



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par : Rahmania Fatima

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

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

Effet de l'utilisation de l'huile essentielle de la menthe verte dans la mousse au chocolat sur la croissance des *Staphylococcus aureus*.

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mr Djoukhdoum L	MAA	Président
Mm Zamoum M	MCA	Examineur
Mr Houicher A	MCA	Rapporteur

Promotion : Septembre – 2020

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: رحمانية فاطمة

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

تأثير استخدام الزيت المستخلص للنعناع في مَوس الشوكولاتة على نمو *Staphylococcus aureus*

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيد جخدم العيد	أستاذ مساعد "أ"	رئيسا
السيدة زعموم ميادة	أستاذة محاضرة "أ"	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	أستاذ محاضر "أ"	مقررا

الدفعة: سبتمبر -2020

Résumé

Nom et Prénom : Rahmania Fatima

Thème : Effet de l'utilisation de l'huile essentielle de la menthe verte dans la mousse au chocolat sur la croissance des *Staphylococcus aureus*.

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de *Mentha spicata*, et d'évaluer la croissance de *Staphylococcus aureus* inoculée dans la mousse au chocolat ainsi que les charges des germes aérobies mésophiles et psychrotrophes après l'addition de différentes concentrations de l'huile de la menthe verte (0.2 et 0.4%) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive. Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *M. spicata* est de 0.9 % (w/w). L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis d'identifier 4 composés majoritaires qui sont : Carvone (53%), D-limonène (16.9%), Eucalyptol (8.9%) et Terpinène-4-ol (2.7%). L'addition de l'HE de *M. spicata* a montré une nette réduction de la croissance de *S. aureus* dans la mousse au chocolat pendant toute la durée de stockage, par rapport au témoin. De plus, cette huile a effectivement réduit la croissance des germes totaux et inhibé la croissance des germes psychrotrophes dans la mousse au chocolat sans montrer d'effets notables entre les concentrations de l'HE et/ou les conditions de stockage. L'étude présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose l'application de l'HE de *M. spicata* comme alternative aux additifs synthétiques dans les produits de pâtisserie pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et améliorer la qualité des produits.

Mots clés : *Mentha spicata*; Huile essentielle; *Staphylococcus aureus*; Mousse au chocolat; Température abusive

Name and surname: Rahmania Fatima

Theme: Effect of using spearmint essential oil in chocolate mousse on the growth of *Staphylococcus aureus*.

Abstract:

The aim of this work is to study the chemical composition of the essential oil (EO) of *Mentha spicata*, and to evaluate the growth of *Staphylococcus aureus* inoculated into chocolate mousse as well as the loads of aerobic mesophilic and psychrotrophic germs after the addition of different concentrations of spearmint oil (0.2 and 0.4%) during its storage at 4 °C and at abused temperature. The essential oil yield of the aerial part of *M. spicata* is 0.9% (w/w). The analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) allowed the identification of 4 major compounds which are: Carvone (53%), D-limonene (16.9%), Eucalyptol (8.9%) and Terpinen-4-ol (2.7%). The addition of EO from *M. spicata* showed a clear reduction in the growth of *S. aureus* in the chocolate mousse throughout the storage period, compared to the control. In addition, this oil effectively reduced the growth of aerobic mesophilic germs and inhibited the growth of psychrotrophic germs in the chocolate mousse without showing any noticeable effects between EO concentrations and/or storage conditions. The study is of great interest to the food industry as it proposes the application of EO from *M. spicata* as an alternative to synthetic additives in pastry products to control foodborne pathogens and improve product quality.

Keywords: *Mentha spicata*; Essential oil; *Staphylococcus aureus*; Chocolate mousse; Abused temperature

الاسم و اللقب : رحمانية فاطمة

الموضوع: تأثير استخدام الزيت المستخلص للنعناع في مَوس الشوكولاتة على نمو *Staphylococcus aureus*

الملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التركيب الكيميائي للزيت العطري (*Mentha spicata* L.) ، و تقييم نمو *Staphylococcus aureus* المزروعة في مَوس الشوكولاتة و كذلك *germes aérobies mésophiles* و *psychrotrophes* بعد إضافة تراكيز مختلفة من زيت النعناع (0.2 و 0.4%) أثناء تخزينه عند 4 درجات مئوية و درجة حرارة المذبذبة. محصول الزيت العطري للجزء الهوائي من *Mentha spicata* هو (0.9%) (w/w). نتائج التحليل اللوني للغاز الى جانب قياس الطيف الكتلي (GC / MS) حددت مكونات 4 رئيسية هي : Carvone (53%)، و D-limonene (16.9%) و Eucalyptol (8.9%) و Terpinen-4-ol (2.7%). أظهرت إضافة زيت العطري *Mentha spicata* انخفاضًا ملحوظًا في نمو *Staphylococcus aureus* في مَوس الشوكولاتة طوال فترة التخزين ، مقارنةً بالشاهد. بالإضافة إلى ذلك ، قلل هذا الزيت بشكل فعال من نمو *germes aérobies mésophiles* وأعاق نمو *psychrotrophes* في مَوس الشوكولاتة دون إظهار تأثيرات ملحوظة بين تركيزات مختلفة للزيت العطري أو ظروف التخزين. تحظى الدراسة باهتمام كبير في صناعة الأغذية لأنها تقترح تطبيق الزيت العطري *Mentha spicata* كبديل للإضافات الاصطناعية في منتجات المعجنات للسيطرة على مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء وتحسين جودة منتجات.

الكلمات الرئيسية : *Mentha spicata* ؛ الزيت العطري ؛ *Staphylococcus aureus* ؛ مَوس الشوكولاتة ؛ درجة حرارة المذبذبة

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la santé, le courage et les moyens pour suivre nos études et la volonté, la patience et la chance pour la réalisation de ce travail.

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

Nous remercions également :

Dr. Djoukhdoum Laid pour avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Dr. Zamoum Miyada pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont aussi à :

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

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail avant tout à mes chères parents, qui ont tout sacrifié pour mon bien et qui ont éclairé ma route par leur compréhension, leur soutien. Je souhaite que dieu les garde en bonne et parfaite santé et leur donne une longue vie.

A mes amis Safia G et Bouchra O

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

(Promotion 2019- 2020)

Fatima

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Sommaire.....	I
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures	I
Liste des abréviations.....	II
Introduction.....	1
Partie I Etude bibliographique	
Chapitre I Produits Pâtisiers	4
1.1 Définition des pâtisseries	4
1.2. Composition de la pâtisserie	4
1.3. Les types de produits pâtissier.....	5
1.3.1. Pâtisserie artisanale	5
1.3.2. Pâtisserie industrielle	5
1.4. La mousse au chocolat	5
1.5. Hygiène de pâtissier	6
1.5.1. Les risques de pâtisseries	6
1.5.2. Hygiène de préparation	7
1.6. Les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries	8
Chapitre II : Généralité sur <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.1. Histoire	9
2.2. Habitat	9
2.3. Taxonomie.....	9
2.4. Caractères bactériologiques.....	10
2.4.1. Caractères morphologiques.....	10

2.4.2. Caractères culturels.....	11
2.5. Toxines de staphylococciques	12
2.2. 2.6. Toxi-infection alimentaire staphylococcique	13
2.7. Facteurs influençant la croissance et la production d'enterotoxine staphylococciques par <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.9.1. Température	14
2.9.2. pH.....	14
2.9.3. L'activité de l'eau	14
2.9.4. Condition de l'atmosphère	15
Chapitre III : Les Huiles Essentielles	16
3.1. Définition	16
3.2. Composition chimique	16
3.3. Propriétés des huiles essentielles.....	16
3.3.1. Propriétés physiques.....	16
3.3.2. Propriétés chimiques.....	16
3.3.3. Propriétés organoleptiques	17
3.4. Activité biologique des huiles essentielles.....	17
3.5. Utilisation des huiles essentielles.....	17
3.5.1. En pharmaceutique.....	17
3.5.2. En cosmétologie.....	18
3.5.3. En industries agroalimentaires.....	18
3.6. Généralités sur <i>Mentha spicata L.</i>	18
3.6.2. Description.....	18
3.6.3. Classification.....	19
3.6.4. Les huiles essentielles de <i>Mentha spicata L.</i>	19

3.6.5. Utilisation des huiles essentielle de menthe verte.....	20
--	----

Partie II : Etude expérimental

Chapitre IV: Matériel et méthodes

4.1 Objectif	21
4.2. Matériel végétal.....	21
4.3. Hydrodistillation.....	22
4.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle.....	23
4.5. Matériel biologique.....	23
4.6. Préparation de la mousse au chocolat.....	24
4.7. Incorporation de l'huile essentielle et l'inoculum de <i>Staphylococcus aureus</i> dans la mousse au chocolat.....	25
4.8. Analyse bactériologique.....	26
4.8.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales.....	26
4.8.2. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	27
4.8.3. Dénombrement des germes aérobies totaux.....	27
4.8.4. Dénombrement des germes Psychrotrophes.....	28
4.8.5. Calcul des charges bactériennes.....	28

Chapitre V: Résultats et discussion

5.1. Les rendements et composition chimique de l'huile essentielle de <i>M. spicata</i>	29
5.2. Résultats d'analyse bactériologiques.....	31
5.3. Dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i>	32
5.4. Dénombrement des germes aérobies à 30°C.....	33
5.5. Dénombrement des germes psychrotrophes.....	35
5.6. Discussion.....	36
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries	8
Tableau 2	Différenciation des espèces et sous espèces de Staphylocoques à coagulase positive	12
Tableau 3 :	les toxines produites par le staphylocoque doré	12
Tableau 4 :	Facteurs permettant la croissance et la production d'enterotoxine par <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Tableau 5	Propriétés organoleptiques des HE de <i>Mentha spicata</i> obtenu et celle de la norme ANFOR 2000	29
Tableau 6	Les principaux composés de l'huile essentielle de <i>M. spicata</i>	30
Tableau 7	Résultats d'analyse bactériologiques de la mousse au chocolat inoculée par <i>S. aureus</i> et traitée par l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	31

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Exemple de pâtisseries	4
Figure 2	la mousse au chocolat	6
Figure 3	Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique	11
Figure 4	la menthe verte <i>Mentha spicata</i> L	19
Figure 5	Localisation géographique la zone de Bordj Senouci, site de récolte de la menthe verte	21
Figure 6	La menthe verte (<i>Mentha spicata</i>) séchée	14
Figure 7	Montage d'un hydrodistillateur de type Clevenger	20
Figure 8	Spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK)	23
Figure 9	La mousse au chocolat	25
Figure 10	Diagramme d'incorporation de l'HEde <i>M spicata</i> et l'inoculum de <i>S. aureus</i> dans la mousse au chocolat	26
Figure 11	Préparation de la solution mère et des dilutions décimales	28
Figure 12	Huile essentielle de la menthe verte	26
Figure 13	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>M. spicata</i> obtenu par CG-SM	27
Figure 14	Aspect de <i>staphylococcus aureus</i> sur milieu Baird Parker	32
Figure 15	Courbe de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> durant la période de conservation de la mousse au chocolat	33
Figure 16	Résultats de germes aérobies totaux sur milieu PCA	33
Figure 17	Courbe de croissance des germes aérobies mésophiles totale durant la période de conservation de la mousse au chocolat	34
Figure 18	Courbe de croissance des germes psychrotrophes durant la période de conservation de la mousse au chocolat	35

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations	Signification
AFNOR	Association française de normalisation
ES	Enterotoxine staphylococciques
ESA	Enterotoxine staphylococciques A
ESB	Enterotoxine staphylococciques B
ESD	Enterotoxine staphylococciques D
ETS	Epidermolyses toxiques staphylococcique du nouveau-né
SCT	Syndromes du choc toxique
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
HE	Huile essentielle
ICMSF	International Commition on Microbiological Spicification for Food
AFSCA	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les produits pâtisseries particulièrement les crèmes pâtisseries sont l'une des causes d'intoxication alimentaire les plus répandues chez l'homme. La mousse au chocolat est l'un des desserts français classiques les plus célèbres qui occupe une partie intéressante du marché alimentaire. Les produits pâtisseries sont généralement contaminés par des agents pathogènes bien connus (notamment *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et des levures) et constituent un bon milieu nutritif pour le développement de ces agents d'origine alimentaire (**Alamoti et al., 2016**). La source de cette contaminations est constituée principalement par la main d'œuvre, la matière première (lait, œufs, farine, matière grasse...ect) et la non-conformité aux normes d'hygiène alimentaire durant le processus de production. Les produits laitiers et les œufs sont un bon milieu pour la croissance des bactéries et s'ils ont été fabriqués ou conservés dans de mauvaises conditions, et peuvent entraîner par conséquent la détérioration des produits pâtisseries (**Asadi et al., 2015**).

Le staphylocoque doré ou *Staphylococcus aureus* est une source constante d'infections, parfois mortelles, qui accompagnent l'homme au quotidien. L'intoxication alimentaire par staphylocoque est un problème majeur dans les programmes de santé publique du monde entier. Les modèles prédictifs de la croissance de *S. aureus* et de la production de l'enterotoxine staphylococciques (ES) seraient des outils puissants pour la détection des microbes. L'évaluation du risque microbien pour *S. aureus* repose sur le l'identification et la quantification des isolats positifs à la coagulas dans les produits finis (**Le Loiret al., 2003 ; Le Loiret al., 2010**) et le contrôle de cet agent dans les produits alimentaires devient une préoccupation majeur dans la politique de santé publique. Pour cet effet, des produits naturels tels que les extraits de plantes aromatiques (huiles essentielles et extraits ethnoliques) ont été ajoutés comme alternatives aux additifs synthétiques pour inhiber la croissance de pathogènes d'origine alimentaire (**Gyawali et Ibrahim, 2014**).

La menthe verte est une herbe populaire, elle a été utilisée pour donner du goût, conserver des aliments et comme médicament traditionnel. La menthe verte et l'huile de menthe verte peuvent être utilisées comme antibactérien, antifongique et antiseptique (**Sulieman et al., 2011**). L'utilisation d'huiles essentielles dans les aliments en tant que conservateurs est limitée en raison de l'odeur et du goût forts de ces substances lorsqu'elles

sont utilisées à des doses efficaces. Cette efficacité est diminuée lorsqu'elles sont ajoutées à des matrices alimentaires compliquées par rapport aux milieux de culture microbiologiques (Soković, 2007).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*, et d'évaluer leur effet sur la croissance de *S. aureus* inoculée dans la mousse au chocolat ainsi que les charges des germes aérobies mésophiles et psychrotrophes après l'addition de différentes concentrations (0.2 et 0.4%) de cette huile durant son stockage réfrigéré et à la température abusive.

Le contenu de ce travail comprend deux grandes parties, la première partie est consacrée à l'étude bibliographique qui est scindée en trois chapitres :

- des généralités sur les produits pâtisseries et leur risque sanitaire ;
- des données bibliographiques sur la bactérie *Staphylococcus aureus* et les toxico-infections à staphylocoques,
- une synthèse sur les huiles essentielles notamment l'huile de menthe verte (*Mantha spicata* L.).

La deuxième partie ou la partie expérimentale s'intéresse au matériel et aux méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, et traite les différents résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que leur discussion. Enfin, ce travail est terminé par une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE I :
PRODUITS PATISSIERS

CHAPITRE I : PRODUITS PATISSIERS

1.1 Définition des pâtisseries

On appelle « pâtisserie » l'ensemble des préparations sucrées ou salées nécessitant la présence d'une pâte comme support ou comme enveloppe et généralement cuite au four (Neyrat *et al.*, 2006).

La pâtisserie c'est un dessert plaisir, elle est une discipline majeure de l'art culinaire, qui repose sur la préparation, l'élaboration, la fabrication, le service aux consommateurs (Figure1) (Bellec *et al.*, 2009).



Figure 1 : Exemple de pâtisseries (Lenotre, 2006)

1.2. Composition de la pâtisserie

Les pâtisseries sont essentiellement à base de farine, sucre, œufs, l'eau, et la graisse ou l'huile (Wilderjans *et al.*, 2013) selon les recettes, et d'autres ingrédients en quantité variable tels que le lait en poudre, l'amidon, le sel, l'acide citrique et les assaisonnements. Après cuisson et répartition dans des tubes à pâtisserie ou des coquilles d'œufs, on peut ajouter du glaçage au chocolat ou à la vanille (ICMSF, 2012).

1.3. Les types de produits pâtisseries

1.3.1. Pâtisserie artisanale

Le produit pâtissier artisanal est non industrialisé, il est le fait d'un artisan qui transforme des matières premières, qu'elles soient végétales, animales ou minérales. La production artisanale est de petit volume (**Kigeret et al., 1968**).

1.3.2. Pâtisserie industrielle

La pâtisserie industrielle est définie comme un produit non nécessairement parfait, mais pratique et facile à manipuler, que retrouver les produits moussés (le gâteau des anges et le gâteau éponge), les produits à pâte liquide (les pâtisseries individuelles), les produits à pâte semi-ferme (les tartes et tartelettes, les gâteaux aux fruits) et les produits à pâte ferme comme les feuilletés (**Bourdeau et al., 1992**).

1.4. La mousse au chocolat

Une mousse est un dessert à base de crème fouettée surgelée avec des fruits et des noix, elle ne nécessite pas, battement pendant la congélation et est souvent mis dans un moule, qui peut être démoulé, décoré, et apporté à la table pour un dessert festif (Figure 2) (**Ensminger et al., 1993**).

La texture finale d'une mousse doit être légère et aérée, ce qui peut être obtenu par l'utilisation de mousses d'œufs et de crème fouettée. Certaines applications utilisent les deux, tandis que d'autres n'en utilisent qu'une seule. Les aérateurs peuvent avoir un impact sur la saveur, la consistance et la stabilité de la mousse (**Chelbana, 2013**).

La mousse au chocolat peut être préparée avec de la crème fouettée sucrée au chocolat. La crème fouettée est l'aérateur le plus courant et se trouve dans la plupart des mousses. Lors de la fabrication de la crème fouettée, l'air est emprisonné entre les particules de graisse. La température optimale pour fouetter la crème est de 5°C (**Chelbana, 2013**).



Figure 2 : la mousse au chocolat (This, 2008).

1.5. Hygiène de pâtissier

1.5.1. Les risques de pâtisseries

Les dangers microbiens existent dans les pâtisseries à base de crème chantilly, crème pâtissière, crème au beurre et crème ganache, ainsi que pour les glaces. Ces produits présentent un milieu favorable pour le développement de diverses bactéries qui peuvent être dangereuses pour la santé humaine, notamment les souches enterotoxiques d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella* et tandis que les tartes et les mousses aux fruits peuvent être contaminées par les levures, les moisissures et la flore lactique (Millet *et al.*, 1997).

Selon Foote *et al.* (1996), les principales menaces de contamination lors de la préparation et de la production de pâtisseries et de viennoiseries sont les suivants :

- une contamination croisée peut se produire entre les aliments cuits et non cuits pendant le stockage;
- les bactéries responsables d'intoxications alimentaires peuvent être transférées de la main d'œuvre à la nourriture;
- la contamination se produira si la farine ou tout autre aliment entre en contact avec des rongeurs, des insectes;
- les bactéries d'origine alimentaire peuvent être transférées par des surfaces et des équipements sales ou les équipements non hygiéniques (ustensiles et tables, plateaux, récipients, moules, moules à pâtisserie) et les zones de préparation;

- la contamination peut se produire lorsque la production est laissée ouverte où des corps étrangers peuvent tomber dans des conteneurs et des bacs à farine ouverts.

1.5.2. Hygiène de préparation

La qualité d'une pâtisserie ou d'un dessert dépend de la présentation, de l'odeur et du goût. Certains de ces éléments comprennent les qualités nutritives d'un plat ainsi que les soins à apporter en matière d'hygiène et de salubrité lors de sa préparation (**Bleu, 2011**).

Selon **Hanneman (2009)**, le pâtissier doit être particulièrement conscient de la nécessité de l'hygiène car un nombre de ses préparations doivent être manipulées et transmises au consommateur sans autre traitement thermique, par exemple les flans, les confiseries fourrées à la crème, les gâteaux. Des normes élevées d'hygiène alimentaire sont essentielles pour prévenir les intoxications alimentaires, l'altération des aliments, la perte de productivité, les infestations de parasites et les poursuites pour infraction à la législation alimentaire.

Afin de pouvoir fabriquer des produits boulangers sains et sans risques, il faut qu'il y ait non seulement une production sécurisée mais également une hygiène suffisante. En plus d'une bonne hygiène des locaux, des matériaux et des appareils, l'hygiène personnelle revêt également toute son importance (**AFSCA.2013**). La loi exige que les équipements avec lesquels les denrées alimentaires entrent ou sont susceptibles d'entrer en contact soient maintenus propres et en bon état de réparation et d'entretien afin de permettre un nettoyage efficace. L'utilisation de locaux propres et pouvant être gardés propres est essentielle pour la préparation des aliments. L'aménagement doit être conçu de manière à assurer un flux de travail linéaire et continu, c'est-à-dire des processus sales jusqu'au fonctionnement propre.

Dans les boulangeries et les grandes entreprises de restauration, il convient de prévoir une chambre de crème réfrigérée où tous les travaux de finition sont effectués à une température d'air ne dépassant pas 10°C (**Hanneman. 2009**). La manipulation des produits que du matériel régulièrement nettoyé, et si nécessaire, désinfecté (pelles, etc.) (**Jeannette et al. 1999**). Le respect de la température de préparation et de conservation joue un rôle important tout au long du processus de fabrication de la pâtisserie (**AFSCA, 2013**).

1.6. Les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries

Les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries sont présentés dans le tableau 2 (JORADP, 2017)

Tableau 1 : Les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries (JORADP, 2017)

Produit	Microorganismes	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
		n	c	m	M
	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁵	10 ⁶
Pâtisseries à la crème, crèmes, mousse de fruits, tiramisu...	<i>Echerichia coli</i>	5	2	10	10 ²
	Anaérobies sulfito-réducteurs	5	2	10	10 ²
	Staphylococcus coagulase + à	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	

n : nombre d'unité constituant l'échantillon ;

m : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante ;

M : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable ;

c : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté

CHAPITRE II

GENERALITES SUR STAPHYLOCOCCUS

AUREUS

CHAPITRE II : GENERALITES SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

2.1. Histoire

Le Staphylocoque fut démasqué à la fin du XIXème siècle, l'observation au microscope faisant apparaître des «amas de grains» dans le pus de furoncles. D'abord observé par Robert Koch en 1878, il fut reconnu par Louis Pasteur deux ans plus tard (**Le loir et al., 2010**). Les staphylocoques ont été décrits pour la première fois par le chirurgien écossais sir Alexander Ogeston, les a décrits comme étant à l'origine de plusieurs infections pyogènes. En 1882, il leur a donné le nom de staphylocoques (en grec : *stphyle*, grappe de raisin : *coccus*, un grain ou une baie), d'après leur apparition au microscope (**Garg et al., 2010**). *S. aureus* a été observé pour la première fois de manière concluante par le physicien allemand Anton Robenbach en 1884. Il s'agit d'une bactérie non mobile qui se développe en grappes comme le raisin. Le nom aureus, qui signifie "or" en latin, a été donné à la bactérie car elle se développe en grandes colonies jaunes (**Freeman et al., 2005**).

2.2. Habitat

Les souches de *S. aureus* productrices d'enterotoxine ont généralement été associées à des intoxications alimentaires, bien que l'implication de souches de plusieurs autres espèces de staphylocoques dont on sait qu'elles produisent des enterotoxine dans les intoxications alimentaires ne soit pas totalement connue. *S. aureus*, Avec de nombreux autres staphylocoques naturellement présents dans le nez, la gorge, la peau et les poils des humains, des animaux et des oiseaux en bonne santé, *S. aureus* peut être présent dans des infections telles que des blessures de la peau et des abcès chez les humains, les animaux et les oiseaux, et des blessures des mains et de l'acné sur le visage chez les humains. La contamination des aliments provient généralement de ces sources (**Bibek, 2004**).

2.3. Taxonomie

Le staphylocoque appartient à un groupe de bactéries pathogènes pour l'homme. Ces cellules bactériennes sphériques se présentent généralement en grappes semblables à celles du raisin. Ce sont des bactéries à Gram positif. Le genre *Staphylococcus* contient des espèces : *Staphylococcus aureus*, le principal agent pathogène responsable des infections pyogènes chez l'homme (**Vasanthakumari, 2007**).

Le genre *Staphylococcus* couvre un large groupe de bactéries gram-positives qui sont classées taxonomiquement dans la famille des staphylocoques. Ordre *bacillales*. Classe *bacilles*. Phylum Firmicutes, représentant l'un des cinq genres (c'est-à-dire *jeotgalicoccus*, *micrococcus*, *nosocomiicoccus*, *salinicoccus* et *staphylococcus*) au sein de la famille des staphylocoques. Le genre *Staphylococcus* est complexe et contient des espèces reconnues, l'analyse des séquences d'ARNr 16S a permis la séparation des staphylocoques spp. en 11 groupes que réalise *S. aureus* (Sails, 2015).

Selon la deuxième édition de Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est la suivante (Delarras, 2007).

Domaine : Bacteria.

Phylum : Firmicutes.

Classe : Bacilli.

Ordre : Bacillales.

Familles : *Staphylococcaceae*.

Genre : *Staphylococcus*

Espèces : *Staphylococcus aureus*

2.4. Caractères bactériologiques

2.4.1. Caractères morphologiques

Staphylococcus aureus est un coccus gram-positif dont le diamètre des cellules varie entre 0,5 à 1,5 μm , non mobiles et produisent des colonies jaune doré. La paroi cellulaire contient trois composants principaux : le peptidoglycane comprenant des unités répétitives de N-acétyl glucosamine B-1,4 liées à l'acide N-acétyl muramique, un acide ribitol teichoïque lié via N-acétyl mannosaminy-B-1,4-N-acétyl glucosamine à un muramyl-6-phosphate ; et la protéine A, qui est liée de manière covalente au peptidoglycane et se caractérise en particulier par sa capacité à se lier au composant Fe de l'immunoglobuline dans le plasma, causant ainsi une auto agglutination. La plupart des autres espèces de staphylocoques manquent de protéine A dans leur paroi cellulaire (Bhunia, 2007).

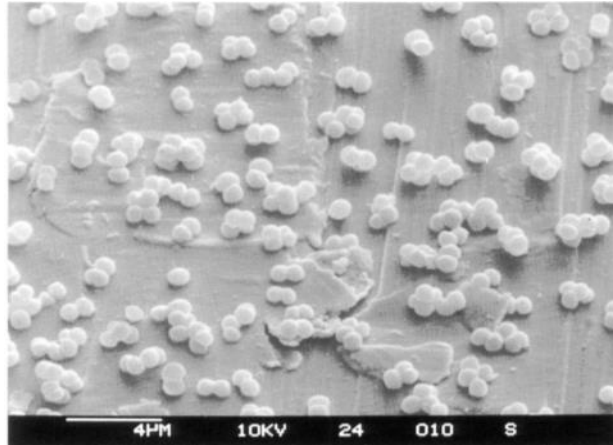


Figure 3 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (Adams et al., 2008)

2.4.2. Caractères culturels

Staphylococcus aureus est un organisme anaérobie à catalase positive et facultative, qui se développe abondamment dans des conditions aérobies, à l'exception de *S. saccharolyticus*, qui est un véritable anaérobie (Bhuni, 2007), mais se développent rapidement dans des conditions aérobies. Ils peuvent fermenter les glucides et également provoquer une protéolyse par les enzymes protéolytiques extracellulaires. Ils sont des mésophiles avec une gamme de température de croissance de 7-48°C, avec une croissance assez rapide entre 20 et 37°C. D'autres caractéristiques importantes de croissance sont leur capacité à se développer à une A_w relativement faible (0,86), un faible pH (4,8), et des concentrations élevées de sel et de sucre de 15% et en présence de NO_2 (Ray et al., 2013).

La protéine A est produite et les réactions positives comprennent la phosphatase alcaline, la coagulase, le facteur de coagulation, la nucléase thermostable (thermo nucléase), l'hémolysine et la lipase. L'acide est produit de manière aérobie à partir du glucose et du mannitol (Silva et al., 2012).

Tableau 2 : Différenciation des espèces et sous espèces de Staphylocoques à coagulase positive (Silva et al., 2012).

Caractéristiques	<i>S. aureus subsp aureus</i>	<i>S.aureus Subsp. anaeorobius</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S chleiferi Sous-espèce coagulans</i>
Catase	+	-	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Pigment	+w	-	-	-	-	-
Croissance aérobie	+	-	+	+	+	+
Croissance anaérobie (milieu thiglycolate)	+	+	+	(+)	+	+
Croissance sur 10 % de NaCl (w /v)	+	+	+	+	+	ND
Croissance sur 15% de NaCl (w /v)	W	D	-w	d	+	ND
Croissance à 15°C	+	ND	+	+	ND	ND
Croissance à 45°C	+	-	-w	+	+	ND
Phosphatase alcaline	+	+	+	+	+	+
Réduction de la tellurite	+	+	ND	-	ND	ND
Coagulase	+	+	d	+	+	+
Facteur de regroupement	+			d	-	-
Protéine A	+		ND	-	ND	-
Nucléase stable à la chaleur	+	+	+	+	-	+
Hémolyse	+	+	-	d	+	+
Acide du mannitol	+	+	-	(d)	+	d

(Silva et

al.2012)

Symboles : +, concerne 90% ou plus des souches ; -, 90% ou plus des souches sont négatives ; d, 11 à 89% des souches sont positives ; ND, non déterminé. () Indique une réaction retardé.

2.5. Toxines de staphylococques

S. aureus produit un certain nombre d'exotoxines, comme l'hémolysine, la leucocidine, la fibrinolysine et l'enterotoxine. L'hémolysine a quatre formes antigéniques appelées lysines alpha, bêta, gamma et delta. La toxine alpha est hautement pathogène. Le rôle de la leucocidine dans la pathogenèse n'est pas très clair. Les anticorps à la leucocidine pourraient jouer un rôle dans la résistance aux infections staphylococques récurrentes. tableau 3 (Jamaluddin et al., 2007).

Tableau 3 : les toxines produites par le staphylocoque doré

Toxines	Activité
Cytotoxines $\alpha \beta \gamma$	Lyse cellulaire
Toxine leucocidique	Tue les leucocytes
Toxine épidermomolytique	Exfoliation et dédoublement de l'épiderme
Toxines du syndrome de choc toxique	Choc, éruption, desquamation

2.6. Intoxication alimentaire staphylococcique

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, a symptomatologie gastro-intestinale le plus souvent, dont la cause peut être rapportée a une même origine alimentaire (**Delmas et al., 2006**) in (**loir et al., 2010**).

L'intoxication alimentaire staphylococcique (intoxication) est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes dans le monde. Près d'un tiers de tous les cas d'intoxication alimentaire aux États-Unis ont été causés par des staphylocoques dans les années 1970 et 1980, ce qui a généralement diminué au cours des deux dernières décennies. Toutefois, elle reste la principale cause d'intoxication alimentaire signalée dans un certain nombre de pays, dont le Brésil, l'Égypte, Taïwan, le Japon et la plupart des autres pays en développement. L'intoxication est due à l'ingestion d'une ou plusieurs enterotoxine staphylococciques (ES) préformées dans des aliments contaminés (**Bhunja, 2007**).

Cependant, *S. aureus* est différente des autres bactéries qui provoquent des intoxications alimentaires. Comme pour les syndromes du choc toxique (SCT) et les épidermolyses toxiques staphylococcique du nouveau-né (ETS), ce ne sont pas les bactéries elles-mêmes qui rendent le patient malade, mais plutôt les toxines que les bactéries libèrent dans la nourriture. En fait, dans le cas d'une intoxication alimentaire causée par *S. aureus*, il n'y a aucune infection dans l'organisme et l'intoxication alimentaire ne nécessite même pas que la personne malade ingère des bactéries vivantes. Ainsi, il n'est pas possible d'empêcher l'infection en chauffant les aliments contaminés pour tuer les bactéries, car les toxines ne sont pas affectées par la chaleur (**Freeman et al., 2005**).

L'ingestion d'une dose inférieure à 1 g peut provoquer des symptômes d'intoxication et cette quantité est atteinte lorsque la population de staphylocoques atteint des valeurs supérieures à $>10^5$ UFC/g d'aliments (**Silva et al., 2012**).

Les toxines agissent rapidement et la maladie peut se déclarer dans les 30 minutes suivant la consommation d'aliments contaminés, bien que l'apparition typique se produise

généralement dans les 1 à 6 heures après avoir mangé. Une fois les toxines éliminées de l'organisme, les symptômes s'atténuent (**Batt et al., 2014**).

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

Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les maladies alimentaires staphylococciques sont la viande de volaille cuite, le poisson (et surtout les crustacés comme les crevettes), les produits de boulangerie (surtout ceux qui sont fourrés à la crème ou à la crème pâtissière), les produits laitiers (surtout le lait en poudre) et les légumes cuits (**Harrigan, 1998**).

2.7. Facteurs influençant la croissance et la production d'enterotoxine staphylococciques par *Staphylococcus aureus*

2.9.1. Température

Le *S. aureus* est extrêmement durable, il pousse dans une large gamme de températures allant de 15° à 45°C (60° à 113°F). Si les conditions de croissance (c'est-à-dire la température ou l'apport de nutriments) ne sont pas favorables, le *S. aureus* peut exister pendant des années à l'état dormant (essentiellement, il est inactif et attend le bon moment pour se développer). Plus tard, la bactérie peut recommencer à se développer lorsque les conditions sont plus favorables (**Freeman et al., 2005**).

2.9.2. pH

La croissance de staphylocoques se produit de manière optimale à des pH de 6-7, avec des limites minimales et maximales de 4,0 et 9,8-10, respectivement. La plage de pH sur laquelle se produit la production d'enterotoxine est plus étroite, avec une faible production de toxines en dessous de pH 6,0 mais, comme pour la croissance, les valeurs précises varieront en fonction de la nature du milieu (**Grag et al., 2010**).

2.9.3. L'activité de l'eau

S. aureus est un micro-organisme tolérant au sel et se développe à une activité de l'eau aussi faible que 0,85 (teneur en sel de 25% p/p) dans des conditions de groupe par

ailleurs optimales. Cependant, la croissance est souvent limitée et plus élevée avec d'autres humectant. L'interaction de l'activité de l'eau avec d'autres paramètres est présentée dans le tableau 4. La production d'enterotoxine se produit dans une gamme de conditions plus étroite que la croissance ; la production d'enterotoxine A peut se produire à des activités de l'eau plus faibles que celles des enterotoxines B (ICMSF, 1996).

2.9.4. Condition de l'atmosphère

Les staphylocoques sont des anaérobies facultatifs, mais la quantité et le taux de croissance et la production d'enterotoxine sont moindres en conditions anaérobies. Il a été signalé une production anaérobie d'enterotoxine staphylococciques B (ESB) dans des viandes salées à 22°C et 30°C. La production d'enterotoxine staphylococciques A (ESA), d'enterotoxine staphylococciques B (ESB) et d'enterotoxine staphylococciques D (ESD) a été observée dans des saucisses stockées sous N₂ pendant 4 jours (Cliver *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Facteurs de permettant la croissance et la production d'enterotoxine par *Staphylococcus aureus*

Facteurs	croissance		Production d'entérotoxines	
	Optimum	Gamme	Optimum	Gamme
Température °C	35-37	7-48	35-40	10-45
pH	6.0-7.0	4.0-9.8	Ent. A. 5.3-6.8	4.8-9.0
NaCl	0.5-4.0%	0-20%	0.5%	0-20%
A _w	0.98-0.99	0.83-0.99	-0.99	0.86-0.99
Atmosphère	aérobie	aérobie	5-20 % DE DO ²	Aérobie
E _h	+200mV	-200TO +200Mv	++200mV	?

(Adams *et al.*, 2008)

A_w : activité de l'eau

E_h : potentiel redox

CHAPITRE III :
LES HUILES ESSENTIELLES

CHAPITRE III : LES HUILES ESSENTIELLES

3.1. Définition

Les huiles essentielles, ou essences de plantes aromatiques, sont des substances volatiles et odorantes de consistance huileuse. L'huile volatile produite par distillation à la vapeur d'eau. Elles peuvent être plus ou moins fluides, sont parfois résineuses, et ont souvent une coloration qui va du jaune pâle au vert émeraude et du bleu au rouge brunâtre foncé. Ils se distinguent des corps gras solides et liquides par leur volatilité, qui augmente avec la hausse des températures (**Balz, 1999**).

3.2. Composition chimique

La chimie des huiles essentielles est assez complexe. Elle varie au cours de la journée et tout au long de l'année; elle dépend de la partie de la plante qui est distillée (racine, bois, écorce, feuille, tige, fleur, graine), de la variété, du sol, voire du climat. Les huiles sont principalement constituées de terpènes, d'esters, d'alcools, de phénols, d'aldéhydes, de cétones et d'acides organiques (**Lavabre, 1996**).

3.3. Propriétés des huiles essentielles

3.3.1. Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles « fixes ». Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée, solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles (**Jean, 2009**).

3.3.2. Propriétés chimiques

Les principaux constituants des huiles essentielles sont des hydrocarbures ou terpènes (aliphatiques, alicycliques, aromatiques) substances grasses, intimement associées aux fonctions biologiques des organismes vivants, et plusieurs corps oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, esters, acides organiques, coumarines, etc.). Vient ensuite le dosage des principaux composants, tels que: menthol, acétate de linalyle, cinnamaldéhyde,

cinnamaldéhyde, etc. Ou encore la spécification des fonctions chimiques (phénols, esters, aldéhydes, alcools totaux, etc.) (Bardeau, 2009).

3.3.3. Propriétés organoleptiques

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques communes comme le fait d'être liquides à la température ambiante, d'être volatiles et entraînaables à la vapeur d'eau. Elles sont odorantes et incolore ou jaune pâle sauf pour les huiles essentielles de cannelle, girofle, camomille matricaire, vétiver et bouleau où la couleur est relativement foncée (Franchomme et al., 1990).

3.4. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles de différentes plantes ont suscité un grand intérêt en raison de leurs propriétés antioxydants, antibactériennes, antitumorales, antifongiques et insecticides (Burt, 2004).

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés (Tohidpour et al., 2010 ; Warnke et al., 2013).

Les huiles essentielles de *Mentha* possèdent très bon potentiel antimicrobien et cytotoxique. Les activités biologiques des huiles essentielles pour diverses applications peuvent être utilisées pour la conservation des aliments transformés ainsi que des produits pharmaceutiques et les thérapies naturelles pour le traitement des maladies infectieuses humaines (Hussain et al., 2010).

3.5. Utilisation des huiles essentielles

3.5.1. En pharmaceutique

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe et autres, elles ont une

action anti-inflammatoire, antiseptique, antibactérienne, insecticide et antioxydant (Prabuseeninivasan e *al.*, 2006 ; Domaracky et *al.*, 2007)

3.5.2. En cosmétologie

La plupart des huiles essentielles sont utilisées directement comme matières premières dans la production d'arômes et de parfums. Cependant, certaines huiles essentielles sont fractionnées ou concentrées par distillation, partitionnement ou adsorption. Les substances qui sont importantes pour l'odeur et le goût caractéristiques souhaités sont ainsi concentrées, et les autres composants qui ont une odeur désagréable ou très faible ou qui ne conviennent pas à l'application en question sont éliminés (Wily, 2017).

3.5.3. En industries agroalimentaires

Traditionnellement, les huiles essentielles et leurs composants ont été utilisés dans l'industrie alimentaire pour aromatiser certaines boissons et aliments. Cependant, ces composés ont un grand potentiel en tant que conservateurs alimentaires en raison de leur grande capacité antimicrobienne, répondant ainsi à la demande du consommateur pour des conservateurs naturels et sains (Montero, 2015).

3.6. Généralités sur *Mentha spicata* L.

3.6.2. Description

Mentha spicata L. est une plante aromatique, communément connue sous le nom de menthe verte ou Nana (نعناع), appartient à la famille des *Lamiaceae* (cf. figure n° 4). Les feuilles de menthe sont glabres d'un vert sombre. Les épis florifères sont plus ou moins disjoints, grêles et allongés (4-8 cm). La menthe verte est très cultivée en Algérie et souvent subspontanée (Quezel et Santa, 1962). Elle est très utilisée dans la préparation du thé ainsi que dans des produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.



Figure 4 : la menthe verte *Mentha spicata* L (britton et al., 1898)

3.6.3. Classification

Selon Judd et al., 1999 Taxonomie et systématique :

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermaphyte
Sous-embranchement :	Angiosperme
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétale.
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	<i>Mentha</i>
Espèce :	<i>Mentha spicata</i>

3.6.4. Les huiles essentielles de *Mentha spicata* L.

L'huile essentielle de la menthe verte est riche surtout en -L-carvone (teneur entre 40 à 80 %), l'acétate de dihydrocuminyne (10 à 12%), ces deux constituants majeurs étant responsables de l'odeur de la plante et le limonène (5 à 15%). Ils sont accompagnés de dihydrocarvone, de dihydrocarvéol, d'acétate de carvyle et de caryophyllène. Dans d'autres variétés chimiques, la carvone est accompagnée de 1,8 cinéol (jusqu'à 20%), de pulégone (jusqu'à 50%) ou de terpinéol-4 (jusqu'à 18%) (Avato et al., 1995).

3.6.5. Utilisation les huiles essentielle de menthe verte

L'huile de menthe verte est un arôme précieux pour les chewing-gums, les bonbons, les confiseries, les produits de boulangerie, les desserts, les gelées et les autres produits sucrés. L'huile de menthe verte est l'un des parfums les plus utilisés pour le dentifrice en raison de ses qualités rafraîchissantes pour la bouche. Pour la même raison, elle est utilisée dans les bains de bouche et les préparations dentaires. Des recherches menées en Turquie ont montré que le thé à la menthe verte a un effet anti-androgène sur les femmes atteintes d'utisme hirsute (**Attokaran, 2017**)

La menthe verte et l'huile de menthe verte sont utilisées comme carminatifs (pour soulager les gaz), et surtout pour masquer la saveur d'autres médicaments. La menthe verte est traditionnellement appréciée comme stomachique, antiseptique, antispasmodique. La feuille de thé a été utilisée pour les maux d'estomac, la diarrhée, les nausées, les rhumes, les maux de tête, les crampes, les fièvres, et est un remède populaire contre le cancer (**Foster et al., 2000**).

L'huile est utilisée dans le commerce pour aromatiser les préparations d'hygiène buccale. L'huile essentielle est un répulsif pour les insectes. Les rats et les souris détestent intensément l'odeur de la menthe. La plante était là pour être utilisée à la maison comme herbe à saupoudrer et a également été répandue dans les greniers pour empêcher les rongeurs d'entrer dans le grain (**Ravandran, 2017**).

Chapitre IV :
Matériel et méthodes

4.1 Objectif

L'objectif de la présente étude était d'une part de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*, et d'autre part d'évaluer la croissance de *S. aureus* inoculée dans la mousse au chocolat ainsi que les charges des germes aérobies mésophiles et psychrotrophes après l'addition de différentes concentrations (0.2 et 0.4%) de l'huile essentielle de la menthe verte (*Mentha spicata* L.) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive.

4.2. Matériel végétal

Les parties aériennes de la plante *Mentha spicata* ont été récoltées durant le mois d'Octobre 2019 dans la région Bordj Senouci à Laghouat (Figure 5). Le matériel végétal est séché à la température ambiante et à l'abri de la lumière dans un endroit sec et aéré pendant un mois (Figure 6). Après le séchage, les plantes sont récupérées dans des sacs en papier propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle.



Figure 5: Localisation géographique la zone de Bordj Senouci, site de récolte de la menthe verte



Figure 6: La menthe verte (*Mentha spicata*) séchée (Photo originale, 2020)

4.3. Hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation selon le protocole de British Pharmacopoeia (**British Pharmacopoeia, 1990**), utilisant un appareil de type Clevenger (Figure 7).

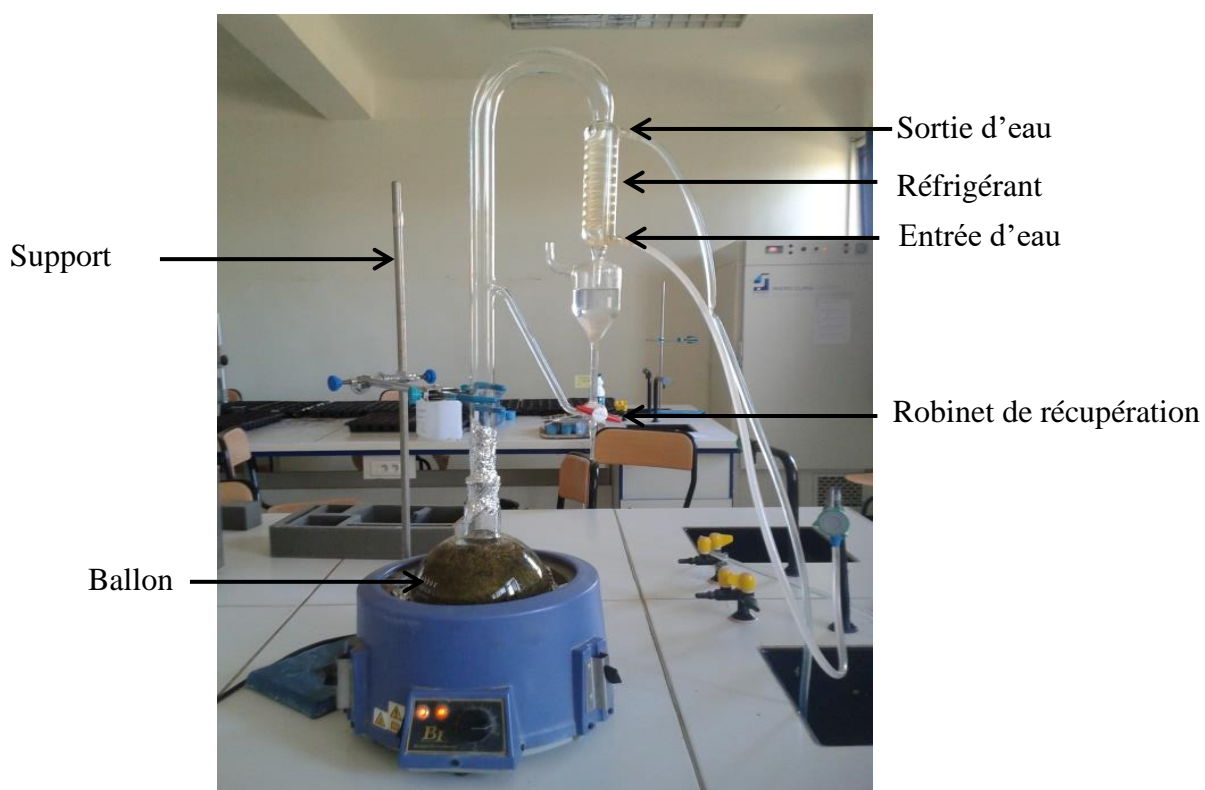


Figure 7: Montage d'un hydrodistillateur de type Clevenger (Photo originale, 2020)

Cent cinquante grammes (150 g) du matériel végétal séché sont mises dans un ballon à fond rond et additionnés à 1500 mL d'eau distillée, puis sont portés à l'ébullition pendant 4 h à l'abri de la lumière. La vapeur est condensée dans le réfrigérant, le condensat

(eau + huile essentielle) est récupéré dans une ampoule à décanter. L'huile essentielle est obtenue par une simple décantation et conservée dans des tubes en verre à une température voisine de 4°C à l'abri de la lumière, jusqu'à leur usage ultérieur.

4.4. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle

L'échantillon d'huile essentielle a été envoyé au laboratoire de chimie analytique, Faculté des pêches, Université de Cukurova, Turquie, pour déterminer la composition chimique de l'huile sur une chromatographie en phase gazeuse (CG) couplée à la Spectrométrie de masse (SM) de type Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS (Santa Clara, CA, USA), équipé d'une colonne HP - 5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film, 5% phenyl methyl poly siloxane). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse Nist et Wiley. L'huile essentielle est diluée dans du n-hexane (1%, v/v) avant de procéder aux analyses CG/SM. Le volume injecté est 1 µL.

4.5. Matériel biologique

La souche bactérienne de référence testée dans cette étude est une *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) obtenue du Laboratoire Vétérinaire Régional de Laghouat (LVRL). *S. aureus* a été stockée à -80 °C dans du bouillon BHIB 10% de glycérol, ajouté comme agent cryogénique. Une culture fraîche a été préparée en transférant une boucle de culture dans du BHIB, puis en l'incubant pendant 24 h à 35 °C. Les cultures ont été repiquées sur des boîtes de BHI Agar et incubées à 35 °C pendant 48 h. Pour obtenir une suspension de travail, l'inoculum a été préparé à partir des cultures récentes dans l'eau physiologique (0.9%), ajusté à la densité de 0.5 McFarland à l'aide d'un spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK) à une longueur d'onde de 600 nm afin d'obtenir une concentration finale approximative de 10^7 à 10^8 UFC/ mL (Figure 8).

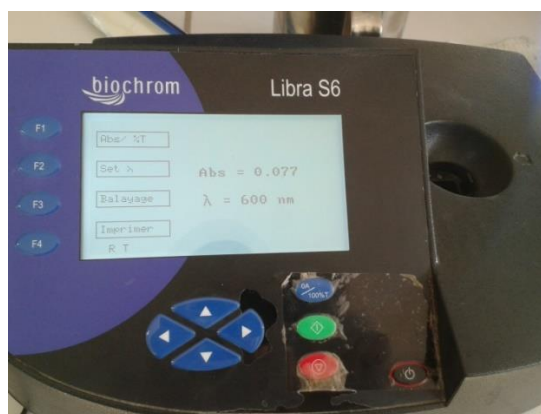


Figure 8 : Spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK)

4.6. Préparation de la mousse au chocolat

La mousse au chocolat a été préparée manuellement dans le laboratoire du Département des Sciences Agronomiques, Faculté des sciences, Université de Laghouat, suivant la recette de LAROUSSE Cuisine (<https://cuisine.larousse.fr>). Pour 500g de la mousse au chocolat, la recette contient les ingrédients suivants :

- 180 g de chocolat noir
- 2 cl de lait frais entier
- 10 cl de crème liquide
- 20 g de beurre
- 3 œufs
- 15 g de sucre en poudre

Technique de préparation :

- Désinfecter tous le matériel et la zone utilisée dans la préparation de la mousse au chocolat,
- Hacher le chocolat au couteau en petits morceaux et fonder- le dans un bain-marie,
- Porter à l'ébullition le lait et versez ce liquide bouillant sur le chocolat en mélangeant au fouet manuel 1 ou 2 min,
- Couper le beurre et incorporez- le au mélange,
- Séparer les blancs des jaunes d'œufs dans le bol du robot muni du fouet, monter à vitesse constante et moyenne les blancs en neige et incorporer le sucre petit à petit une fois que les blancs ont doublé de volume,
- Ajouter les jaunes quelques secondes avant d'arrêter l'appareil,
- Incorporer 1/5 des blanc dans le chocolat et reverser le tout dans le reste des blancs en soulevant délicatement la préparation,
- Garder la mousse au chocolat au réfrigérateur (Figure 9).



Figure 9 : La mousse au chocolat (Photo originale 2020)

4.7. Incorporation de l'huile essentielle et l'inoculum de *Staphylococcus aureus* dans la mousse au chocolat

Cinq cents grammes (500 g) de mousse au chocolat, précédemment préparés, ont été pesés dans un bocal stérile en verre. Ensuite, la mousse a été inoculée avec 5 mL de cellules de *S. aureus* de sorte que la concentration finale était d'environ 10^6 UFC/g.

Après agitation, la mousse a été répartie en 5 bocaux stériles en verre (100 g/bocal) pour additionner l'huile essentielle selon les groupes suivants (Figure 10) :

- **Groupe 1 :** contient la mousse au chocolat + l'huile essentielle à la concentration 0.2% et conservé à 4 °C pendant 72 h ;
- **Groupe 2 :** contient la mousse au chocolat + l'huile essentielle à la concentration 0.2% conservé à 4 °C pendant 24 h, puis à la température ambiante pendant 10 h, ensuite à 4 °C jusqu'à 72h.
- **Groupe 3 :** contient la mousse au chocolat + l'huile essentielle à la concentration 0.4% et conservé à 4 °C pendant 72 h ;
- **Groupe 4 :** contient la mousse au chocolat + l'huile essentielle à la concentration 0.4% et conservé à 4 °C pendant 24 h, puis à la température ambiante pendant 10 h, ensuite à 4 °C jusqu'à 72h ;
- **Témoin :** contient seulement la mousse au chocolat inoculée par *S. aureus* ;

Notons que, cette condition de température abusive a été choisie pour simuler une perturbation ou une rupture de la chaîne de froid lors d'une ou plusieurs étapes du stockage

de la pâtisserie fraîche, du transport et du stockage en confiserie ou en réfrigérateur domestique.

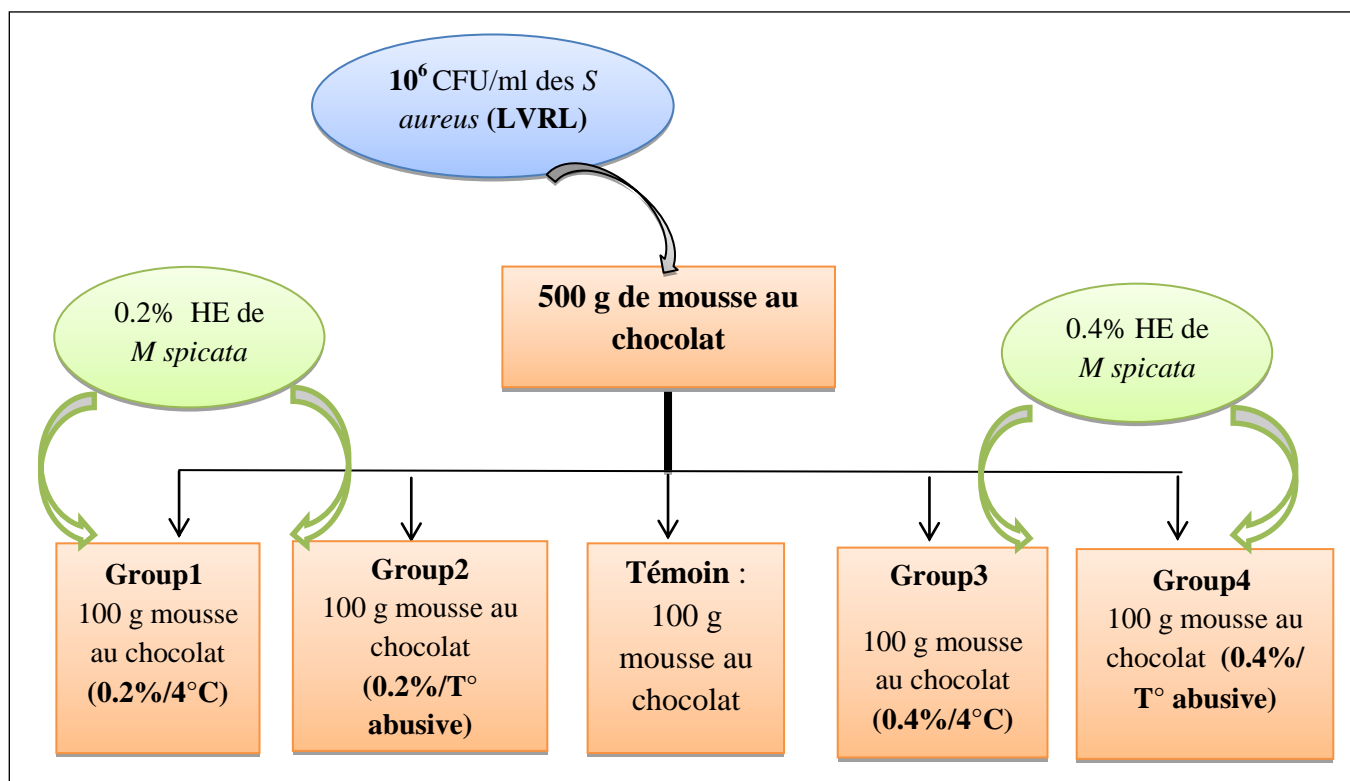


Figure 10 : Diagramme d'incorporation de l'huile essentielle de *M. spicata* et l'inoculum de *S. aureus* dans la mousse au chocolat

4.8. Analyse bactériologique

4.8.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

Les analyses ont été effectuées de façon aseptique pour éviter toute contamination. La préparation de la suspension mère s'effectue selon le protocole suivant : 10g de l'échantillon de mousse au chocolat ont été pesés et homogénéisés avec 90 mL d'eau physiologique pendant 2 minutes. Cette suspension constitue alors la dilution mère qui correspond à la dilution 1/10 ou (10^{-1}). L'aide d'une micropipette régler, un millilitre de la suspension mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement et introduit dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on prépare de la même procédure pour les autres dilutions décimales (10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) (JORADP, 2014). Dans ce cas, nous disposons de cinq dilutions décimales à partir desquelles les milieux de cultures serontensemencés (Figure 11).

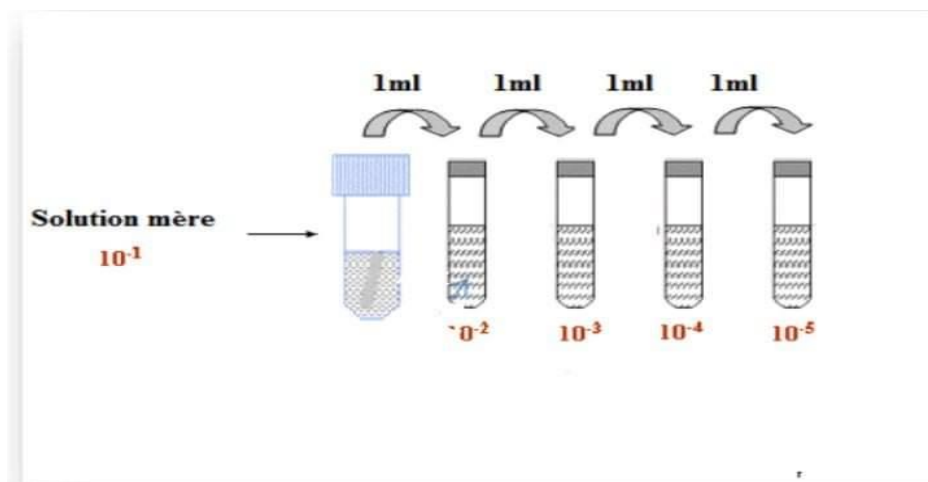


Figure 11 : Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

4.8.2. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Le milieu Baird Parker a été utilisé pour la recherche et le dénombrer des staphylocoques. Ce milieu est additionné de jaune d'œuf (élément nutritif et révélateur enzymatique) et de Tétrurite de potassium (indicateur de noircissement des colonies) qui est souvent le milieu le plus favorable à la sélection et la différenciation des staphylocoques à partir des produits alimentaires, selon la méthode décrite par **AFNOR : NF-V-08-014**. L'ensemencement a été effectué par l'étalement en surface de 0.1 mL de chaque dilution décimale à la surface de la gélose sans toucher les bords de la boîte. Ensuite, les boîtes sont incubées à l'étuve à une température de 35°C pendant 24 à 48 h. Dans la gélose Baird-Parker, les colonies typiques de *S. aureus* sont d'une couleur noire brillante avec une zone claire distincte dans la gélose après la période d'incubation.

4.8.3. Dénombrement des germes aérobies totaux

Le milieu utilisé pour le dénombrement les germes aérobies mésophiles totales est le milieu PCA contenant un digest enzymatique de caséine, de l'extrait de levure et du glucose. Pour chaque dilution décimale, 0.1 mL a été transféré à la surface des boîtes de milieu et étalé à l'aide d'un étaleur, laissées séchées avec leur couvercle en place, pendant, quelques minutes à la température ambiante. La lecture des boîtes de pétri se fait après 48 à 72h d'incubation à 30°C. Après incubation, les colonies sont toutes dénombrées sur les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies (**Norme NF-V 08-51**).

4.8.4. Dénombrement des germes Psychrotrophes

Le milieu utilisées pour le dénombrement les germes psychrotrophes est le PCA, (Plat Count Agar). Pour chaque dilution décimale, 0.1 mL de chaque dilution a été transféré à la surface des boîtes de milieu et étalé à l'aide d'un étaleur stérile, laissées séchées avec leur couvercle en place, pendant, quelques minutes à la température ambiante. La lecture des boîtes de pétri se fait après 5-10 jours d'incubation à 4°C. Après incubation, les colonies sont toutes dénombrées sur les boîtes contenant entre 30 à 300 colonies.

4.8.5. Calcul des charges bactériennes

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

$$N = \frac{\sum \alpha}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Ou :

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

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

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

n₁ : Nombre de boîtes retenues à la première dilution;

n₂ : Nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;

d : Taux de dilution correspondant la première dilution retenue.

Chapitre V:
Résultats et discussion

Chapitre V: Résultats et discussion

5.1. Les rendements et compositions chimique de l'huile essentielle de *M. spicata*

L'huile essentielle extraite à partir de la plante *M. spicata* par hydrodistillation est de couleur jaune claire et d'odeur fraîche de menthe (Figure 12). De plus, les propriétés organoleptiques de notre l'huile essentielle sont résumés dans le tableau 6. Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *M. spicata* est de 0.9 % (w/w).



Figure 12: Huile essentielle de la menthe verte (Photo originale, 2020)

Tableau 05 : Propriétés organoleptiques des HE de *Mentha spicata* obtenu et celle de la norme ANFOR 2000

Caractéristiques organoleptiques	HE de <i>Mentha spicata</i> obtenu	HE de <i>Mentha spicata</i> selon normes AFNOR (2000)
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile
Couleur	jaunâtre claire	Brun clair
Odeur	Fraîche avec odeur de menthe	Caractéristique, aromatique, légèrement épicée

L'huile essentielle de *M. spicata* a été analysée par CG/SM, et cette analyse a permis d'identifier 4 composés majoritaires qui sont : Carvone (53%), D-limonene (16.9%), Eucalyptol (8.9%) et Terpinen-4-ol (2.7%). D'autres composés sont également présents dans l'huile *M. spicata*, mais à des teneurs moins importantes (Tableau 6et Figure 13).

Tableau 6 : Les principaux composés de l'huile essentielle de *M. spicata*

<i>M. spicata</i>	
Composé	%
Carvone	53.3
D-limonene	16.9
Eucalyptol	8.9
Terpinen-4-ol	2.7
Composés mineurs	18.2
Rendement (w/w)	0.9

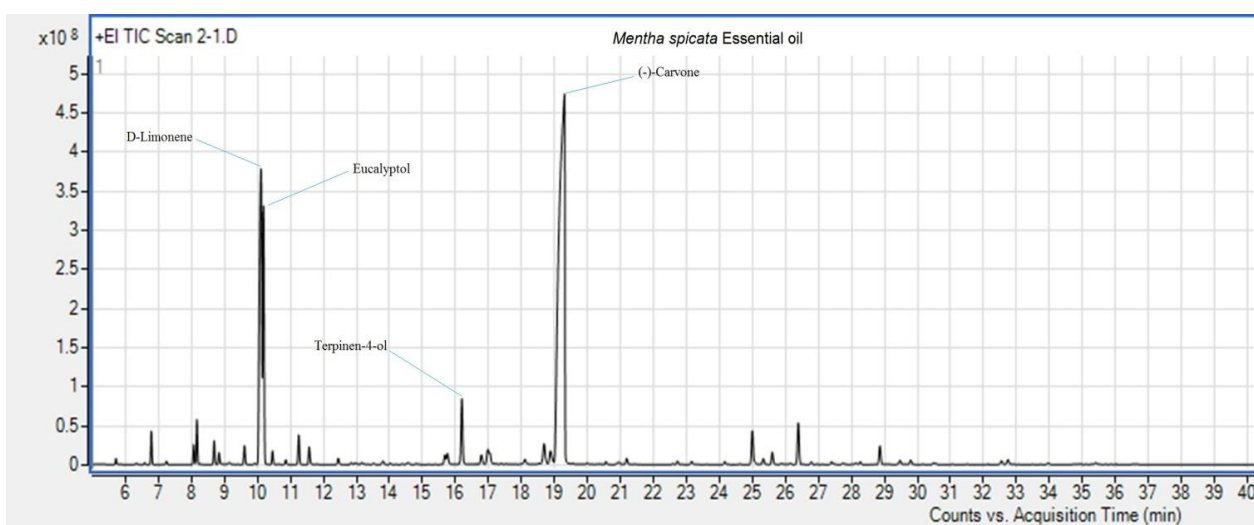


Figure 1

Figure 13: Chromatogramme de l'huile essentielle de *M. spicata* obtenu par CG-SM
(Photo originale, 2020)

5.2. Résultats d'analyse bactériologiques

Les résultats de dénombrement des *Staphylococcus aureus*, des germes aérobies à 30°C et des germes psychrotrophes dans la mousse au chocolat traitée par l'HE de *M. spicata* sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultats d'analyse bactériologiques de la mousse au chocolat inoculée par *S. aureus* et traitée par l'huile essentielle de *Mentha spicata*

Micro-organismes	Traitement	Charge bacterienne (UFC/g)			
		Durée de conservation (heures)			
		0	24 h	48 h	72 h
Gérmes aérobies à 30°C	Témoin	$2,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
	Groupe 1	$2,2 \times 10^4$	$8,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$
	Groupe 2	$2,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$9,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$
	Groupe 3	$2,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$7,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$
	Groupe 4	$2,2 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$
Gérmes psychrotrophes	Témoin	$9,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
	Groupe 1	$9,1 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	00	00
	Groupe 2	$9,1 \times 10^2$	$6,8 \times 10^2$	00	00
	Groupe 3	$9,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	00	00
	Groupe 4	$9,1 \times 10^2$	00	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	Témoin	10^6	$1,73 \times 10^8$	$1,90 \times 10^8$	$2,30 \times 10^8$
	Groupe 1	10^6	$7,41 \times 10^3$	$8,68 \times 10^3$	$9,14 \times 10^3$
	Groupe 2	10^6	$1,48 \times 10^4$	$7,73 \times 10^3$	$1,45 \times 10^4$
	Groupe 3	10^6	$1,24 \times 10^4$	$6,27 \times 10^3$	$8,91 \times 10^3$
	Groupe 4	10^6	$8,95 \times 10^3$	$8,95 \times 10^3$	$3,41 \times 10^3$

Valeurs sont exprimés en moyenne de deux répétitions ; Groupe 1 : (0,2% /4°C) ; Groupe 2 : (0,2%/ T° abusive) ; Groupe 3 : (0,4% /4°C) ; Groupe 4 : (0,4%/ T° abusive).

5.3. Dénombrement des *Staphylococcus aureus*

Dans la présente étude, l'aspect des colonies de *Staphylococcus aureus* dénombrées sur milieu Baird Parker est rondes brillantes, la taille est moyenne et la couleur est noires (Figure 14).

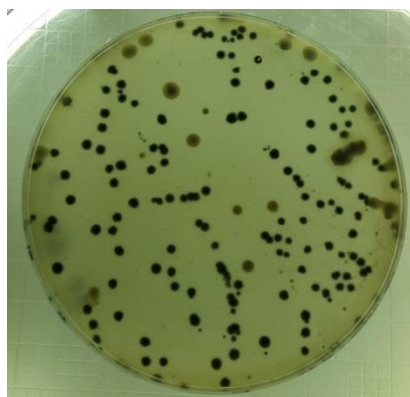
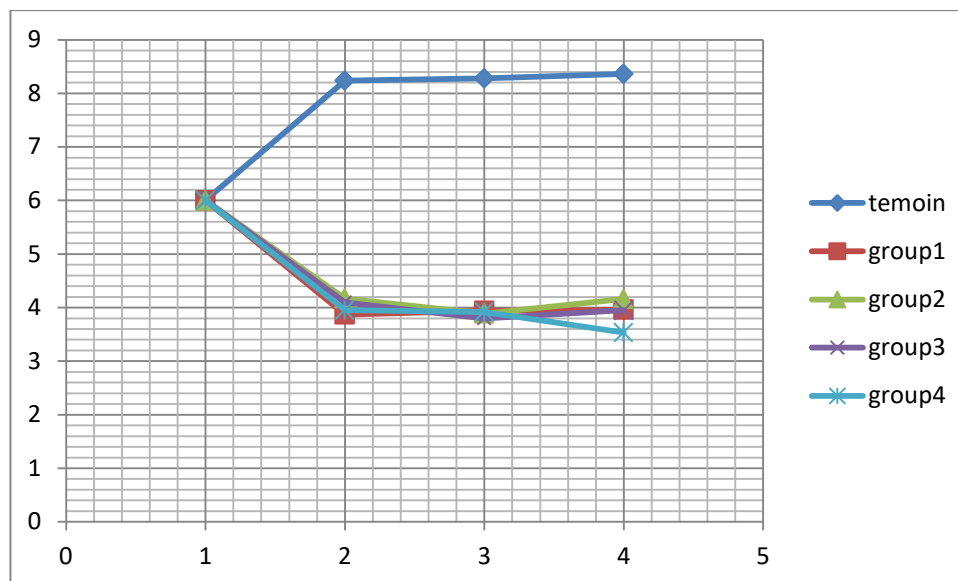


Figure 14 : Aspect de *Staphylococcus aureus* sur milieu Baird Parker

Le tableau 7 montre les résultats de dénombrement des *Staphylococcus aureus* dans la mousse au chocolat traitée par l'huile essentielle de *Mentha spicata* et conservée pendant 72 h à 4°C. La charge initiale des *S. aureus* inoculée dans la mousse au chocolat est égale à 10^6 UFC/g. L'addition de l'HE de *M. spicata* a montré une nette réduction de la croissance de *S. aureus* dans la mousse au chocolat pendant toute la durée de stockage, par rapport au témoin. Au cours du premier jour de stockage, une réduction d'environ $4 \log_{10}$ de la croissance de *S. aureus* a été observée dans les groupes traités, tandis qu'une faible augmentation a été enregistrée après 48 h de stockage dans le groupe 1 (0.2% HE / 4° C) et le groupe 4 (0.4% d'HE / température abusive), par rapport aux autres groupes traités. À la fin du temps de stockage, la croissance de *S. aureus* est restée stable et n'a pas dépassé $4 \log_{10}$ CFU/g dans tous les groupes traités avec l'HE de *M. spicata*. Le nombre le plus faible de *S. aureus* (3.41×10^3 CFU/g) a été enregistré pour le groupe 4 traité avec 0.4% d'HE/température abusive. D'une manière générale, il faut souligner que l'HE de *M. spicata* a montré une réduction de la croissance de *S. aureus* dans la mousse au chocolat sans effets remarquables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage (**Tableau 7, Figure 15**).



T : Témoin ; Groupe 1 : (0,2% /4°C) ; Groupe 2 : (0,2% / T° abusive) ; Groupe 3 : (0,4% /4°C) ; Groupe 4 : (0,4% / T° abusive).

Figure 15: Courbe de croissance de *Staphylococcus aureus* durant la période de conservation de la mousse au chocolat

5.4. Dénombrement des germes aérobies à 30°C

La figure 16 montre l'aspect des colonies de germes aérobies totaux obtenus sur milieu PCA. La forme est ronde et lenticulaire en masse; la taille est petite et la couleur est blanchâtre crémeuse.

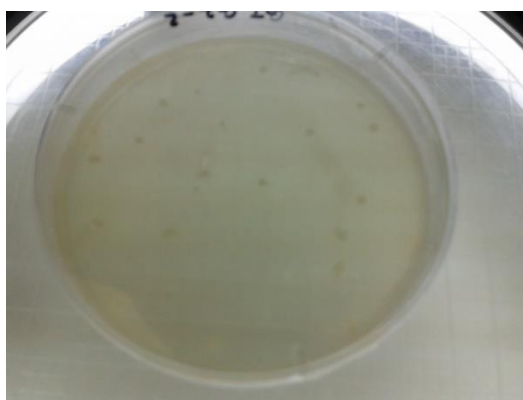
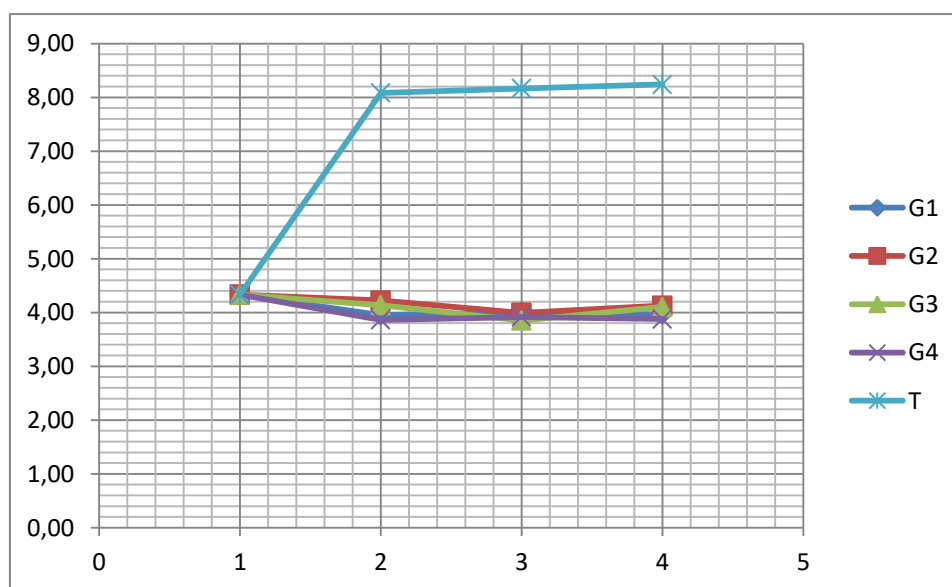


Figure 16 : Résultats de germe aérobie totaux sur milieu PCA

Le tableau 7 montre les résultats de dénombrement des germes aérobies totaux dans la mousse au chocolat traitée par l'huile essentielle de la menthe verte. La charge initiale des

germes totaux est égale à 2.2×10^4 UFC/g de mousse au chocolat. Après l'incorporation de l'HE de *M. spicata*, cette charge a montré une nette réduction dans les groupes traités pendant toute la durée de stockage, par rapport au témoin (**Tableaux 7**). Après 24 h de stockage, une réduction de $4 \log_{10}$ UFC/g a été observée dans tous les groupes traités avec l'HE de *M. spicata*, notamment le groupe 1 (0.2% HE / 4° C) et le groupe 4 (0.4% d'HE / température abusive). Cette réduction des germes totaux s'est poursuivie jusqu'à la fin du temps de stockage, à l'exception des groupe 1 et 4 qu'ont montré une légère augmentation. A la fin de la période de stockage, une nette réduction de $4 \log_{10}$ UFC/g a été observée dans tous les groupes traités avec l'HE de *M. spicata* par rapport au témoin, enregistrant la plus faible charge (7.5×10^3 UFC/g) dans le groupe 4 traité par 0.4% de *M. spicata* sous température abusive. Notons que pendant le temps de stockage réfrigérée, les charges des germes totaux dans les groupes traités par l'HE *M. spicata* n'ont pas dépassées les limites critiques fixées par le **JORADP (2017)**, et cette huile a effectivement réduit la croissance des germes totaux dans la mousse au chocolat sans montrer d'effets notables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage (**Figure 17**).

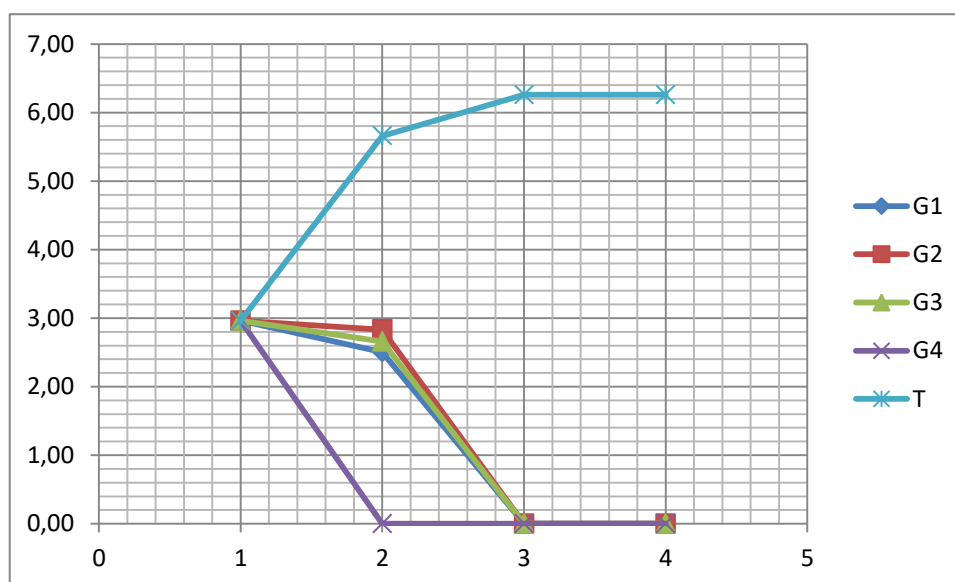


T : Témoin ; Groupe 1 : (0,2% /4°C) ; Groupe 2 : (0,2%/ T° abusive) ; Groupe 3 : (0,4% /4°C) ; Groupe 4 : (0,4%/ T° abusive).

Figure 17: Courbe de croissance des germes aérobies mésophiles totale durant la période de conservation de la mousse au chocolat

5.5. Dénombrement des germes psychrotrophes

La charge initiale des germes psychrotrophes est 9.1×10^2 UFC/g dans la mousse au chocolat. Après 24 h de stockage, une nette réduction a été observée dans tous les groupes traités par l'HE de *M. spicata*, par rapport au témoin, qui a montré une augmentation rapide pendant la période de stockage, enregistrant la charge la plus élevée de 1.8×10^6 UFC/g (**Tableau 7**). L'incorporation de l'HE de *M. spicata* a inhibé la croissance des germes psychrotrophes dans les groupes traités après 48 h de conservation jusqu'à la fin de la période de stockage. De façon notable, l'ajout de l'HE *M. spicata* a effectivement inhibé la croissance des psychrotrophes dans la mousse au chocolat pendant le temps de stockage sans montrer d'effets remarquables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage (**Figure 18**).



T : Témoin ; Groupe 1 : (0,2% /4°C) ; Groupe 2 : (0,2% / T° abusive) ; Groupe 3 : (0,4% /4°C) ; Groupe 4 : (0,4% / T° abusive).

Figure 18 : Courbe de croissance des germes psychrotrophes durant la période de conservation de la mousse au chocolat

5.6. Discussion

Conformément à nos résultats, la quantité d'huile essentielle obtenue à partir de *M. spicata* récoltée dans deux autres régions d'Algérie était de 1,04% (**Bardaweel et al., 2018**) et de 1,1% (**Brahmi et al., 2016**). Cependant, **Alexopoulos et al. (2011)** et **Xylia et al. (2017)** ont montré des taux très élevés avec respectivement 2,3% et 2,58%. Dans la présente étude, l'HE de menthe verte était également caractérisée par la dominance de carvone (53,3%), cette observation est en accord avec d'autres auteurs, tels que **Houicher et al. (2016)** et **Bardaweel et al. (2018)**, qui ont trouvé des taux en carvone de 52,2 et 49,5% dans l'atlas saharien, respectivement, tandis que **Brahmi et al. (2016)** ont enregistré un taux de 48,5% dans la province de Bejaia (région nord-est de l'Algérie). Cependant, la quantité de carvone obtenue à partir de *M. spicata* dans la présente étude était inférieure par rapport aux travaux précédents, à savoir 78,76% (**Shahbazi, 2018**) et 76,6% (**Chauhan et al., 2009**). Malgré le taux modéré en carvone dans notre échantillon, il a été signalé que les activités biologiques de l'huile de menthe verte sont préservées lorsque la carvone est supérieure à 51% alors que le limonène est également présent (**Chrysargyris et al., 2017**). Cette variation dans la composition de l'HE peut être attribuée à divers facteurs tels que le chemotypes, les paramètres géographiques et climatiques (humidité, précipitations, température, altitude, durée d'ensoleillement, etc.), ainsi que le type de sol, l'âge des feuilles, le régime de fertilité et la méthode utilisée pour sécher le matériel végétal et extraire l'huile essentielle (**Brahmi et al., 2016**).

L'utilisation des huiles essentielles de *M. spicata* dans des matrices alimentaires est souvent limitée en raison de considérations de goût et d'arôme. L'efficacité de ces substances se diminue lorsqu'elles sont ajoutées à des matrices alimentaires compliquées par rapport aux milieux microbiologiques. **Kavas et al. (2014)** ont rapporté que l'ajout de l'huile essentielle de menthe à un film comestible en concentrations de (2 %, 3 % et 4 %) avait un effet positif sur la prolongation de la durée de conservation du fromage, et les bactéries les plus sensibles étaient *S. aureus* et *L. monocytogenes*. En accord avec nos résultats, **Shahbazi et al. (2019)** ont étudié l'effet de l'huile essentielle de *M. spicata* (0,1 et 0,2%) contre *S. aureus* dans la soupe de poisson dans différentes conditions de stockage. Ils ont constaté que les groupes traités avec 0,2% d'huile essentielle de menthe verte présentaient les meilleurs effets et retardaient la croissance de *S. aureus* pendant le temps de stockage et ces effets étaient plus élevés sous réfrigération et à la température abusive

que la température ambiante. Dans une étude (Xylia et al., 2017), l'application de l'HE de menthe verte à la concentration la plus élevée (0,1%) a réduit significativement la croissance de *S. aureus* (0,30 log UFC/g) dans l'endive (*Cichorium endivia* L.) au jour 0, tandis que sa croissance a été observée les jours suivants. Plusieurs auteurs ont également évalué *in vitro* l'effet des huiles essentielles de menthe verte contre les bactéries pathogènes et d'altération d'origine alimentaire. *S. aureus* a montré une sensibilité élevée envers l'HE de *M. spicata* (Scherer et al., 2013; Ozguven et al., 1998). Cependant, Nikšić et al. (2018) et Şarer et al. (2011) ont signalé des activités modérées de l'huile de menthe verte contre cette bactérie. En général, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de menthe verte peut être attribuée à la présence de concentrations élevées de monoterpènes oxygénés, en particulier la carvone (Scherer et al., 2013), ce qui est en accord avec nos résultats où la carvone était le principal composé de cette huile (53,3%).

En effet, les produits de pâtisseries à base de lait et d'œufs comme la mousse au chocolat sont d'excellents milieux nutritifs pour la croissance microbienne, ce qui nécessite non seulement une matière première appropriée mais également un stockage dans des conditions de réfrigération. Dans cette étude, l'incorporation de l'huile de *M. spicata* dans la mousse au chocolat a inhibé la croissance des germes psychrotrophes et réduit la croissance de germes totaux à un niveau inférieur aux limites critiques fixées par le JORADP (2017). Similairement, une contamination élevée de coliformes (61,84%), de staphylocoques (48,68%) et de levures (27,63%) a été observée par Sharifzadeh et al. (2016) dans presque tous les échantillons des pâtisseries fourrées. Des études sur l'évaluation de la contamination microbienne des crèmes pâtisseries dans la ville d'Arak en Iran montrent une forte contamination microbienne de ces produits à 95,8 % par des entérobactéries, des moisissures, des levures et par *E. coli*. Selon Shahbaziet al. (2017), l'incorporation d'huile essentielle de *M. spicata* à trois concentrations différentes (0,5, 1 et 1,5 % v/w) a diminué la charge microbienne finale des bactéries mésophiles, des psychrotrophes totales, des *Pseudomonas* spp., des *Enterobacteriaceae*, et des *L. monocytogenes* d'environ 1 à 4 log CFU/g dans la viande de chameau hachée.

Dans la présente étude, l'utilisation de température abusive a été choisie pour simuler une perturbation ou une rupture de la chaîne de froid lors d'une ou plusieurs étapes du stockage de la pâtisserie fraîche, du transport et du stockage en confiserie ou en réfrigérateur domestique. De plus, les *S. aureus* se développent et produisent des toxines à

des températures généralement supérieures à celles utilisées pour la réfrigération (**Hernando et al., 2015**). Il faut souligner que l'HE de *M. spicata* a montré une réduction de la croissance de *S. aureus*, des germes aérobies mésophiles et des germes psychrotrophes dans la mousse au chocolat sans effets remarquables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage. **Alonso-Hernando et al. (2015)** ont étudié l'effet des différents traitements de décontamination sur la croissance des bactéries Gram positifs (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Brochothrix thermosphacta*) dans des cuisses de poulets conservés dans des conditions de température différentes. Ils ont trouvé que les composés de décontamination sont plus efficaces lorsque les cuisses de poulet étaient stockées dans des conditions de température abusive. **Herten et al (1998)** ont confirmé que la production de toxines par *S. aureus* semble être davantage influencée par la température de croissance que par la compétition bactérienne, tandis que **Tajik et al. (2014)** ont trouvé que les principaux composants antimicrobiens des huiles essentielles sont moins dissous lorsqu'ils sont exposés à la réfrigération.

*Conclusion et
perspectives*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a permis d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de *Mentha spicata*, et d'évaluer la croissance de *Staphylococcus aureus* inoculée dans la mousse au chocolat ainsi que les charges des germes aérobies mésophiles et psychrotrophes après l'addition de différentes concentrations de l'huile de la menthe verte (0.2 et 0.4%) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive.

Le rendement en huile essentielle extraite par hydrodistillation de la partie aérienne de *M. spicata* est de 0.9 % (w/w). L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis d'identifier 4 composés majoritaires qui sont : Carvone (53%), D-limonene (16.9%), Eucalyptol (8.9%) et Terpinen-4-ol (2.7%). L'addition de l'HE de *M. spicata* a montré une nette réduction de la croissance de *S. aureus* dans la mousse au chocolat pendant toute la durée de stockage, par rapport au témoin. De plus, cette huile a effectivement réduit la croissance des germes totaux et inhibé la croissance des germes psychrotrophes dans la mousse au chocolat sans montrer d'effets notables entre les concentrations de l'HE et/ou les conditions de stockage.

En général, les crèmes pâtisseries comme la mousse au chocolat sont l'une des produits sensibles à l'altération microbienne et peuvent transmettre des agents pathogènes aux humains. Dans la présente étude, l'ajout de l'HE *M. spicata* a effectivement réduit la croissance de *S. aureus*, des germes psychrotrophes et des germes totaux. En général, l'étude présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose l'application de l'HE de *M. spicata* comme alternative aux additifs synthétiques dans les produits pâtisseries pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et améliorer la qualité des produits. Cependant, des études toxicologiques et des enquêtes réglementaires sont nécessaires avant d'utiliser cette huile comme additif alimentaire.

Cette étude primaire nécessite d'être poursuivie par d'autres travaux complémentaires et qui peuvent être envisagées comme perspectives :

- Evaluer la qualité organoleptique des produits pâtisseries après l'ajout de l'HE de *M. spicata* à des différentes concentrations afin de déterminer la limite d'acceptabilité;
- Etudier l'effet de l'HE de *M. spicata* sur la production de toxines staphylococciques dans les matrices alimentaires ;

- et enfin, tester de l'effet de l'HE de *M. spicata* sur la croissance des germes pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires collectives, notamment *E-coli*, *Salmonella* et *Listeria*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams Uartin R. & Moss Maurice O. (2008). Food Microbiology. 3^{ème} édition, The Royal Society Of Chemistry, USA, 447.

AFNOR. (2000). Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. paris

Alexopoulos A., Kimbaris A. C., Plessas S., Mantzourani I., Theodoridou I., Stavropoulou E. & Bezirtzoglou E. (2011). Antibacterial activities of essential oils from eight Greek aromatic plants against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Anaerobe*, 17(6), 399-402.

Alonso-Hernando A., Alonso-Calleja C., Capita R. (2015). Effect of various decontamination treatments against Gram-positive bacteria on chicken stored under differing conditions of temperature abuse. *Food Control*, 47, 71-76

Asadi S., Maram Z R. & Kooshk F. (2015). Evaluation of microbial contamination of pastry cream in Arak city of Iran. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 1(1), 26-29.

Attokaran M. (2017). Natural Food Flavors And Colorants. Edtion Ghon Weilley And Songs Ltd And The Institute Of Food Technologists, Chicago, 416.

Avato P., Sgarra G .Et Casadoro G. (1995). Chemical Composition of The Essential Oils Of *Mentha* Species Cultivated In Italy. *Science Parmaceutica*, 63, 223-223.

Balz R. (1999). The Healing Power Of Essential Oils Fragrance Secrets For Everyday Use. Edtion Motilal Banarsidass Publishers Private Limited, Delhi, 203.

Bardaweel S K., Bakchiche B., Husam A., Salamat A L., Rezzoug M, Gherib A. & Flamini G. (2018). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata L.* (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2-7.

Bardeau F. (2009). Les Huiles Essentielles Santé Pratique. Edtion Lanore, France, 315.

Batt C A. & Tortorello M. (2014). Encyclopedia Of Food Microbiology. 2^{ème} Edition, Elsevier Lid Unless Stated, Amsterdam, 3248.

Bellec J F., Chaing V., Drzewiecki E., Dugast A., Marcelino V. (2009). La qualité dans la filière de la pâtisserie. Retrieved January, 10, 2014.

Bhunja A K. (2007). Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms And Pathogenesis. Springer Science Et Business Media LLC, USA, 276.

Bibek R. (2004). FUNDAMENTAL FOOD MICROBIOLOGY. 3^{ème} édition, CRC Press, london, 353.

Bleu C. (2011). Patisserie and Baking Foundations, The Chef of Le Cordon Bleu. 1st edition, Delmar Cenage Learning, USA, 34.

Boudreau A. & Ménard G. (1992). Le blé : Eléments fondamentaux et transformation. Presses Université Laval, Québec. 443.

Brahmi F., Adjaoud A., Marongiu B., Falconieri D., Drifa Y., Madani K. & Anonyme M C., (2016). Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential oil research*,1-10.

British H P. (1990). British Herbal Medicine Association.1st ed, Bournemouth, Dorset.

Bruneton G. (2009). Pharmcognosie, Phytochimie Plantes Médicinales. 4^{eme} Edition, Tec Doc Et Médicales International, Paris, 1292.

Burt S. (2004). Essential oils: their antimicrobial properties and potential application in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

Chauhan R., Kaul S., Shahi M K., Kumar A K., Ram A G. & Tawa A. (2009). Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIM (J) 26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial crops and products*, 29(2-3), 654-656.

Chelbana A R. (2013) . The advanced art of baking and pastry . Edition willey, USA , 496.

Chrysargyris A., Xylia P., Botsaris G. & Tzortzakis N., (2017). Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, 103, 202-212.

Cliver D O. & Rienmann H P. (2002). Foodborn Disease. 2nd édition, Academy Press An Imprint Of Elsever Science, Amsterdam, 411.

Da Silva N., Taniwaki M H., Janqueira V C., Silveira N., Da Nascimento M., Abeilar R., Gomes R. (2012). Microbiological Examination Methods Of Food And Water . A Laboratory Manual et CRC Press, 484.

Delarras C. (2007). « Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou De Contrôle Sanitaire ». Tec Et Doc Et Lavoisier, Paris.

Domaracky M., Rehak P., Juhas Š., Koppel J. (2007). Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth and Development of Mouse Preimplantation Embryos In Vivo Physiol. *Reserch*, 56, 97-104.

Ensminger M E., Ensminger A H., (1993). Food and nutrition encyclopedia. 2nd edition, CRC press, London, 2415.

- Foote R., Coulthard P., Groves T., Kenyon B., Klaasen D., Rabone P., Stevenson D., Tallon H., Ware M. (1996), Food Preparation And Cooking : Cookery Units. Student Guide . 2nd édition, City and Guilds, USA, 442.
- Foster S. & Duke J A. (2000). A Field To Medicinal Plants And Herbs Of Eastern And Central North America. 2nd Edition, Houghton Mifflin Company, Boston, 411.
- Franchomme P. & Pénoël D. (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois Éditeur, France.
- Freeman- cook I. & Freeman-cook K. (2005). *Staphylococcus aureus* Infection. Edition Chelsea House Publishers, USA, 182.
- Garg N., Garg K L., Mukerji K G. (2010). Laboratory Manual of Food Microbiology. Edition I.K. international publishing house Pvt, New Delhi, 208.
- Gyawali R. & Ibrahim S A. (2014). Natural products as antibacterial agents. *Food control*, 46, 412-429.
- Hanneman L J. (2009). Pâtisserie. 2nd édition, published by Elsevier, 352.
- Harrigan W F. (1998). Laboratory Methods In Food Microbiology .3eme Edition, Academy Press Limited, London, 532.
- Herten B., Board R G. & Mead G C. (1989). Conditions affecting growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* on temperature-abused chicken meat. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 145-148.
- Hervé T. (2008). Dans la famille « mousses au chocolat. Chimie des aliments et du goût. l'actualité chimique, 319,10-13.
- Houicher A., Hechachna H., Teldji H. & Ozogul F. (2016) . In vitro study of the antifungal activity of essential oils obtained from *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris* and *Laurus nobilis*. Recent Patents on Food. *Nutrition & Agriculture*, 8 (2), 99 -106.
- Hussain A., Anwar F., Nigam P S., Ashraf M. & Gilanif A H. (2010). Seasonal variation in content, Chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. *Society of Chemical Industry*, 90, 1827–1836.
- ICMSF. (1996). Microorganisms In Food 5 : Characteristics Of Microbial Pathogens, Springer Science Et Business Media, New York, 513.
- ICMSF. (2012). Microbiology ecology of food volume 2 food commodities .academy press, New York, 687.
- Jamaluddin. & Naveen M. (2007). General Microbiology, Scientific Publishers, India, 419.

Jeannette M., Norbert G., Jean-Claude R., Schumacher H. (1999). Guide de bonnes pratiques d'hygiène pour boulangers-pâtisseries. Chambre des Métiers, 74.

Judd S., Campbell S., Kelloga A., Stevens P. (1999). Botanique systématique. Edition de Boek, Paris, 323.

Kavas G. & Kavas N. (2014). The effects of mint (*Mentha spicata*) essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of lor cheese. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12 (3&4), 40-45.

Kiger J L. & Kiger J G. (1968). Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie boulangerie industrielles et artisanales et des produits de régime, par JL Kiger, JG Kiger, Dunod.

Lavabre M. (1996). Aromatherapy Workbook. Edition Healing Arts Press Rochester et Vermont, Canada, 192.

Le Loir Y., Baron F. & Gautier M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1), 63-76.

Le loir Y. & Gautier M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Edition Médicales internationales et TEC & DOC, Paris, 283.

Lenôtre G. (2006). École Lenôtre La Pâtisserie Pastry-making Grands Classiques et Créations / Classics and Creations. Éditions Jérôme Vilette, Les Lilas, France, 171.

Millet J. & Cabut J. (1997). Guide de Bonnes Pratiques d'Hygiène en Pâtisserie - Réalisé par la Confédération Nationale de la Boulangerie et Boulangerie-Pâtisserie Française et par la Confédération Nationale de la Pâtisserie-Confiserie-Chocolaterie-Glacierie de France, 7.

Montero Á P. (2015). Antifungal Chitosan-Based Films And Coatings Containing Essential Oils For Fruit Applications, Doctoral Thesis, Universidad perteneciente al Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València.259.

Nathaniel L B. & Addison B. (1898) .An Illustrated Flora Northaniel United States Canada. Édition Copyright, New York, 588.

Neyrat P., Georges P., Christophe Q., Michel M. (2006). Les pâtisseries – le petit Larousse de la cuisine 1800 recettes, Edition 2005, Paris, 963.

Nikšić, Ha., Durić K., Omeragić E., Nikšić He., Muratović S., Bečić F. (2018). The Combined Effect of *Mentha spicata* Essential Oil and Nisin Against *Listeria monocytogenes*. *Pharmaceutical Sciences*, 21, 178-183.

Pajohi-Alamoti M., Rezaei A. & Mahmoudi R. (2016). Microbial contamination of pastry cream: Evidence from Iran. *Archives of hygiene sciences*, 5(3), 207-213.

- Prabuseenivasan S., Jayakumar M. & Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oil. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, 6, 39.
- Quezel P., Santa S. (1962). Nouvelle Flore De l'Algérie Et Des Régions Désertique Méridionales. Edition Du Centre Nationale De La Recherche Scientifique, Paris, 1170.
- Ravandran P N. (2017).The Encyclopedia of Herbs And Spices . Édition CAB international, London, 1176.
- Ray B. & Bhunia A. (2013). Fundamental Food Microbiology. 5^{ème} Edition, Taylor Et Francis Group, Boca Raton, 577.
- Sails A. (2014). Molecular Medical Microbiology. 2^{ème} Edition, Academy Press, 2216.
- Samaranayake L. (2012). Essential Microbiology For Dentistry. 4^{ème} Edition, Churchill Livingstone Elsevier, China, 367.
- Sarer E., Toprak S Y., Otlu B., Durmaz R. (2011). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Mentha spicata L.* subsp. *spicata*. *Jornal Essential Oil Research*, 23, 106–108.
- Scherer R., Lemos M. F., Lemos M. F., Martinelli G C., Martins J. D L. & da Silva A G. (2013). Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata L.*). *Industrial crops and products*, 50, 408-413.
- Shahbazi Y. & Shavisi N. (2018). Chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil and zinc oxide nanoparticle for shelf life extension of rainbow trout fillets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(9), 986-997.
- Shahbazi Y. & Shavisi N. (2019). Antimicrobial effects of *Mentha spicata* essential oil and methanolic carrot extract against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in fish soup. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 5(1), 32-38.
- Shahbazi Y., Karami N., Shavisi N. (2017). Effect of *Mentha spicata* essential oil on chemical, microbial, and sensory properties of minced camel meat during refrigerated storage. *Jornal Food Safety*, 38(2375), 1-7.
- Sharifzadeh A., Hajsharifi-Shahreza M., Ghasemi-Dehkordi P. (2016). Evaluation of Microbial Contamination and Chemical Qualities of Cream-filled Pastries in Confectioneries of Chaharmahal Va Bakhtiari Province (Southwestern Iran). *Osong Public Health Res Perspect*, 7(6), 346-350.
- Sokovic M., Marin P D., Brkic D. & van Griensven L J. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against human pathogenic bacteria. *Food*, 1(2), 220-226.

Sulieman, A M E., Abdelrahman S E. & Abdel Rahim A M. (2011). Phytochemical analysis of local spearmint (*Mentha spicata*) leaves and detection of the antimicrobial activity of its oil. *Journal of Microbiology Research*, 1(1), 1-4.

Tajik H., Farhangfar A., Moradi M. & Rohani S M R. (2014). Effectiveness of clove essential oil and grape seed extract combination on microbial and lipid oxidation characteristics of raw buffalo patty during storage at abuse refrigeration temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1-8.

Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A. & Nazemi J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17, 142-14.

Vasanthakumari R., (2007). Textbook Of Microbiology. BI Publication Pvt Ltd, New Delhi, 524.

Warnke P H., Lott A J S., Sherry E., Wiltfang J. & Podschun R. (2013). The ongoing battle against multi-resistant strains: In-vitro inhibition of hospital-acquired MRSA, VRE, Pseudomonas, ESBL *E.coli* and Klebsiella species in the presence of plant-derived antiseptic oils. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 41, 321-326.

Wilderjans E., Luyts A., Brijs K., Delcour J A. (2013). Ingredient functionality in batter type cake making. *Trends in food science & technology*, 30(1), 6-15.

Wiley V. (2017). Ullmann's Food And Feed. Willey Vch Verlag Gmbh And Cor et Kga Boschstr, Germany, 157.

Xylia M., Leduc S., Patrizio P., Kraxner F. & Silveira S. (2017). Locating charging infrastructure for electric buses in Stockholm. *Transportation Research Part C: Emerging Technologies*, 78, 183-200.