir choisi les descripteurs et l'échelle de notation, les sujets sont entraînés à leur utilisation. L'entraînement consiste à homogénéiser la valeur sémantique des termes utilisés par le jury et à déterminer les protocoles de dégustation. Il est également utile d'élaborer un lexique définissant chacun des termes employés. Des références externes concrètes représentant le descripteur peuvent être fournies aux sujets afin de les aider à créer les concepts sensoriels associés (**Murray et al., 2001**).

#### **8-3-3-2-5. Organisation des séances :**

Le principe de base qui régit l'environnement de toute mesure sensorielle est l'obtention de la part du sujet d'une réponse qui ne dépend que du stimulus et qui, par conséquent, ne soit pas biaisée par l'environnement (**Stringler, 1998**). Tous les facteurs extrinsèques au produit (température, quantité présentée, récipient, ...etc) doivent être absolument constants.

Les échantillons sont codés avec des nombres à trois chiffres pris au hasard et sont présentés aléatoirement. Ils peuvent être présentés simultanément ou de façon monadique c'est-à-dire l'un après l'autre. Dans le premier cas, l'évaluation de chaque produit est relative aux autres produits évalués. Dans le deuxième cas, le sujet note dans l'absolu en faisant appel aux références construites lors de l'entraînement.

Dans le cas d'une évaluation monadique des produits, l'ordre de leur dégustation peut induire des artefacts dans le jugement des sujets dus à des effets de rang et de report (**Callier, 2001**). Par exemple, il a été constaté lors de nombreuses études que le produit évalué en premier a tendance à être sur-noté par rapport aux produits évalués aux rangs suivants. L'effet de report provient du ou des produits précédant le produit évalué. Il apparaît donc très important d'équilibrer le plan de présentation des produits par rapport à ces effets. Différentes possibilités existent : ordre de présentation aléatoire, plan en carrés latins, etc... (**McFie et al., 1989**).

## **Chapitre II : Les Poly phénols**

## 1. Généralités biochimiques :

Les composés phénoliques sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire des plantes. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10.000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façon variable suivant les végétaux, (**Guignard, 2000**).

Les polyphénols sont des molécules très diversifiées, constituées d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes qui dérivent de nombreux composés : les acides hydroxy cinnamiques et les flavonoïdes, ces derniers sont des composés en C6-C3- C6, qui renferment plusieurs milliers de molécules pouvant être regroupées en plus de dix classes, induisant une nomenclature complexe. Ils sont issus du para-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques (**Macheix et al., 2005**).

## 2. Localisation et rôle dans les plantes :

A niveau de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales.

Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (**Winkel, 2004 ; Macheix et al., 2005**).

D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation (**Macheix et al., 2005**).

Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme (**TomasBarberan et Espin, 2001 ; Cheynier et Sarni-Manchado, 2006**). Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (**Desjardin, 2008**).

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

De plus, les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (**Gould et Lister, 2006**). Enfin, les flavonoïdes comme les dérivées hydroxy cinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (**Walton et Brown, 1999**).

### 3. Classification des composés phénoliques :

D'après **Harbone (1994)**, les polyphénols sont classés en fonction de leur squelette carbonée en quatre principales classes (**Tableau 1**), de même qu'ils peuvent être classés en trois groupes selon leurs répartitions :

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

**Tableau 1.** Classification des polyphénols selon le nombre d'atomes de carbone (**Harbone, 1994**).

Nombre de carbones	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C6	Phénols simples	Benzoquinones Catéchol
7	C6-C1	Acides phénoliques	p-Hydroxybenzoïque Salicylique
8	C6-C2	Acétophénone Phénylacétiques acides	p- hydroxyphénylacétique
10	C6-C4	Nafthoquinone	Plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthone	Mangiférine
14	C6-C2-C6	Stilbènes ; Anthraquinones	Acide coumarique
18	(C6-C3) 2	Ligans	Podophyllotoxine
30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoid	Amentoflavone
n Lignines ;	(C6-C3) n ; (C6) n ; (C6-C3-C6) n	Catécholmélanine Flavolans (Tanins condensés)	

#### 3.1. Composés phénoliques largement répandus :

##### 3.1.1. Flavonoïdes :

Comme le laisse supposer, sa dénomination historique (du latin ;flavus = jaune). Ce groupe est très important et très étendus et comprend des composés de couleur jaune. Les flavonoïdes sont des

composés polyphénoliques présents dans les végétaux et plus de 4000 différents types de flavonoïdes ont été décrits (**Hollman, 1997**).

D'après **Shahidi et Naczk (1995)**, les flavonoïdes appartiennent aux groupes des phénols qui ont un squelette de base diphenyle-propane (C6-C3-C6). Avec différents niveaux d'oxydation au centre du cycle pyrane (**figure 5**), et la plupart des flavonoïdes se trouvent sous forme d'aglycones liés à des glucosides. Ces constituants glycosidiques sont fixés aux groupes hydroxyles du cycle A et plus fréquemment à la position 3 de l'hétérocycle (**Richter, 1993**).

Parmi les flavonoïdes présentant le plus intérêt, nous citerons :

### **3.1.2. Les anthocyanes :**

Les anthocyanes sont des pigments, qui par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour divers pH, de rouge orange en milieu acide au bleu mauve en milieu alcalin ; et dans certain cas forment des complexes avec les métaux (**Richter, 1993**).

Les anthocyanes se trouvent dans la plupart des espèces de plantes et plus de 200 anthocyanes différents ont été identifiés dans les plantes environ 70 dans les fruits (**figure 6**).

La plupart des anthocyanes sont des produits comme monoglycosides et diglycosides de pelargonidine, cyanidine, malvidine et peonidine (**Shahidi et Nacz, 1995**).

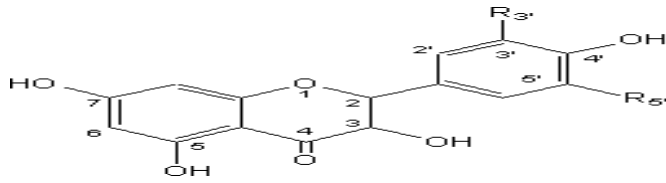
Les anthocyanes dérivent du phenyl-2-benzopyrylium ou flavylum et le cation pyrilium est un ion oxonium dans lequel l'atome d'oxygène tétravalent est chargé positivement ressemblants à une structure qui rappelle celle de l'azote dans les ions ammoniums et dans le cas du pyrilium ; alors que le caractère aromatique est dû à la présence de doubles liaisons conjuguées responsables de la stabilité de la molécule (**Aissani et Maata, 1998**).

Ils sont présents dans la nature sous forme hétérosidiques ou anthocyanidines, cependant le nombre d'aglycones, ou l'anthocyanidines est assez limité (**Ribereau et al., 1968**).

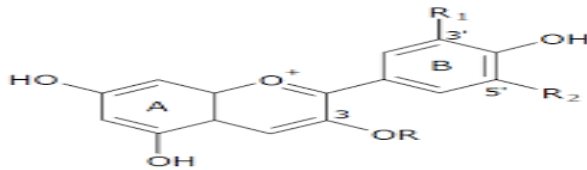
### **3.1.3. Flavones et flavonoles :**

En générale les flavonoles de teinte jaune sont caractérisés par la présence d'un groupement carbonyle en position 4 et d'un groupement glucidique est le plus souvent relié en position 7. Parmi les flavonoles les plus répandus, on trouve essentiellement le quercétol et le myricétol.

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



**Figure 5.** Structure de base des flavonoïdes.



**Figure 6.** Structure de base des anthocyanes.

#### 4. Intérêts des composés phénoliques :

##### 4-1. Rôle nutritionnel et thérapeutique :

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 titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour. Ces substances sont dotées de certaines activités résumées dans le (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Activités biologiques des composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

<b>Polyphénols</b>	<b>Activités</b>
<b>Acides phénols</b> (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes
<b>Coumarines</b>	Protectrices vasculaires et Antioœdémateuses
<b>Flavonoïdes</b>	Antitumorales Anticarcinogènes Antiinflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
<b>Anthocyanes</b>	Protectrices capillaro-veineux
<b>Proanthocyanidines</b>	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Antiinflammatoires
<b>Tanins galliques et catéchiques</b>	Antioxydantes

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

#### **4.2. Rôle physiologique :**

Des travaux très anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles, ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (**Alibert et al., 1977**).

#### **4.3. Rôle technologique :**

Généralement, les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols (**Lugasi et al., 2003**).

#### **5. Mode d'action des polyphénols :**

L'action des poly phénols sur les cellules des microorganismes est basée sur une multiplicité d'influences individuelles. Celles-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 ou ce degré est plus élevé.

Les dérivés de l'acide benzoïque sont les plus efficaces principalement contre les levures et moisissures.

L'activité antimicrobienne exige une certaine solubilité dans l'eau et dans les lipides. La croissance des microorganismes n'est pas possible que dans une phase aqueuse uniquement et la substance antimicrobienne doit être hydrosoluble afin de traverser la paroi de la cellule (**Luck et al., 1995**).

**Chapitre III : Généralité sur les espèces  
de Menthe poivrée.**

## **1. Introduction :**

Une plante est dite médicinale, lorsque «au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses». Elle peut être Retenue par la Pharmacopée, mais celle-ci peut aussi retenir des plantes qui, bien que non médicinales, sont utiles à la Pharmacie (**Bruneton,1999**).

Dans cette gamme élargie, plusieurs espèces médicinales ne sont que médicinales, et beaucoup d'autres espèces ne sont pas que médicinales. La thérapie par les plantes s'enracine dans le passé de l'humanité ce qui rend difficile l'établissement d'une liste exhaustive ne comprenant que les plantes proprement dites médicinales.

L'intérêt thérapeutique des plantes médicinales est dû à la présence d'une catégorie de molécules synthétisées par la plante, considérées comme étant, pratiquement, sans rôle spécifique pour le développement de la plante (**Braz,1999**).

Ces molécules appelées métabolites secondaires, sont classées selon leur structure chimique en trois grandes familles : les composées phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés (**Sauadet all, 2010**).

Parmi ces molécules, plusieurs ont des propriétés médicamenteuses très intéressantes comme les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponosides et les tanins (**Elmtili et Ben, 2010**).

A travers des siècles passés, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent la principale, voir l'unique source de remède. Un grand nombre de plante médicinales et aromatiques et des plantes épicées cultivées ou spontanées possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent application dans divers domaines dont en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture. Cependant, l'évaluation des effets biologiques de ces plantes que certains ont des utilisations thérapeutiques présente actuellement une tâche très intéressante (**Telidji ,2015**).

## **2. Phyto-aromathérapie :**

Issue des traditions thérapeutiques des plus antiques civilisations aux plus modernes, la Phyto-aromathérapie est en fait fille de la médecine éternelle, celle des plantes et de la nature. Celle-là même dont certains se moquent, en nommant ces médications remèdes de 'bonne femme', ignorant certainement que leurs sarcasmes n'en sont pas, puisque ce terme est la déformation phonétique du latin "bonne fame",signifiant bonne réputation.

La Phyto-aromathérapie ne prétend pas pour autant se substituer à la médecine classique; bien que par un usage guidé elle ne se propose pas seulement d'apporter un mieux-être mais de soulager ces maux de tous les jours qui nous empêchent d'avoir une vie pleinement harmonieuse. Les plantes que vous utilisez doivent être absolument naturelles, et de préférence en l'état le plus simple possible sans traitement particulier. La forme poudre totale est à préférer. Pour établir ce guide nous nous sommes basés sur les plantes les plus couramment utilisées et les plus efficaces. Il faut s'assurer que

les plantes n'ont subi aucune transformation chimique, ni subi une quelconque irradiation (**Cécile, 2006**).

### 3. La menthe poivrée:

C'est un ingrédient important de plusieurs formulations utilisées dans la gestion des troubles gastro-intestinaux et cutanés. On pense qu'il s'agit d'un hybride naturel entre *M. spicata* et la plante aquatique *M. aquatica*, cette dernière mordant elle-même un hybride de *M. longifolia* et de *M. rotundifolia*, de sorte que *M. piperita* est un hybride triple hybride.

La plante est une herbe forte, vivace et glabre, de 30 à 90 cm de hauteur. Les tiges de square sont généralement rougeâtre-violet et lisse. Les feuilles sont courtes de 2,5 à 5 cm de long, oblongues-ovales et dentées (**Fleming , 1998**).

La classification de la Menthe Poivrée est comme suit:

<b>Règne :</b> Plantae
<b>Division:</b> Magnoliophyta
<b>Classe:</b> Magnoliopsida
<b>Ordre :</b> Lamiales
<b>Famille:</b> Lamiaceae
<b>Genre:</b> Mentha
<b>Espèce:</b> Mentha piperita.

### 3.6. Composition:

*La Menthe poivrée* est riche en acide phénolique (7%) : acide rosmarinique et dérivés de l'acide caféique. Elle contient une très forte proportion de flavonoïdes et des tanins (**Fleming , 1998**).

## 4. Propriété:

### 4.1. Activité anti-oxydante:

La production excessive de ROS a tendance à initier la chaîne réactions qui entraînent irréversibles des changements chimiques dans les protéines, les lipides et ADN (**Wijeratne et al.,2005**). Ces réactions délétères peuvent entraîner un dysfonctionnement cellulaire et une cytotoxicité . Ainsi, l'évidence croissante suggère que beaucoup de maladies chroniques humaines, telles que le cancer, maladie cardiovasculaire et les troubles neurodégénératifs sont les résultats des dommages oxydatifs par ROS (**Barchan et al . ,2014**).

### 4.2. Activité antimicrobienne:

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des extraits, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaires (**Kokate et Varma, 1970**).

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

#### **4.3. Activité antifongique:**

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les plantes médicinales et leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**Desam et al ., 2017**).

Les extraits les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques sont obtenue surtout des plantes suivantes (Menthe, Thym, Lavande, Romarin...) et ceci étant donnée leurs grande richesse en composés phénoliques (**Gow et all; 2017**)

#### **4.5. Toxicologie :**

Au dose usuelles, la consommation des parties aérienne de la menthe poivrée comme condiment ou en tisane, ne présente aucun risque de toxicité ni aigüe ni chronique. Cependant, de très forte dose des huiles essentielles peuvent conduire à des céphalées des aigreurs d'estomac, de la bradycardie, des tremblements musculaires de l'ataxie. Le potentiel de sensibilisation de la menthe poivrée est faible, mais des réactions allergiques ont parfois été observées après absorption des huiles essentielles. Le menthol et le thymol sont considérés comme allergènes (**Eberhard et al., 2005**).

## **Partie 2 : Méthodologie**

## **1-Objectifs :**

Ce travail expérimental a consisté à suivre l'effet antimicrobien de l'extrait hydro-méthanolique de *Mentha pipérита* L vis-à-vis d'un germe spécifiques du yaourt dont *Lactobacillus Bulgaricus*. L'étude vise à comprendre le type d'action inhibitrice que peut exercer les principaux composés bioactifs de la Menthe poivrée obtenus par usage de méthanol comme solvant d'extraction à l'égard de ce germe lactique.

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

L'étude a été menée chez une espèce végétale de Menthe poivrée (*Mentha pipérита*) disponible dans la région de Mostaganem. La plante objet de l'étude (1800 g environ) a été achetée du marché de Mostaganem le 05/05/2020

La matière végétale est ensuite étalée sur du papier aluminium, puis séchée à l'étuve réglée à 25°C pendant 24 à 48 heures. Les échantillons séchés sont 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.

La matière végétale a été ensuite étalée sur du papier journal, puis séchée à l'air ambiant durant 2 semaines. Les échantillons séchés sont enfin broyés dans un broyeur à lame de cuisine puis mis dans des bocaux hermétiques et stérilisés par les rayons UV pendant 20 minutes et conservés à sec (température ambiante) et à l'abri de la lumière.

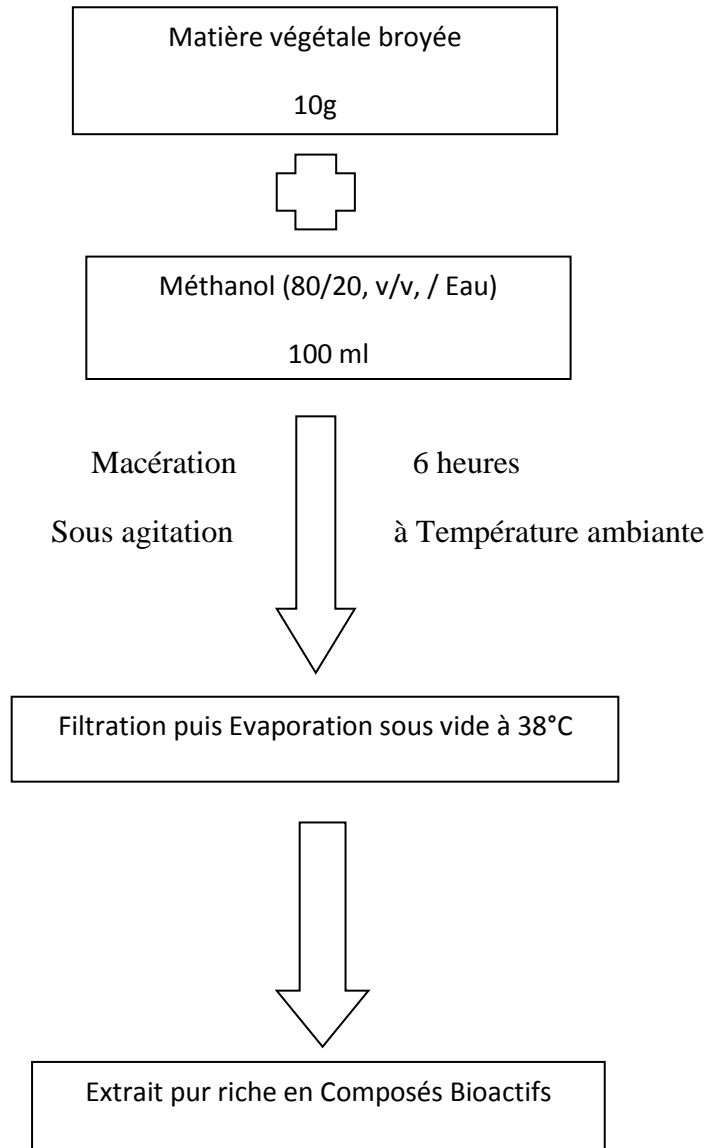
## **3-Extraction des composés bioactifs :**

L'extraction des principaux composés bioactifs contenus dans *Mentha pipérита* a été effectuée par la méthode décrite 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.

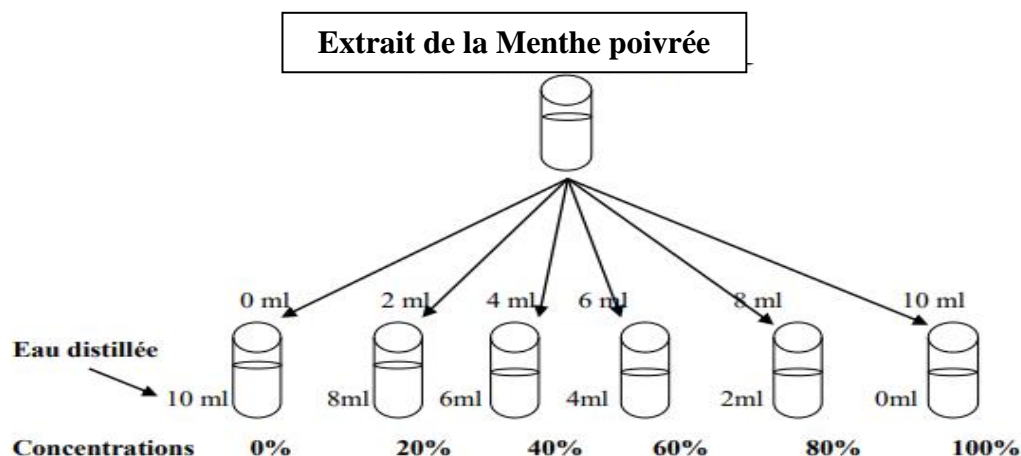
L'extraction des composés bioactifs de la plante a été réalisée par usage du méthanol comme solvant d'extraction. Elle a été effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g en triples répétitions de matière végétale broyée. Chaque échantillon de broyat de matière végétale est mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau, v / v). L'extraction par macération à froid de chaque mélange est laissée pendant 6 heures à température ambiante sous agitation, puis filtrée sur papier filtre Whatman ayant une porosité de 0,2µm. L'extrait pur est enfin obtenu après évaporation du filtrat sous vide à 38 °C au rota vapeur(BÜCHI).

## **4- Préparation des différentes solutions expérimentales :**

A partir de l'extrait pur de la menthe poivrée obtenu comme préalablement des solutions diluées à l'eau distillée à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100% ont été préparées ; ils représentent les solutions de travail à base de composée bioactifs de Menthe poivrée (**Figure 9**).



**Figure 08.** Etape d'extraction des composés phénoliques de *Mentha x pipéríta* L  
(Sultana et al. 2009).



**Figure 09.** Préparation des différentes solutions expérimentales.

### 5. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (Boizot et Charpentier, 2006).

La teneur des polyphénols contenus dans les extraits de la menthe poivrée a été déterminée suivant la méthode décrite par Miliauskas et al. (2004). Cette méthode consiste à mélanger un volume de 1 ml d'extrait avec 5 ml de Folin-Ciocalteu (2M) dilués 10 fois. Après 5 minutes d'incubation, 4 ml de carbonate de sodium à concentration de 75g/l ont été additionnés. Après une heure d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 765 nm contre un blanc (eau distillée) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Jenway 6715).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 100 µg/ml).

Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en milligramme équivalent standard (acide gallique) par millilitre d'extrait (mg EAG/ml), puis converties en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

### 6. Dosage des flavonoïdes :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika., 2005**).

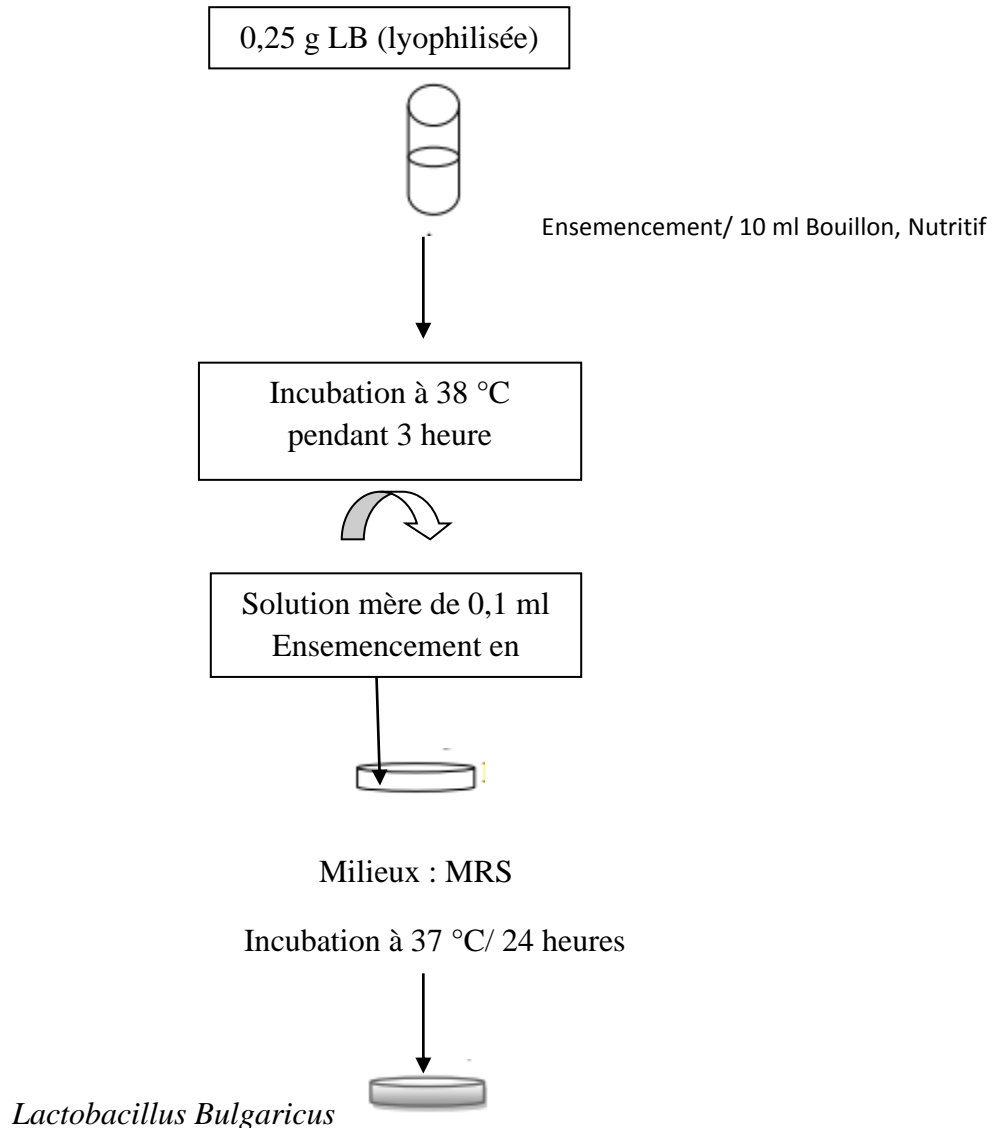
Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (**Zhishen et al., 1999** et **Kim et al., 2003**), avec quelques modifications. Cette méthode consiste à mélanger un volume de 1 ml d'extrait avec 0.3 ml de NaNO<sub>2</sub> à 5 %. Après 5 minutes, 0.3 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 10 % on été additionnés, et le milieu est mélangé vigoureusement. Après 6 minutes, un volume de 2 ml de NaOH à 1 M a été ajouté au milieu. L'absorbance est lue immédiatement à 510 nm contre le témoin. Une solution méthanolique de quercétine a été préparée. Des solutions filles préparées à partir de la solution mère à différentes concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en milligramme équivalent standard (quercétine) par millilitre d'extrait (mg EQ/ml), puis converties en milligramme équivalent aqyercetine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS). Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

## **7. Etudes des effets antimicrobiens de l'extrait de *Mentha pipérta* :**

### **7.1 Activation des inocula microbiens :**

L'étude a concerné la souche pure de référence et spécifiques du yaourt à savoir *Lactobacillus Bulgaricus*. Elle est tout d'abord activée avant l'utilisation expérimentale. Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée a été préalablement ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée à 37 °C durant 03 heures jusqu'à atteindre une densité optique de 0,9 au spectrophotomètre réglé à 560 nm. 0,1 ml de cette dernière solution est ensuite pris pour être ensemencé en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu spécifique gélosé de croissance pour l'espèce microbienne (MRS), puis le mélange est incubé à 38°C pendant 24 heures (**Figure 10**).



**Figure 10.** Activation de bactérie lactique *Lactobacillus Bulgaricus*

### 5-2 Méthode de contact direct :

Une colonie d'une culture jeune de l'espèce microbienne activée comme sur milieu solide gélosé spécifique est prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, est ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures.

A partir de cette dernière solution constituant l'inoculum bactérien, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant à  $10^{-5}$  pour l'espèce bactérienne étudiée *Lactobacillus Bulgaricus*.

Des prélèvements de 01 ml de la dernière dilution décimale ont été ensuite individuellement ajoutés à 09 ml de chaque extrait de menthe poivrée 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 boîtes de Pétri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance (MRS). La lecture du nombre de colonies développé est effectuée après incubation des milieuxensemencés à 38°C pendant 24 heures (**Bourgeois et Leveau, 1980**) (**Figure 11**).

### **5-3 Méthode des disques par diffusion sur gélose :**

Les disques ont été confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contaminations aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave. Une colonie d'espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a étéensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif ; ce mélange a constitué l'inoculum bactérien.

Des prises de volume de 0.2ml de cet inoculum bactérien ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MRS.

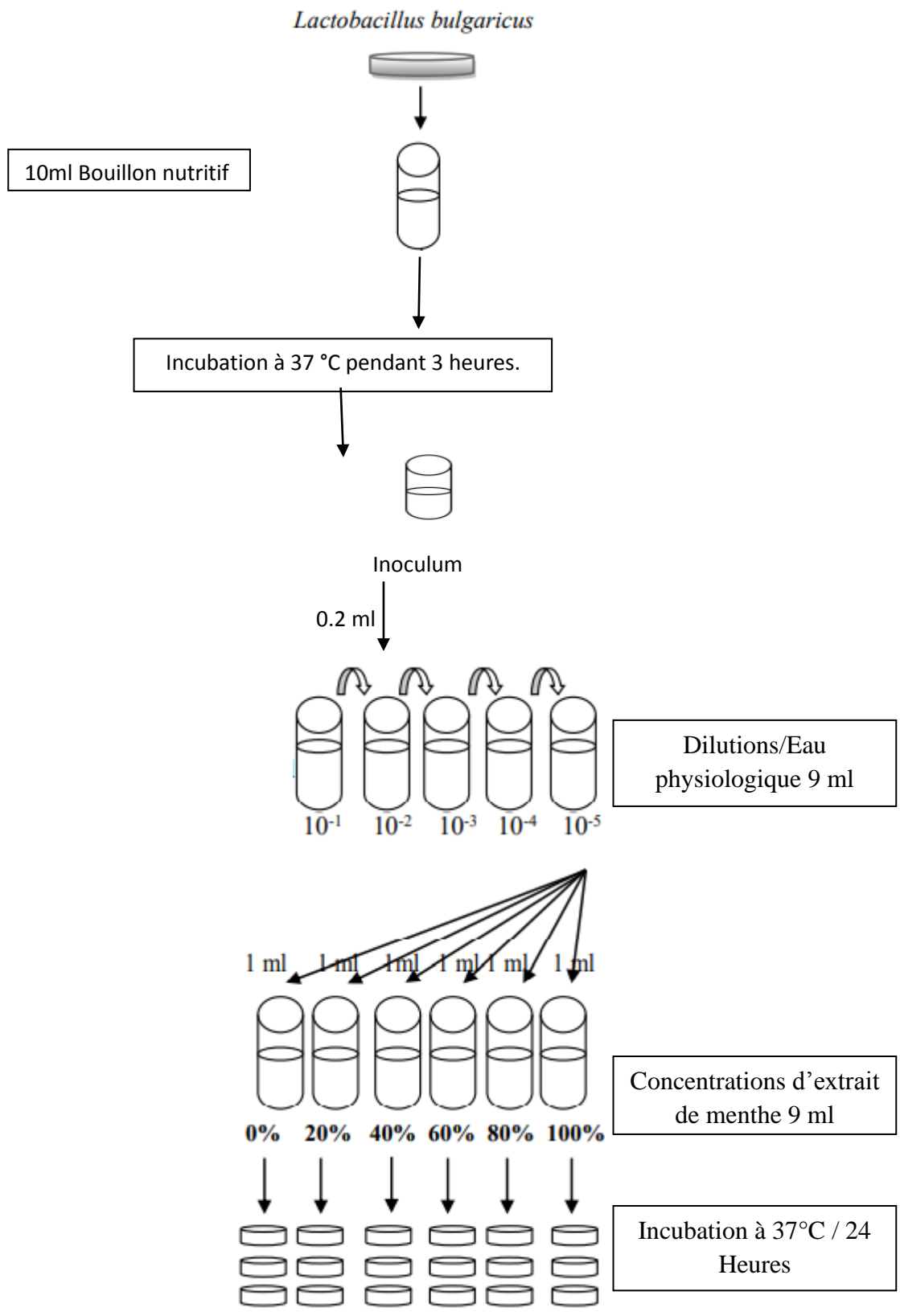
Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Gentamicine, ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé spécifiqueensemencé au germe *Lactobacillus Bulgaricus*. (**Prescott et al. , 2003**).

La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Pétri à 38°C pendant 24 heures (**Guignar, 1998**), (**Figure 11**).

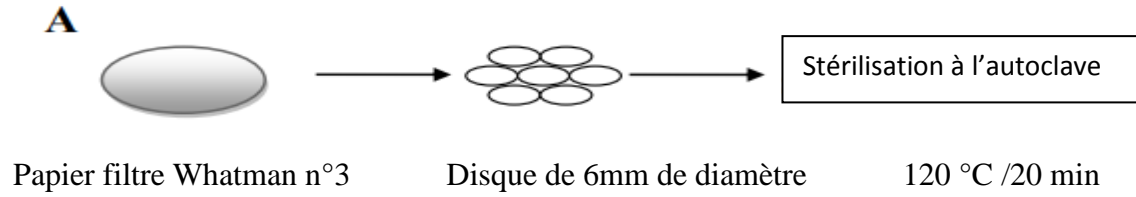
### **5-4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

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

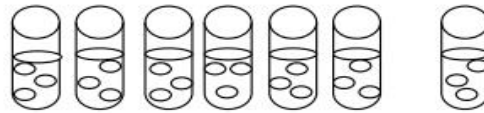
Dans le cas de notre étude, c'est les principes actifs des extraits de la matière végétale de la Menthe qui sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'espèce de germe spécifique du yaourt étudié ; *Lactobacillus bulgaricus*.



**Figure 11.** Méthode de contact direct. (Bourgeois et Leveau, 1980)



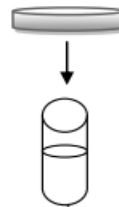
Trois disques ont été imbibés durant 5 minutes dans chaque solution d'extraction diluée avec l'eau distillée et dans la Gentamicine



0% 20% 40% 60% 80% 100% Gentamicine

**B**

*Lactobacillus bulgaricus*



Activation des colonies dans 10 ml de Bouillon Nutritif.

Incubation 37°C /3h  
Ensemencement en surface

Boîtes Pétri / milieu MRS



Trois disques de chaque extrait et de l'antibiotique sont déposés en surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu MRS, suivi d'une incubation à 38°C / 24 heures.

**Figure 12.** Méthode des disques par diffusion sur gélose. (Prescott et al., 2003).

Ainsi, une colonie jeune de *Lactobacillus bulgaricus* est prélevée à l'aide d'une anse à platine dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir l'inoculum. Des prises de 0.2 ml de chaque inoculum sont introduites respectivement dans 02 ml de chaque extrait dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton.

Les mélanges des tubes contenant les extraits de Menthe préparés à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie lactique sont ensuite incubés à 38°C pendant 18 à 24 heures (Moroh et al., 2008), (Figure.13).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI 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  $d_i$  est égale à  $df$  ( $d_i = df$ ).

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

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

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

**$d_i$**  : Densité optique dans la solution d'extrait ensemencée sans incubation.

**$df$**  : Densité optique dans la solution d'extrait ensemencée après incubation.

**$df - d_i$**  : Différence de densité optique dans la solution phénolique ensemencée avant et après incubation à 37°C durant 24 heures.

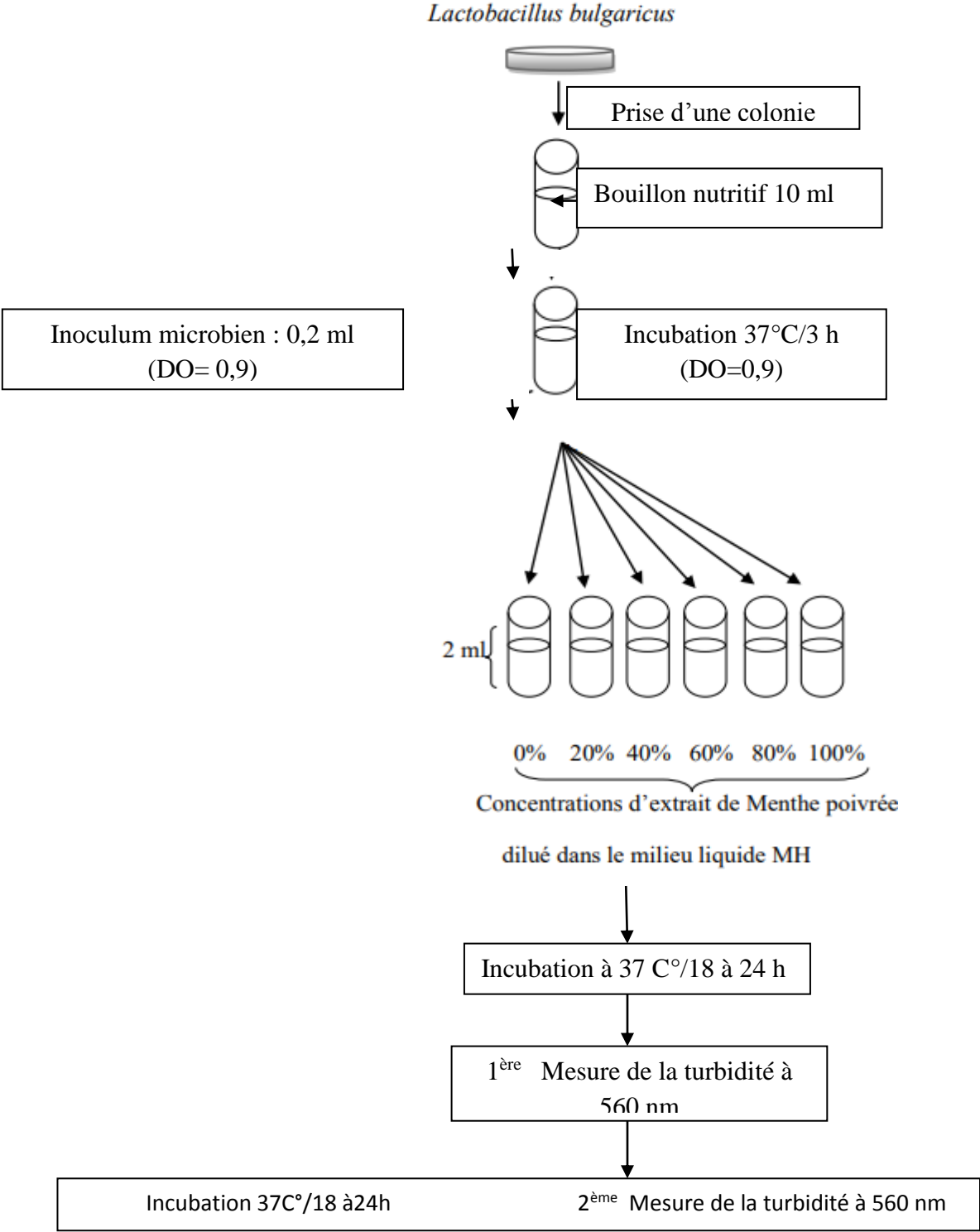
**$DF - DI$**  : Différence de densité optique dans la solution sans extrait de Menthe poivrée près ensemencement, avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (Kra et al., 2001 ; Zrihiet al., 2007).

### **5-5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :**

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

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à  $10^{-4}$ . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle est ensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 38°C pendant 24 heures. Le nombre de colonies de

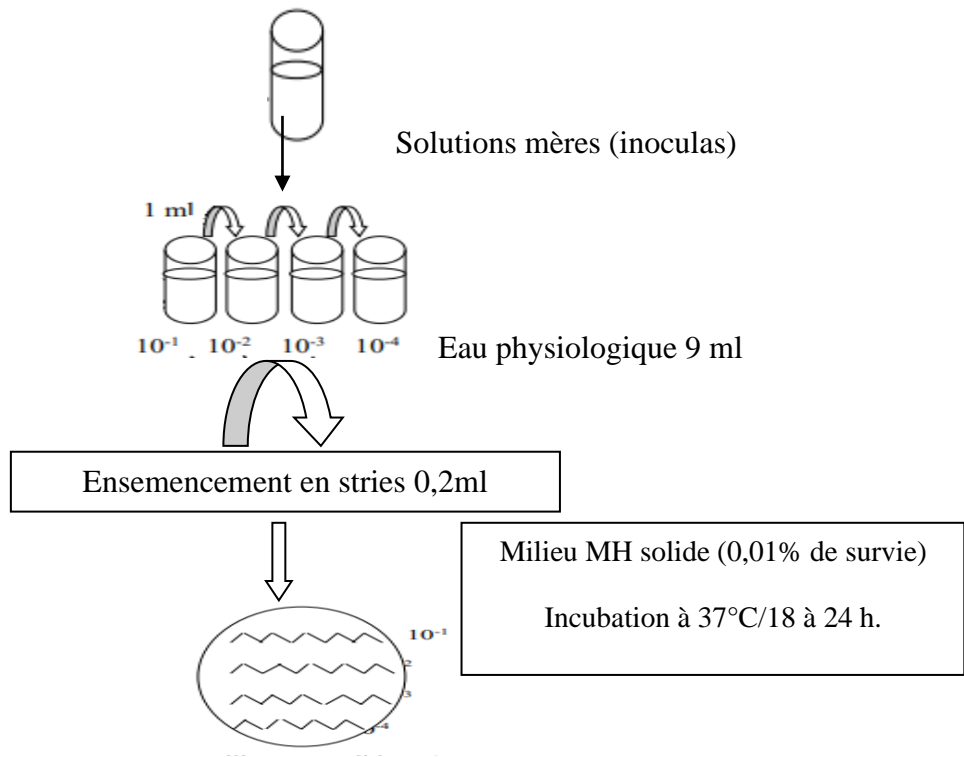
bactéries obtenu sur la strie de la dilution  $10^{-4}$  est comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, également ensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5cm et incubé à 38 °C durant 18 à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution  $10^{-4}$  correspondra à la CMB (**Figure. 14**).



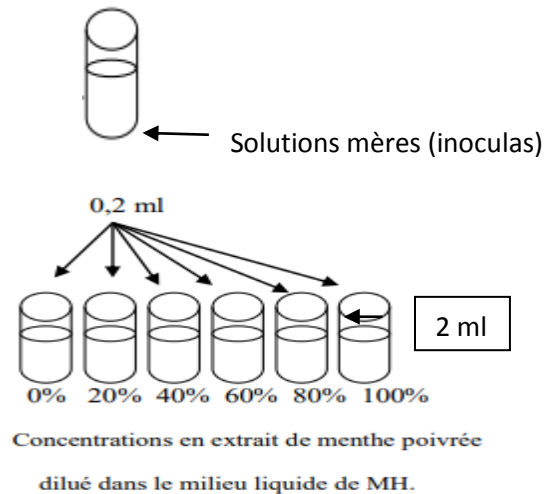


**Figure 13.** Détermination de la CMI (Moroh et al.,2008).

*Lactobacillus bulgaricus.*

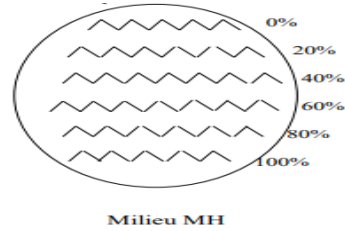


*Lactobacillus bulgaricus.*





### Ensemencement en stries



Incubation 37C°/18 à 24 h

**Figure 14.** Détermination de la CMB. (Moroh et al., 2008).

### 6. Traitement statistique :

Les résultats ont été traités statistiquement par une analyse de variance monofactorielle en randomisation totale suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de **NEWMAN** et **KEULS**. Le logiciel statistique utilisé dans le traitement des données est le STAT BOX 6 .4.L'effet du traitement a été apprécié aux deux seuils de probabilités  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ .

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

## 1-Résultats :

### 1.1. Composés phénoliques et flavonoïdes :

Les teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait hydro-méthanolique et de la matière sèche de *Mentha piperita*.L., sont représentés dans le (**Tableau 3**).

L'extrait hydrométhanolique de *Mentha piperita* L., s'est avéré très riche en composés phénoliques (39.48 mgEAG/ml d'extrait) et relativement pauvre en flavonoïdes (00.47 mgEQ/ml d'extrait).

Les concentrations en ces composés retrouvées dans la matière végétale de la menthe poivrée ont été évaluées respectivement à 394.80 mgEAG/g MS et à 04.70 mgEQ/g MS, en moyenne.

**Tableau 3.** Teneurs en principaux composés phénoliques et flavonoïdes de l'extrait hydro-méthanolique et de la matière sèche de *Mentha piperita*.L.

<b>Polyphénols</b>		<b>Flavonoïdes</b>	
mgEAG/ml d'extrait	mgEAG/g MS	mgEQ/ml d'extrait	mgEQ/g MS
39.48	394.80	0.47	04.70
±	±	±	±
01.20	09.30	00.01	00.20

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

### 1.2 Effet antimicrobien :

Les effets antimicrobiens de l'extrait hydro- méthanolique de *Mentha piperita*.L sur le germe *Lactobacillus bulgaricus* caractéristique du yaourt sont représentés dans le (**Tablrau 4**).

En fonction des concentrations d'extrait hydrométhanolique de *Mentha piperita* L., variables de 0, à 20, 40, 60, 80 et 100 la prolifération du germe *Lactobacillus bulgaricus* a tendance à diminué significativement ( $p < 0.01$ ) de  $223 \cdot 10^5$ , à  $153 \cdot 10^5$ , à  $63 \cdot 10^5$ , à  $28 \cdot 10^5$ , à  $11 \cdot 10^5$  et à  $0 \cdot 10^5$  UFC /ml.

Aucun diamètre d'inhibition de l'espèce bactérienne étudiée n'a été enregistré avec les solutions d'extrait préparées à 20 et 40%. Cependant, des diamètres d'inhibition de l'ordre de 2, 17.7 et 23.5 mm ont été développée chez l'espèce *Lactobacillus bulgaricus* respectivement avec les solutions d'extrait de la plante concentrées à 60, 80 et 100 %. Comparativement à ces solutions d'extrait de la menthe poivrée, la gentamicine a accusé le plus grande ( $p < 0.01$ ) zone d'inhibition vis-à-vis du germe lactique spécifique du yaourt ; 39 mm, en moyenne.

Par ailleurs la concentration minimale inhibitrice chez *Lactobacillus bulgaricus* a été réalisée avec l'extrait de *Mentha piperita* L concentré à 40% ; alors que la concentration minimale bactéricide a été observée à une concentration plus élevée de 60%.

Enfin, il apparait que l'extrait de la menthe poivrée exerce un effet inhibiteur de type bactéricide contre l'espèce bactérienne étudiée.

**Tableau 2.** Effets antimicrobiens de l'extrait hydro- méthanolique de *Mentha piperita.L* sur le germe *Lactobacillus bulgaricus* caractéristique du yaourt.

	Mesure	Concentration en extrait Hydro-éthanolique de <i>Mentha piperita.L</i> (%)						Effet de l'extrait
		Témoin	20%	40%	60%	80%	100%	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Test de croissance ( $10^5$ UFC/ml)	223 <sup>a</sup>	153 <sup>b</sup>	63 <sup>c</sup>	28 <sup>c</sup>	11 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	$p < 0,01$
	Diamètre d'inhibition (mm)	39 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	2 <sup>d</sup>	17.7 <sup>c</sup>	23.5 <sup>b</sup>	$p < 0,01$
	Taux d'inhibition (%)	100 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	5.1 <sup>d</sup>	45.3 <sup>c</sup>	59.8 <sup>d</sup>	$p < 0,01$
	CMI	40%						
	CMB	60%						
	CMB/CMI	1,5						
	Effet inhibiteur	Bactéricide						

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

## 2- Discussion :

D'après les tests antimicrobiennes préliminaires effectués, il peut être supposé que les taux de croissance de germe *Lactobacillus bulgaricus* varient d'une façon inversement proportionnelle en fonction de la concentration d'extrait hydro-méthanolique de *Mentha pipérита L*; plus la concentration de l'extrait de la plante augmente de 0 ,à 20 , à 40 , à 60 ; à 80 et 100% plus le taux de croissance de *Lactobacillus bulgaricus* diminue et plus le taux d'inhibition de ces germes augmente.

L'efficacité de l'extrait hydrométhanolique pur de *Mentha piperita L.*, a inhibé la prolifération de souche spécifique du yaourt à été vérifiée également par la méthode des disques dont le diamètre d'inhibition enregistré chez *Lactobacillus bulgaricus* de 23.5 mm étaient proche à 63% de la gentamicine ; antibiotique à large spectre (**Brut, 2004 et Skandamis et al., 2001**)

L'analyse de la CMI et la CMB à aussi ont montré que les germe *Lactobacillus bulgaricus* sont très sensibles à l'extrait hydro-méthanolique de *Mentha pipérита L* qui a exercé un effet de type bactéricide vis-à-vis du germe *Lactobacillus bulgaricus*.

Les travaux de (**Andamis , 2001**) ont révélé que 29% des extraits de la *Menthe Poivrée* testés soit à l'eau ou aux solvants organiques dont l'éthanol et le méthanol notamment ont présenté au faite de fortes activités antimicrobiennes contre les bactéries Gram (+) ; alors que seulement 13% des extraits étaient actifs contre les souches à Gram (-).

La menthe poivrée (*Mentha Pipérита L*) est en effet une source de plusieurs composés très intéressantes pour l'activité antimicrobiennes ; ils sont représentés surtout par les flavonoïdes, les aides phénoliques, les tannins, hétérosides d'aspégénine, la diosmétine, la tuteoline, le flavone polyméthosite, l'eugénol, l'acide caféique et l'acide rosmarinique (**Brut, 2004 ; Skandamis et al., 2001 et Arumugam et al., 2009**).

Le méthanol aqueux utilisé comme solvant d'extraction des principaux composés phénoliques de la plante objet de l'étude à permis d'avoir par macération selon la méthode de (**Soltana et al., 2009**) un extrait riche en composés phénoliques à fort pouvoir antimicrobien.

L'activité antimicrobienne de ces composés résulte probablement d'une combinaison de plusieurs modes d'actions, impliquant différents cibles cellulaires (**Brut, 2004 et Skandamis et al., 2001**).

Cette action des composés phénoliques sur les cellules des microorganismes est basée sur une multiplicité d'influences incluant la synthèse des protéines, agissant sur l'ADN ainsi que les activités enzymatiques de la bactérie (**Lucket al., 1995**). Celles-ci n'impliquent pas seulement un mécanisme physique ; mais aussi chimique et biochimique.

Les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leurs toxicités vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de cette toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéase et hydrolase) ou à d'autres interactions susceptibles d'inactiver les protéines de transports, et de lyser la paroi cellulaire (**Cowan, 1999**).

# **Conclusion générale**

# Conclusion

Au terme de cette étude et à la lumière des résultats obtenus il est prouvé que l'extrait hydrométhanolique de *Mentha pipérta* L (menthe poivrée) , collecté à Mostaganem riche en principaux composés phénoliques ,exerce une fort activité antimicrobienne de type bactéricide vis-à-vis du germe spécifique du yaourt : *Lactobacillus bulgaricus*.

L'effet antimicrobien de l'extrait de la plante a montré toute fois, qu'il est possible de l'incorporer dans les préparations lactières des lait fermentés et dérivés du lait à une concentration de moins de 20% sans affecter remarquablement la ptolifération des *Lactobacillus bulgaricus*.

En perspective, il est souhaitable de reconduire cette étude afin de confirmer les résultats trouvés. Il serait intéressant, aussi, d'étudier le profil des composés phénoliques de l'extrait afin de connaitre exactement les principes actifs qui affectent ou pas la croissance de germe spécifique du yaourt. Un essai de toxicité dans le cas de cette étude s'impose avant de proposer son utilisation à l'échelle industrielle.

## **Références bibliographiques:**

## Référence :

**AÏLI. S, CARAFFA .N, et PERROTI C; 1999-** Se soigne par les plantes. BERTI Edition p59.

**ABBANI B et ABDE-LALI Y ; 2005-**contribution a l'étude de la qualité des eaux phréatiques sur l'état de dégradation de la palmeraie cuvette de Mostaganem Ing, Eco, merche.p141.

**ARRIGNON. J; 1987-** Agro écologie des zones arides et subhumide Edition Maison neuve et ACCT. France. 283 p.

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

**Bagnouls. F et Gausсен. H. 1953.** Saison sèche et indice xérothermique. Ball. Soc.Hist- Nat, Toulouse pp 193-239.

**BEKKARI. A et BENZAOUI. S ; 1991-** Contribution à l'étude de la faune des palmeraies de deux régions du Sud-Est Algérien (Ouargla, Djamaa). thèse: Ing, Agro, Sahar, ITAS.Ouargla 109 p.

**BELOUED. A ; 2001-** Plantes médicinales d'Algérie. Edition: O.P.U.ELHARRACH.Alger 274 p.

**BENSETTI. A et HACINI. H ; 2005-**Contribution à l'étude phytoécologique des plantes médicinales dans la région de Ouargla. Thèse I.E.B Ouargla. P22.

**BRUNETON. J ; 1999-** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Edition.Paris pp 533-536.

**CASTANY. G; 1982-** Principes et méthodes de l'hydrogéologie. Ed DUNOD. Paris 233p.

**DANIEL. J, RODOLPHE – EDOUARD. S, VINCENT V.S; 2002-** Botanique systématiques des plantes à fleurs (Collection biologique). 2<sup>ème</sup> Edition. PPUR. 328 p.

**Daoud. I et Halitim. A. 1994-** Irrigation et salinisation au Sahara Algérien. Sécheresse., 5(3) : 151-160.

**DEMOLON. A; 1968-** principe d'agronomie, croissance des végétaux cultivés. Tome II 6<sup>ème</sup> Ed DUNOD. Paris 590 p.

**ABDALLI et all .2017 :** Effets antimicrobiens de l'extrait à l'Eau de *Thymus vulgaris* (Thym) récolté dans la région de Naama sur la croissance des germes spécifiques du yaourt : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. mémoire de fin d'étude.

**KORICHI Sliman (2006)** : mémoire de fin d'étude *En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Sciences Biologiques.Filière Ecologie Végétale et Environnement*

**Affer .M, Bouziane.T, 2013.** L'effet de l'incorporation de la farine de pois chiche sur le lait fermenté type yaourt.

**Belkadi.F, Belmaaziz. S, 2015.** Effet des extraits de thym (*thymus vulgaris*) sur la qualité d'un lait fermenté alicament type yaourt étuvé au cours de la conservation.

**Bourgeois. CM, Larpent.J.P, 1996.** Microbiologie alimentaire, Aliments fermentés et fermentation alimentaires, 2e édition, Lavoisier TEC, DOC.

**Beladem.K, 2015.** Effet des extraits de Menthe (*Mentha piperita*) sur la qualité d'un lait fermenté alicament type yaourt étuvé au cours de sa conservation

**Driessen. F.M, 1982.** Evedence that *Lactobacillus* in yaourt is stimulated by carbon produced by *Streptococcus thermophilus* mill. Dairy journal., 22 : 134-144.

**Ghalem.K, 2014.** L'effet de variation des doses de jus de citron sur la qualité physico-chimique, microbiologique et organoleptique d'un lait fermenté type yaourt étuvé.

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

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

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

**ANONYME. (1992).** Norme Internationale ISO 5492. Analyse sensorielle ; contrôle de la qualité des produits alimentaires. AFNOR.

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

**BARTHÉLÉMY J. (1998).** Evaluation d'une grandeur sensorielle complexe : description quantifiée. In : « Evaluation Sensorielles ». 2ème éd. Tec&Doc. Lavoisier, Paris. 149-169.

**BERGAMAIER D. (2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *lactobacillus rhamnosus* RW-959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de Doctorat, Université de Laval, Canada.

**BILIADERIS C.G., KHAN M.M. et BLANK G. (1992).** Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates. *International Dairy Journal*, 2, 311-323.

**Bourgeois, C., M., Leveau, J., Y. 1980.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique, Collection Sciences et techniques agroalimentaires, 331p.

**BOUSBIA N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie).

**CAMPBELL L.B. and PAVLASEK S.J. (1987).** Dairy products as ingredients in chocolate and confections. Food Technology, 41 (10), 78-85.

**CALLIER P. (2001).** Traité d'Evaluation Sensorielle. Urdapilleta I., Ton Nu C., Saint Denis C. et Huon de Kermade C, F. (Eds), Dunod, Paris. 363-391.

**L.Lagnika,** "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises" Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2005, page : 249.

**J.Zhishen, T.Mengcheng, W.Jianming,** "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals" J Food Chem, 1999, Vol. (64), page : 555.