



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 : Oudenani Bouchra

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

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

L'effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) sur la croissance des *Staphylococcus aureus* dans la mousse au chocolat réfrigérée

Soutenu le 28/06/2020

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mr. Adamou Ala-Eddine	Professeur	Président
Mr. Goudjal Yacine	MCA	Examineur
Mr. Houicher Abderrahmane	MCA	Rapporteur

Promotion : Juin – 2020

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عمار تليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: وذناني بشرى

ميدان: علوم الطبيعية والحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية ومراقبة النوعية

موضوع البحث

تأثير الزيت الأساسي لنبات النعناع البري (*Mentha pulegium* L.)
على نمو *Staphylococcus aureus* في رغوة الشوكولاتة المبردة

نوقشت بتاريخ 28 جوان 2020

أعضاء لجنة المناقشة:

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية:	الصفة
السيد عظامو علاء الدين	استاذ تعليم عالي	رئيسا
السيد قوجال ياسين	أستاذ محاضر "أ"	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	أستاذ محاضر "أ"	مقررا

الدفعة: جوان – 2020

Remerciement

Avant tout, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance au Dr. Houicher Abderrahmane de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet, et pour sa présence, ses précieux conseils et ses orientations, et pour toute l'aide scientifique et technique. Et je lui souhaite la santé et le bonheur.

Nos remerciements sont adressés aux membres de jury Pr. Adamou Ala-Eddine et Dr. Goudjal Yacine pour avoir bien voulu accepter de juger ce modeste travail.

Mes vives gratitudes vont aussi au Dr. Berramdane Tayeb et aux ingénieurs travaillant au laboratoire de sciences agronomiques Mr. Benchaoui Hadj Aissa et Mlle. Renane Zahra pour leurs conseils et leurs aides.

Je veux également remercier mes collègues Mlle. Rahmania Fatima et Mlle. Ghazel Safia pour leurs aides.

Le plus grand merci revient à mes très chers parents, qui m'ont toujours encouragé, et à toute ma famille, pour leur soutien moral et leurs conseils. Que Dieu les protège et les garde en bonne santé.

Enfin, Je tiens à remercier aussi tous ceux qui ont collaboré à la réalisation de ce modeste travail.

Bouchra

Nom et Prénom : Oudenani Bouchra

Thème : L'effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) sur la croissance des *Staphylococcus aureus* dans la mousse au chocolat réfrigérée

Résumé

L'objectif principal de la présente étude était d'une part de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de *Mentha pulegium*, et d'autre part 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 (0.2 et 0.4%) de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive. Le rendement moyen en huile essentielle de la partie aérienne de *Mentha pulegium* est de 0.8% (v/w). L'analyse chromatographique par CG/SM de l'HE a permis d'identifier 4 composés majoritaires de l'HE de *Mentha pulegium* qui sont : Piperitenone (41.4%), Pulegone (27.1%), Piperitone (9%) et cis-Menthone (9.1%). D'autres composés sont également présents dans l'huile *Mentha pulegium*, mais à des teneurs moins importantes. L'incorporation de l'HE de *Mentha pulegium* a effectivement réduit la croissance de *Staphylococcus aureus* dans la mousse au chocolat pendant le temps de stockage, sans montrer d'effets remarquables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage. De plus, le traitement de la mousse au chocolat avec l'huile de *Mentha pulegium* a inhibé la croissance des germes psychrotrophes et réduit la croissance des germes aérobies mésophiles à un niveau inférieur aux limites critiques fixées par la réglementation nationale. L'étude présente également un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle suggère l'utilisation de l'HE de *Mentha pulegium* comme alternative aux conservateurs synthétiques dans les produits de pâtisserie pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et améliorer la sécurité et la qualité des produits.

Mots clé : *Mentha pulegium* ; Huile essentielle ; *Staphylococcus aureus* ; Mousse au chocolat ; Température abusive

Name and surname: Oudenani Bouchra

Theme : The effect of pennyroyal essential oil (*Mentha pulegium* L.) on the growth of *Staphylococcus aureus* in chilled chocolate mousse

Abstract

The main objective of the present study was on the one hand the determination of the chemical composition of the essential oil (EO) of *Mentha pulegium*, and on the other hand the evaluation of the growth of *Staphylococcus aureus* inoculated in the chocolate mousse as well as the counts of aerobic mesophilic and psychrotrophic bacteria after the addition of different concentrations of pennyroyal EO (0.2 and 0.4%) during its storage at 4 °C and at the abused temperature. The average essential oil yield of the aerial part of *Mentha pulegium* was 0.8% (v/w). The major compounds of *Mentha pulegium* EO characterized by CG/SM were Piperitenone (41.4%), Pulegone (27.1%), Piperitone (9%) and cis-Menthone (9.1%). Other compounds are also present in *Mentha pulegium* oil, but at lower levels. The incorporation of the *Mentha pulegium* essential oil effectively reduced the growth of *Staphylococcus aureus* in the chocolate mousse during the storage time, without showing remarkable effects between the concentrations and/or the storage conditions. In addition, the treatment of chocolate mousse with *Mentha pulegium* EO inhibited the growth of psychrotrophic bacteria and reduced the growth of aerobic mesophilic counts under the critical limits set by national regulations. This study is also of great interest for the food industry because it suggested the use of essential oil of *Mentha pulegium* as an alternative to synthetic preservatives in pastry products to control food borne pathogens and improve product safety and quality.

Key words: *Mentha pulegium*; Essential oil; *Staphylococcus aureus*; Chocolate mousse; Abused temperature

الاسم و اللقب: بشرى وذناني

الموضوع: تأثير الزيت الأساسي لنبات النعناع البري (*Mentha pulegium* L.) على نمو *Staphylococcus aureus* في رغوة الشوكولاتة المبردة

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة من ناحية تحديد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لنبات النعناع البري (*Mentha pulegium* L.)، ومن ناحية أخرى لتقييم نمو *Staphylococcus aureus* المزروعة في رغوة الشوكولاتة وكذلك الجراثيم الكلية المحبة للحرارة المتوسطة والجراثيم المحبة للبرودة بعد إضافة تركيزات مختلفة (0.2 و 0.4٪) من الزيت الأساسي من النعناع البري أثناء تخزينه عند 4 درجات مئوية وفي درجة الحرارة المتقطعة. متوسط إنتاج الزيت الأساسي للجزء الهوائي من النعناع البري هو 0.8٪ (ح/و). سمح التحليل الكروماتوجرافي بواسطة CG/SM للزيت الأساسي من تحديد 4 مركبات رئيسية للزيت الأساسي للنعناع البري وهي: (41.4٪) Piperitenone، Pulegone (27.1٪) Piperitone (9٪) و cis-Menthone (9.1٪). توجد مركبات أخرى أيضًا في زيت النعناع البري، ولكن عند مستويات أقل. أدى دمج الزيت الأساسي للنعناع البري إلى تقليل نمو *Staphylococcus aureus* بشكل فعال في رغوة الشوكولاتة خلال وقت التخزين، دون إظهار تأثيرات ملحوظة بين التركيزات و/ أو ظروف التخزين. بالإضافة إلى ذلك، أدى علاج رغوة الشوكولاتة بزيت النعناع البري إلى تثبيط نمو الجراثيم المحبة للبرودة وخفض نمو الجراثيم الكلية المحبة للحرارة المتوسطة إلى مستوى أقل من الحدود الحرجة التي وضعتها اللوائح الوطنية. كما أن الدراسة ذات أهمية كبيرة لصناعة الأغذية لأنها تقترح استخدام الزيت الأساسي للنعناع البري كبديل للمواد الحافظة الاصطناعية في منتجات المعجنات للسيطرة على مسببات الأمراض من أصل غذائي وتحسين سلامة وجودة المنتج.

الكلمات المفتاحية:

Mentha pulegium؛ زيت أساسي؛ *Staphylococcus aureus*؛ رغوة الشوكولاتة؛ درجة حرارة متقطعة

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Partie bibliographique

Chapitre 1 Les produits pâtisseries

1. Généralités 3

1.1. Définition de la pâtisserie 3

1.2. Les types de produits pâtisseries 3

1.2.1. Pâtisserie artisanale 3

1.2.2. Pâtisserie industrielle 3

1.3. Mousse au chocolat 3

1.4. Composition de mousse au chocolat 4

1.5. Fabrication de mousse au chocolat 4

1.6. La détérioration des produits pâtisseries 5

1.7. Prévention de l'altération des aliments 5

2. Risques sanitaires en pâtisserie 5

3. Hygiène et critères de qualité 6

3.1. L'hygiène alimentaire 6

3.2 Les critères de qualité 6

Chapitre 2 *Staphylococcus aureus*

1. Historique 8

2. Taxonomie 8

3. Habitat	8
4. Caractères bactériologiques	9
4.1. Morphologie	9
4.2. Biochimie	10
4.3. Culture	10
5. Facteurs de la croissance et la production d'entérotoxines	11
6. Pouvoir pathogène	11
6.1. Facteurs de virulence	12
6.2. L'intoxication staphylococcique	12
6.2.1. Les symptômes de l'intoxication alimentaire	13
6.2.2. Source de contamination des aliments	13
6.2.3. Aliments responsables de l'intoxication alimentaire aux staphylocoques	13
6.2.4. La prévention des intoxications alimentaires par les staphylocoques	14
Chapitre 3 Les huiles essentielles	
1. Définition d'huile essentielle	15
2. Composition Chimique	15
3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	15
4. Quelques propriétés des huiles essentielles	16
4.1. Activité antioxydante	17
4.2. Activité antimicrobienne	17
4.2.1. Activité antibactérienne	17
4.2.2. Activité antifongique	18
5. Utilisation des huiles essentielles	18
5.1. Dans les aliments et les boissons	18
5.2. Dans l'industrie pharmaceutique	18

6. La menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i> L.)	19
6.1. Description de la plante et classification	19
6.2. L'huile essentielle de la menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i> L.)	20
6.2.1. Composition	20
6.2.2. Utilisation	21
Partie expérimentale	
Matériel et méthodes	22
1. Matériel végétal	22
1.1 L'extraction de l'huile essentielle de (<i>Mentha pulegium</i> L.)	22
1.2 Détermination de la composition chimique d'huile essentielle	23
2. Matériel biologique	23
3. Préparation de la mousse au chocolat	24
4. Incorporation de l'huile essentielle et l'inoculum de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
dans la mousse au chocolat	
5. Analyse microbiologique	25
5.1. Réalisation de série des dilutions décimales	25
5.2. Recherche et dénombrement de microorganismes	26
5.3. Expression des résultats	27
Résultats et discussion	28
Résultats	28
1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle	28
2. Résultats de l'analyse microbiologique	30
Discussion	34
Conclusion	37
Références bibliographiques	39

Liste des abréviations

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HE	huile essentielle
HE_s	huiles essentielles
JORADP	Journal Officiel de la Republique Algerienne Democratique et Populaire
<i>M. pulegium</i>	<i>Mentha pulegium</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCA	Plate Count Agar
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1	Schéma de fabrication de la mousse	4
Figure 2	Micrographie électronique de cellules <i>S. aureus</i>	9
Figure 3	<i>S. aureus</i> avec coloration de Gram au grossissement 10x100	10
Figure 4	Représentation schématique de l'hydrodistillation	16
Figure 5	La plante de menthe pouliot	20
Figure 6	Montage d'un Hydrodistillateur de type Clevenger	22
Figure 7	L'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> obtenue par hydrodistillation	28
Figure 8	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	29
Figure 9	Aspect morphologiques de colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu de Baird Parker	31
Figure 10	Courbe de croissance de <i>S. aureus</i> durant la période de conservation de la mousse au chocolat	31
Figure 11	Courbe de croissance de germes aérobies mésophiles totale durant la période de conservation de la mousse au chocolat	32
Figure 12	Courbe de croissance des germes psychrotrophes durant la période de conservation de la mousse au chocolat	33

Liste des tableaux

Tableau 1	Critères microbiologiques applicables aux Pâtisseries	7
Tableau 2	Facteurs de croissance et de production d'entérotoxines par <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Tableau 3	Les principaux composés de l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	28
Tableau 4	Résultats d'analyse microbiologique de la mousse au chocolat inoculée par <i>S. aureus</i> et traitée par l'huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	30

Introduction

Les aliments que nous mangeons sont rarement, voire jamais stériles, ils portent des associations microbiennes qui survivent et interagissent dans les aliments au fil du temps **(Adams et Moss, 2008)**. Les aliments peuvent être porteurs de quelques germes pathogènes, qui causent des maladies après leur multiplication dans le corps humain **(Nout et al., 2003)**. La mousse au chocolat, est un dessert aéré à structure mousseuse stabilisée qui, bien que traditionnellement fait maison, est aujourd'hui produit à l'échelle industrielle et gagne de la place sur le marché des desserts **(Aragon-Alegro et al., 2007)**. Cependant, la non-conformité aux normes d'hygiène alimentaire peut entraîner une incidence accrue de contamination par des agents pathogènes d'origine alimentaire potentiels. La source de cette contamination comprend des ingrédients contaminés, un mauvais contrôle des temps et de la température de stockage, une contamination croisée pendant la préparation, un nettoyage inadéquat, de mauvaises pratiques de préparation des aliments et une contamination par des manipulateurs d'aliments infectés **(Smith et al., 2004)**. Les agents pathogènes d'origine alimentaire importants qui ont été à l'origine des épidémies d'intoxication alimentaire souvent présentes dans les produits de boulangerie comprennent essentiellement *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et plusieurs sérotypes d'*Escherichia coli*, dont O157: H7 **(Rumjuankiat et al., 2017; Smith et al., 2004)**.

S. aureus est l'une des causes les plus fréquentes d'infections d'origine alimentaire dans la plupart des pays du monde, sa pathogénicité est due aux toxines, au caractère invasif et à la résistance aux antibiotiques **(Bhatia et Zahoor, 2007)**. L'intoxication alimentaire par staphylocoques se caractérise par l'apparition rapide (2 à 6 h) des symptômes après la consommation d'aliments contenant des quantités appropriées d'entérotoxines. Pour cette raison, le contrôle de *S. aureus* dans les produits alimentaires est une question critique dans la politique de santé publique. De nos jours, les consommateurs ont montré un malaise croissant envers l'utilisation d'antimicrobiens synthétiques dans les aliments, en raison de leurs effets secondaires tels que la cancérogénicité et la tératogénicité. En conséquence, des agents antimicrobiens alternatifs naturels tels que les composés d'huiles essentielles de plantes aromatiques et d'autres extraits de plantes ont été utilisés pour inhiber la croissance de pathogènes d'origine alimentaire **(Gyawali et Ibrahim, 2014)**.

En raison de leur essence, de leur saveur, de leurs propriétés antimicrobiennes et de conservation, les huiles essentielles remplissent des fonctions antimicrobiennes, antioxydantes et aromatisantes lorsqu'elles sont appliquées aux aliments (**Akram et al., 2019**), et elles sont généralement reconnus comme sûr (Generally Recognized As Safe) (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles dérivées de différentes espèces de menthe comme la menthe pouliot, ont montré une activité antibactérienne significative contre les micro-organismes pathogènes humains, tels que *S. aureus* (**Salehi et al., 2018**).

Dans ce contexte, le but de la présente étude était d'une part de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, 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 pouliot (*Mentha pulegium* L.) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive. Cette étude se compose de 3 parties dont la première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les produits pâtisseries, les *S. aureus* et les huiles essentielles des plantes aromatiques, la deuxième est intéressée au matériel et aux méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, la dernière partie est traitée les différents résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que leur discussion, et enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Partie bibliographique

Chapitre 1

Les produits pâtisseries

1. Généralités

1.1. Définition de la pâtisserie

Les pâtisseries sont des préparations culinaires, rassemblant différents types d'ingrédients, qui sont généralement des produits déjà transformés comme la farine, la matière grasse, le fromage...etc (**Prost et al., 2000**). C'est un terme utilisé pour décrire tous les produits fabriqués par le pâtissier et le confiseur (**Hanneman, 2005**).

1.2. Les types de produits pâtisseries

1.2.1. Pâtisserie artisanale

Un produit pâtissier artisanal 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 (**Kiger et Kiger, 1968 cité par Mhamdi et Henanou, 2019**).

1.2.2. Pâtisserie industrielle

Un produit pâtissier industriel est un produit non nécessairement parfait et il est pratique et facile à manipuler, selon la consistance de la pâte, il y a :

- les produits à pâte liquide : les pâtisseries individuelles ;
- les produits moussés : le gâteau éponge, le gâteau des anges ;
- les produits à pâte semi-ferme : les tartes et tartelettes et les gâteaux aux fruits ;
- les produits à pâte ferme : par exemple les feuilletés (**Ménard, 1992**).

1.3. Mousse au chocolat

La mousse au chocolat est un classique français qui est maintenant apprécié dans le monde entier, c'est l'une des recettes françaises les plus simples qui soit (**Delarue, 2015**), les desserts laitiers aérés tels que la mousse ont trouvé un large marché potentiel en raison de leurs propriétés sensorielles pratiques et de leur haute valeur nutritionnelle qui sont aujourd'hui fournies à l'échelle industrielle, le chocolat est la saveur de mousse la plus populaire (**Taghizadeh et al., 2018**).

1.4. Composition de mousse au chocolat

Selon Nout et *al.* (2003), " Les mousses et écumes sont constituées de bulles, représentant un grand volume d'air ou d'autres gaz, entourées de minces films liquides ", la mousse au chocolat est un dessert riche et crémeux à base d'œufs et de chocolat blanc, au lait ou noir allégé de crème fouettée et/ou de meringue. Il est également utilisé comme garniture dans les gâteaux, pâtisseries et confiseries (Rinsky, 2009).

1.5. Fabrication de mousse au chocolat

" La majorité des mousses présentes sur le marché sont des desserts lactés frais type mousse à base de lait qui ne contiennent pas d'œuf " (Lubrano-Lavadera et *al.*, 2014), la mousse au chocolat est un dessert laitier aéré à structure mousseuse stabilisée. La production industrielle de desserts laitiers aérés est délicate, nécessitant des connaissances sur la formation et la stabilisation de la mousse et aussi l'utilisation d'ingrédients fonctionnels (émulsifiants, stabilisants) (Cardarelli et *al.*, 2008), la figure 1 présente le schéma de fabrication de la mousse.

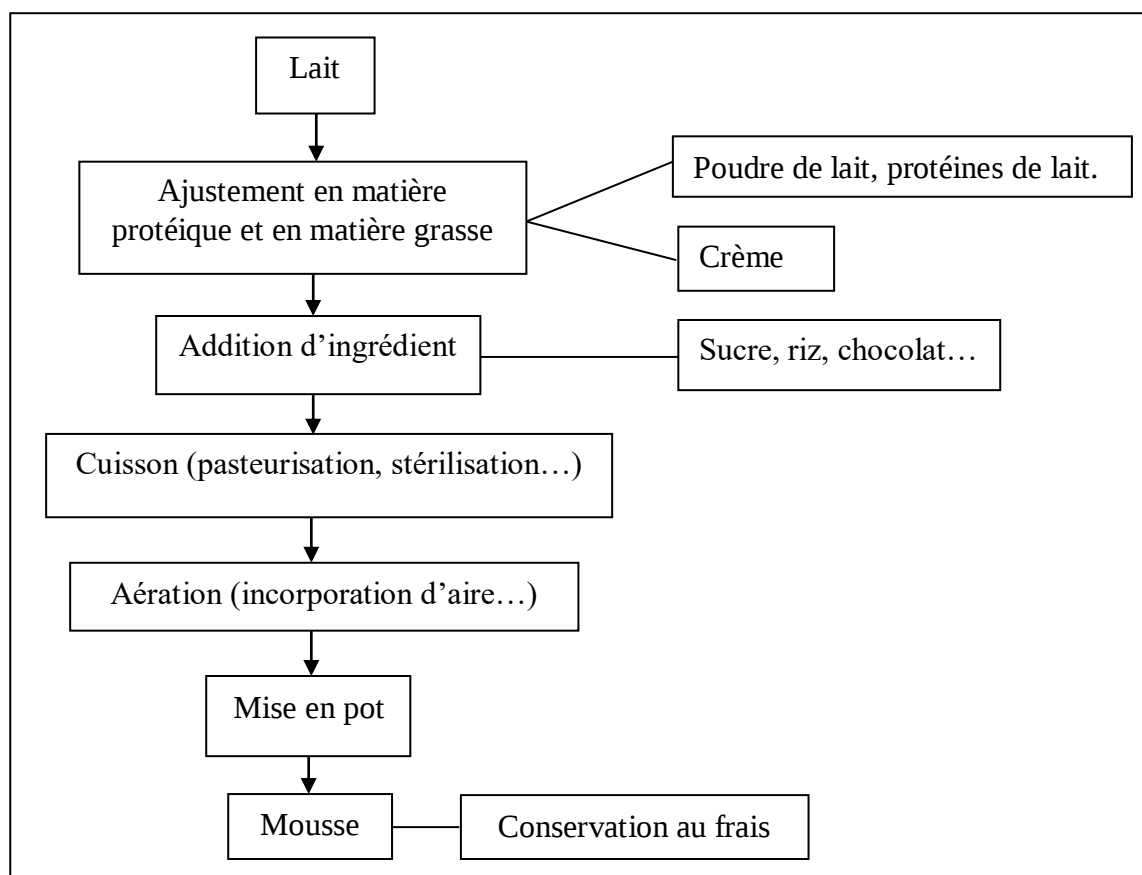


Figure 1 : Schéma de fabrication de la mousse (Lubrano-Lavadera et *al.*, 2014)

1.6. La détérioration des produits pâtisseries

" La détérioration des aliments implique tout changement qui rend les aliments inacceptables pour la consommation humaine et peut résulter de diverses causes " (**Hayes, 1995**).

La nature de détérioration peut être :

- Chimique (comme la réaction de Maillard, l'oxydation) ;
- Biochimique : par l'action des enzymes ;
- Physique (comme la séparation et la sédimentation, des phases dispersées) ;
- Microbiologique : par l'action des micro-organismes (**Nout et al., 2003**).

1.7. Prévention de l'altération des aliments

La prévention nécessite une vigilance constante, il faut contrôler les dangers sanitaires et nutritionnels des produits, et le respect de la réglementation en utilisant les bonnes pratiques par les professionnels ainsi que la vérification du fonctionnement par les pouvoirs publics (**Baumert et al., 2015**).

2. Les risques sanitaires en pâtisserie

Les produits de pâtisserie sont facilement contaminés par des bactéries, des levures et des moisissures; en fait, la pâtisserie constitue un environnement très propice à la croissance microbienne en ce qui concerne le pH favorable, l'activité de l'eau et la disponibilité des nutriments (**Lanciotti et al., 1998**).

" Les toxi-infections alimentaires sont dues à l'absorption d'aliments contaminés par des bactéries ou par leurs toxines " (**Pebret, 2003**), les pâtisseries (à base de crème chantilly, crème pâtissière, crème au beurre et crème ganache...etc.) peuvent présenter des dangers microbiens car ils présentent un milieu favorable pour le développement de diverses bactéries (souches entérotoxiques d'*Escherichia coli*, *Shigella* et *S. aureus*) qui peuvent être dangereuses pour la santé humaine (**Millet et Cabut, 1997**).

Une étude se fait par **Asadi et al. (2015)**, dans le but d'évaluer la contamination microbienne de la crème pâtissière dans la ville d'Arak en Iran, montre que les échantillons analysés contaminés beaucoup plus par les entérobactéries, les moisissures et les levures.

Les tartes et les mousses aux fruits, peuvent être contaminés par des micro-organismes qui ne sont généralement pas responsables de maladies graves chez l'homme, pour les produits peu riches en eau le risque microbien est faible.

Comme il y a un danger microbien, il y a aussi le risque de la présence de corps étrangers (comme les résidus d'emballage) dans les produits de pâtisserie (**Millet et Cabut, 1997**).

3. Hygiène et critères de qualité

3.1. L'hygiène alimentaire

L'hygiène alimentaire c'est " l'ensemble des conditions et mesures nécessaires pour assurer la sécurité et la salubrité des aliments à toutes les étapes de la chaîne alimentaire " (**FAO/OMS, 2005**).

Le pâtissier doit être particulièrement conscient du besoin d'hygiène car un nombre important de ses préparations doivent être manipulées et transmises au consommateur sans aucun traitement thermique supplémentaire, par exemple des crèmes pâtisseries, des confiseries fourrées de crème, des gâteaux, etc., l'hygiène alimentaire est bien plus que la propreté ; il comprend toutes les pratiques, les précautions et les procédures impliquées dans :

- protection des aliments contre les risques de contamination de toute nature.
- empêchement de tout organisme de se multiplier dans une mesure qui exposerait les consommateurs à des risques ou entraînerait une détérioration prématurée des aliments.
- destruction de toutes les bactéries nocives dans les aliments par une cuisson minutieuse (**Hanneman, 2005**).

3.2. Les critères de qualité

La qualité des aliments est la recherche de la satisfaction des besoins du consommateur (**Nout et al., 2003**), le produit alimentaire doit être conforme aux différents critères de la qualité (nutritionnel, hygiénique, organoleptique, financier, technologique) pour le commercialiser (**Bonnefoy, 2002**). Le tableau 1 présente les critères microbiologiques applicables aux pâtisseries, présentant les limites microbiologiques pour chaque micro-organisme.

Tableau 1 : Critères microbiologiques applicables aux Pâtisseries (JORADP, N°39 2 juillet 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
	<i>Staphylococcus</i> à coagulase +	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 ;

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.

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 ;

Chapitre 2

Staphylococcus aureus

1. Historique

Les staphylocoques ont été isolés pour la première fois du pus humain en 1880 par le chirurgien écossais **Alexander Ogston**. Le nom dérive de staphyle (grappe de raisin) et de kokkos (baie) (**Fetsch, 2018**) ; le nom aureus, qui est latin pour «or», a été donné à la bactérie car elle pousse en grandes colonies jaunes. *Staphylococcus aureus* a été décrit pour la première fois de manière concluante par le médecin allemand **Anton Rosenbach** en 1884 (**Freeman-Cook, 2006**).

Rosenbach a fourni la première description taxonomique de *Staphylococcus* en 1884 lorsqu'il a divisé le genre en *S. aureus* et *Staphylococcus albus* ; bien que Pasteur et Ogston aient observé des bactéries sphériques dans le pus d'abcès 4 ans plus tôt (**Gillespie, Hawkey, 2006**). Connus dans les années 1870 pour causer des infections cutanées, les staphylocoques n'ont été associés à des maladies d'origine alimentaire qu'en 1884, lorsque **Vaughan et Sternberg** ont récupéré le microorganisme à partir de fromage Cheddar lié à environ 300 cas d'intoxication alimentaire dans le Michigan (**Marth et Steele, 2001**).

Le lien entre les staphylocoques et les maladies d'origine alimentaire a été établi en 1914 lorsque les chercheurs ont découvert que la consommation de lait contaminé provoquait des vomissements et de la diarrhée (**Montville et Matthews 2008**).

2. Taxonomie

Selon *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2011) le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Bacillales*, *S. aureus* est classé dans la famille des *Staphylococcaceae*.

" *S. aureus* est le plus connu et est fréquemment impliqués dans l'étiologie d'infections et de toxi-infections variées chez l'homme " (**Loir et Gautier, 2010**).

3. Habitat

Les staphylocoques existent dans l'air, la poussière, les eaux usées, l'eau, le lait et les aliments ou sur l'équipement alimentaire, les surfaces environnementales, les humains et les animaux. Les staphylocoques sont présents dans les voies nasales et la gorge et sur les cheveux et la peau de 50% ou plus des individus en bonne santé (**Forsythe, 2000**).

4. Caractères bactériologiques :

4.1. Morphologie

Les cellules sont sphériques, généralement de 0.8-1.0 μ de diamètre (Figure 2). Sur les milieux solides, ils sont disposés en grappes de raisin, mais dans les milieux liquides peuvent apparaître séparément, par paires ou en très courtes chaînes (**Vollum et al., 1970**).

S. aureus sont des cocci, non mobiles, non sporulés et non capsulaires (**Ray, 2004**) (Des capsules ont été détectées dans de très jeunes cultures de certaines souches, mais ne se trouvent pas dans des cultures âgées de 18 à 24 heures (**Vollum et al., 1970**)), Gram positifs (Figure 3), anaérobies facultatifs, qui sont positifs pour la coagulase et la désoxyribonucléase (ADNase) (**Eley, 1992**).

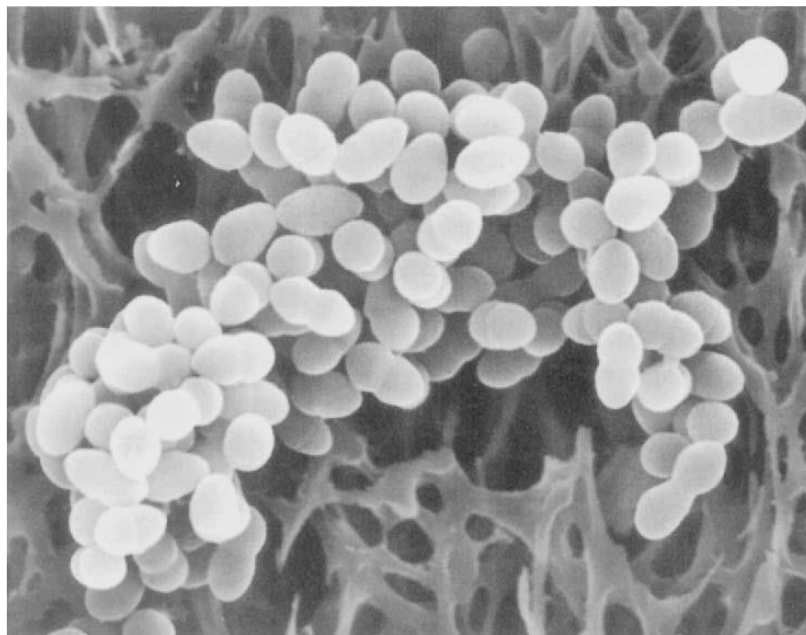


Figure 2 : Micrographie électronique de cellules *S. aureus* (**Montville et Matthews, 2008**)

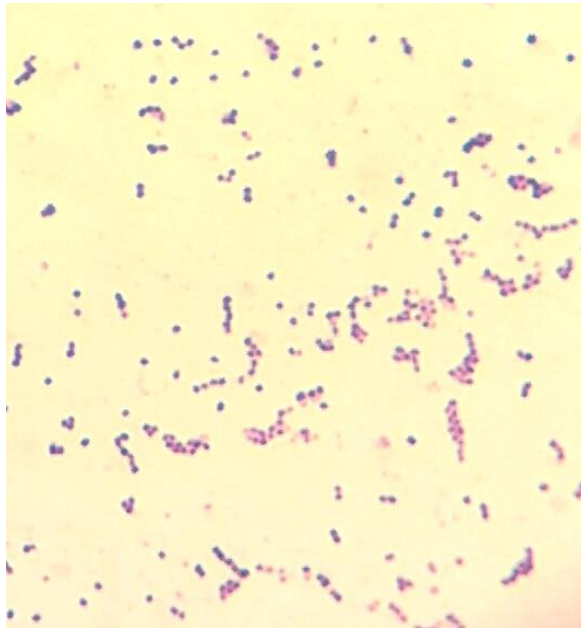


Figure 3 : *S. aureus* après la coloration de Gram au grossissement 10x100 (Photo originale, 2020)

4.2. Biochimie

Les principaux caractères biochimiques de *S. aureus* sont la capacité à métaboliser les sucres, la production d'arginine dihydrolase (ADH) et la production de catalase (**Le Loir et Gautier, 2010**), il se distingue des autres membres du genre par sa capacité à produire l'enzyme coagulase (**Wilson, 2008**).

4.3. Culture

- **Aspect sur gélose ordinaire :** les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées.
- **Aspect en gélose profonde :** la croissance est observée sur toute la hauteur du tube signant le caractère aéro-anaérobie facultatif.
- **Aspect en bouillon :** la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (**Loir et Gautier, 2010**).

5. Facteurs de la croissance et la production d'entérotoxines

Les différents facteurs qui permettent la croissance et la production d'entérotoxines par *S. aureus* sont présentés dans le tableau 2

Tableau 2 : Facteurs de croissance et de production d'entérotoxines par *S. aureus* (Adams et Moss, 2008)

Facteur	Croissance		Production d'entérotoxines	
	Optimale	Gamme	Optimale	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 autres 6-7	4.8-9.0
NaCl	0.5-4.0%	0-20%	0.5%	0-20%
Activité d'eau	0.98- > 0.99	0.83- > 0.99	> 0.99	0.86- > 0.99
Atmosphère	Aérobique	Aérobique- Anaérobie	5-20% DO ₂	Aérobique- Anaérobie
Eh	> +200mV	< -200 à > +200mV	> +200mV	

6. Pouvoir pathogène

S. aureus est l'un des pathogènes humains les plus importants à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires (O'Connor, 2006). Il est responsable d'un large éventail d'infections :

- des affections mineures (Ex : Furoncles et abcès cutanés) ;
- des affections potentiellement mortelles telles que la pneumonie, l'ostéomyélite, l'endocardite, les infections des plaies et la septicémie.

En outre, il est responsable d'un certain nombre de toxinoses :

- l'intoxication alimentaire,
- la nécrolyse épidermique toxique et
- le syndrome de choc toxique (Wilson, 2008).

6.1. Facteurs de virulence

La définition la plus étroite d'un facteur de virulence serait une substance qui, lorsqu'elle est purifiée jusqu'à l'homogénéité et introduite dans un animal d'essai, produit un effet pathogène (**Honeyman et al., 2002**).

La capacité de *S. aureus* à provoquer des maladies dépend de la production d'un grand nombre de toxines et d'enzymes sécrétées, de protéines associées à la paroi cellulaire et de polysaccharides de surface, qui, ensemble, aident les bactéries à adhérer et à se multiplier dans le corps (**Ala'Aldeen et Hiramatsu, 2004**).

L'organisme produit des enzymes (caséinase, gélatinase, élastase, nucléases et hyaluronate lyase) capables de dégrader un certain nombre de macromolécules présentes dans les sécrétions respiratoires. Il produit également plusieurs cytotoxines et hémolysines qui peuvent tuer une variété de cellules hôtes, libérant ainsi des nutriments à utiliser par le microbiote respiratoire (**Wilson, 2008**).

6.2. L'intoxication staphylococcique

" L'intoxication staphylococcique est une des toxi-infections alimentaires les plus communes dans le monde", elle est causée par l'ingestion des entérotoxines staphylococciques préformées dans l'aliment, à partir des souches entérotoxigènes de staphylocoques à coagulase positif (principalement *S. aureus*) (**Dromigny, 2012**).

Pour ces entérotoxines staphylococciques, huit types sérologiquement distincts (A, B, CI, C2, C3, D, E et F) (**Eley, 1992**), ce sont des toxines entériques et provoquent une gastro-entérite (**Ray, 2004**) ; un adulte en bonne santé doit consommer 30 g ou ml d'un aliment contenant 100 à 200 ng de toxines produites par 10^6 à 10^7 cellules/g ou /ml ; les nourrissons et les personnes âgées et malades ont besoin de quantités moindres (**Ray, 2004**).

Les entérotoxines sont des protéines de bas poids moléculaire (26 000-34 000 Da) ; Une toxine précédemment désignée entérotoxine F est désormais reconnue comme responsable du syndrome de choc toxique et non de l'entérite (**Forsythe, 2000**).

6.2.1. Les symptômes d'une intoxication staphylococcique

Intoxication alimentaire par *S. aureus* se caractérise par une courte période d'incubation, généralement de 2 à 4 h (**Adams et Moss, 2008**).

Les symptômes courants comprennent des nausées, des douleurs abdominales, des vomissements et de la diarrhée, absence de fièvre mais généralement l'intoxication est auto-limitée et ne dure que quelques heures à un jour (**Khardori, 2016**).

Les symptômes peuvent être très aigus, selon :

- la sensibilité individuelle à la toxine ;
- la quantité de nourriture contaminée consommée ;
- la quantité de toxine contenue dans la nourriture ingérée ;
- la santé générale de la victime (**Forsythe, 2000**).

6.2.2. Source de contamination des aliments

Les staphylocoques peuvent exister au moins en faible quantité, dans tout ou partie des produits alimentaires d'origine animale ou dans ceux qui sont manipulés directement par l'homme, à moins que des étapes de traitement thermique ne soient appliquées pour effectuer leur destruction (**Jay, 2000**).

Bien que les manipulateurs d'aliments soient généralement la principale source de contamination des aliments lors d'épidémies d'intoxication alimentaire, l'équipement et les surfaces environnementales peuvent également être des sources de contamination par *S. aureus* (**Forsythe, 2000**).

6.2.3. Aliments responsables de l'intoxication alimentaire aux staphylocoques

Les aliments souvent incriminés dans les intoxications alimentaires aux staphylocoques comprennent la viande et les produits carnés ; volaille et ovoproduits ; salades telles que œuf, thon, poulet, pomme de terre et macaroni ; des produits de boulangerie tels que des pâtisseries fourrées à la crème, des tartes à la crème et des éclairs au chocolat ; garnitures à sandwich ; et le lait et les produits laitiers...etc. (**Bhatia et Zahoor, 2007**).

6.2.4. La prévention des intoxications alimentaires par les staphylocoques

La prévention des intoxications alimentaires par les staphylocoques comprend les éléments suivants : bonne cuisson, refroidissement approprié des aliments, propreté personnelle et traitement thermique. Il faut également prendre des mesures personnelles appropriées lors de la préparation des aliments, empêcher les personnes atteintes de lésions cutanées et de mettre les aliments à 4 ° C afin de stopper la croissance bactérienne et la sécrétion de toxine (**Hezam et al., 2019**).

Chapitre 3

Les huiles essentielles

1. Définition de l'huile essentielle

Les HES (ou huiles volatiles) sont des mélanges complexes de constituants volatils qui sont synthétisés par les plantes aromatiques **(Rai et Kon, 2013)**. Ils peuvent être synthétisés par tous les organes de la plante (les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les rameaux, les graines, les racines, les fruits, le bois ou l'écorce), et sont stockés dans les cellules sécrétoires, les canaux, les cavités, les trichomes glandulaires ou les cellules épidermiques **(Bakkali et al., 2008)**. Ils sont de faible poids moléculaire, différents des huiles fixes en raison de leur haute volatilité **(Peters, 2016)**. L'HE naturelle est pure ne contient aucun corps gras, elle est constituée de molécules aromatiques volatiles uniquement **(Huete, 2012)**.

2. Composition de l'huile essentielle

Les HES peuvent contenir jusqu'à environ 100 composants, bien que beaucoup en contiennent environ 20 à 60 **(Thormar, 2011)**, les principaux composés, ou constituants, que l'on trouve dans les HES sont : terpènes, phénols, alcools, aldéhydes, alcanes, alcènes, acides carboxyliques, coumarines, esters, éthers, cétones, lactones, oxydes **(Johnson, 2015)**.

Les HES sont des métabolites secondaires constitués de composés hydrocarbonés à base d'isoprène (C_5H_8) ou de 2-méthyl-1,3-butadiène. Les polymères de ce composé sont collectivement appelés terpènes et ont la structure $(C_5H_8)_n$. Les monoterpènes ont deux unités ($C_{10}H_{16}$), les sesquiterpènes trois unités ($C_{15}H_{24}$), les diterpènes quatre unités ($C_{20}H_{32}$), etc. **(Rai et Kon, 2013)**.

3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Les méthodes utilisées pour extraire les HES à partir des plantes sont nombreuses, on peut citer les suivantes :

- Hydrodistillation
- Extraction de CO_2 et de CO_2 supercritique
- Extraction par distillation turbo
- Distillation à la vapeur
- Pressage à froid

- Enfleurage
- Macération (**Malik, 2019**).

La méthode de l'hydrodistillation (Figure 4) est la méthode la plus couramment utilisée pour l'extraction des HEs. Elle correspond en principe à une distillation hétérogène. Elle consiste à immerger le matériel végétal dans un bain-marie; le mélange est ensuite chauffé à ébullition, à pression atmosphérique. Sous une source de chaleur, les molécules odorantes contenues dans les cellules végétales sont libérées sous forme de mélange azéotropique. Bien que la plupart des composants aient des points d'ébullition supérieurs à 100 °C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau et HE par décantation (**Hashemi et al., 2018**).

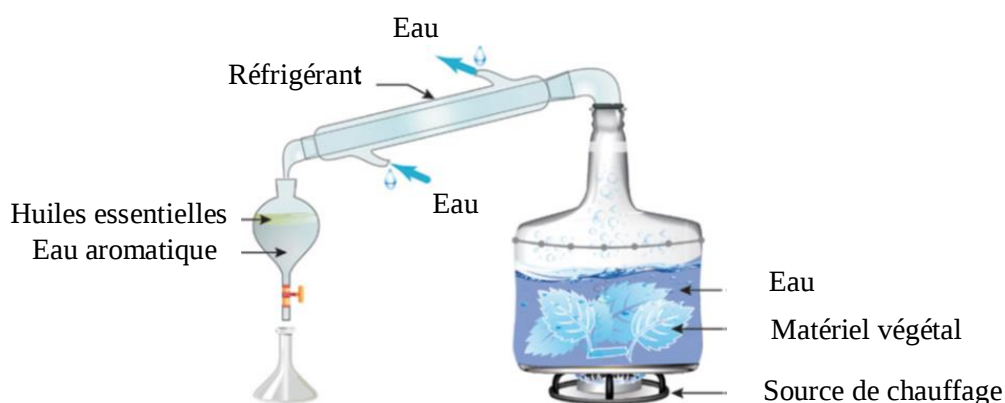


Figure 4 : Représentation schématique de l'hydrodistillation (**Hashemi et al., 2018**)

4. Quelques propriétés des huiles essentielles

Ils sont relativement fluides, à forte odeur, typiquement incolores ou légèrement colorés, elles sont stables en présence de lumière, de chaleur et d'air, en plus d'avoir une odeur saisissante et agréable (**Peters, 2016**). Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques et dans l'alcool, le chloroforme, les huiles, éther, les émulsifiants et insolubles dans l'eau (**Bardeau, 2009**).

La caractéristique commune entre toutes les HEs est la volatilité, et leurs molécules aromatiques peuvent de se volatiliser lorsqu'elles ne sont pas conservées hermétiquement ou ils sont exposées à la lumière du soleil **(Huete, 2012)**.

4.1. L'activité antioxydante

Les HEs présentent d'excellentes propriétés antioxydantes. Les composés phénoliques et autres métabolites secondaires présents dans les HEs présentent généralement des propriétés antioxydantes importantes **(Malik, 2019)**. Le stress oxydatif dû à la génération de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène endommage les macromolécules cellulaires, l'équilibre cellulaire des radicaux libres est maintenu par différents antioxydants. Les terpénoïdes, les flavonoïdes, et les constituants phénoliques des HEs présentent des effets antioxydants importants. Par exemple, deux principaux composants des HEs de thym et d'origan, le thymol et le carvacrol, agissent comme de puissants antioxydants **(Raut et Karuppayil, 2014)**.

4.2. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des HEs peut être attribuée en grande partie aux principaux groupes de composés qui s'y trouvent : les monoterpènes, les sesquiterpènes et les composants non terpénacés tels que les phénylpropanoïdes **(Thormar, 2011)**. Compte tenu de la grande variété de composés chimiques présents dans les HEs, il est probable que leur activité antimicrobienne n'est pas attribuable à un mécanisme d'action spécifique, mais à l'action combinée de plusieurs d'entre eux sur différentes parties de la cellule microbienne **(Reyes-Jurado et al., 2015)**.

4.2.1. L'activité antibactérienne

Le traitement aux HEs entraîne une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires bactériennes, provoquant une perte de matériel cellulaire, et il est important de noter que les lésions d'une structure cellulaire peuvent entraîner de nombreux effets en aval sur les fonctions cellulaires **(Rai et Kon, 2013)**. Les bactéries gram-positives, comme *S. aureus*, sont plus sensibles aux composés antimicrobiens des HEs qu'aux bactéries gram-négatives qui possédaient une paroi lipopolysaccharidique externe entourant la paroi cellulaire des peptidoglycanes, ce qui limite l'accès de ces composés **(Hashemi et al., 2018)**.

4.2.2. L'activité antifongique

Les HES et leurs composants présentent une activité contre les moisissures. Il a été démontré qu'un large éventail de pathogènes fongiques humains, animaux et végétaux sont inhibés et/ou tués par les HES, augmentant l'intérêt pour leur application agro-industrielle ou thérapeutique (**Thormar, 2011**).

5. Utilisations des huiles essentielles

5.1. Dans les aliments et boissons

Les HES et leurs constituants sont utilisés dans de nombreux aliments et boissons, principalement comme agents aromatisants ; les concentrations utilisées sont généralement faibles ; les niveaux utilisés dans les aliments sont largement régis par leur effet sur les propriétés organoleptiques des aliments. Leur présence dans les aliments peut également contribuer à la conservation des produits, selon les concentrations utilisées et l'interaction qu'ils ont avec d'autres ingrédients et facteurs de conservation dans le produit (**Thormar, 2011**).

5.2. Dans l'industrie pharmaceutique

Les constituants des HES sont utilisés comme matière première ou précurseurs utilisés dans la production de médicaments sur ordonnance modernes (**Hunter, 2009**).

Elles sont rajoutées dans la formulation des spécialités pharmaceutiques, pour le but de masquer le mauvais goût des médicaments et aussi pour ajouter un caractère plus plaisant à leur consommation (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012**).

6. La menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.)

6.1. Description de la plante et classification

- **Noms communs**

Anglais : English mint ; European pennyroyal, pennyroyal (mint), pudding grass;

Arabe : habaq, flayou, fliou, fulayya, fulayha;

Français : baume peteit, herbe aux puces, menthe pouliot, pouliot (**Seidemann, 2005**).

" *Mentha* vient de Minthe, de nom grec d'une nymphe que Proserpine, jalouse, transforma en fleur ; *pulegium*, de *pulex*, « puces », son odeur éloigne les puces" (**Pierre et Lys, 2000**).

M. pulegium, est une espèce de plante à fleurs de la famille des Lamiacées (Figure 5), une herbe culinaire traditionnelle, un remède populaire et abortifatif, les feuilles fraîches ou séchées dont également été utilisées pour traiter le rhume, la grippe, les crampes abdominales et pour provoquer la transpiration, ainsi que pour le traitement des maladies telles que la variole et la tuberculose, et en favorisant les menstruations latentes (**Miraj et Kiani, 2016**). Son odeur est puissante et très fine, et le surnom d'«herbe aux puces » donné à la plantes parce que elle éloigne efficacement ces parasites (**Couplan, 2009**).

Elle se trouve dans le sud-ouest et le centre de l'Europe, de l'Irlande et du centre de la Pologne à l'Ukraine. Il peut être trouvé en abondance dans la péninsule ibérique et dans les pays d'Afrique du Nord qui bordent la Méditerranée comme l'Algérie, le Maroc et la Tunisie (**Lawrence, 2007**).



Figure 5 : La plante de menthe pouliot (Pierre et Lys, 2000)

La famille de Lamiacées appartient à l’embranchement de Phanérogames ou Spermaphytes, à la classe de Dicotylédones et à l’ordre des Lamiales, l’espèce *Mentha pulegium* L. est classée dans le genre de *Mentha* (Quézel P. et Santa S. en 1963 et Guignard J.L. et Dupont F. en 2004 cité par Bendjelloul, 2018).

6.2. L’huile essentielle de la menthe pouliot (*Mentha pulegium*)

6.2.1. Composition

La menthe pouliot, *M. pulegium* L., développe une HE spécifique, qui peut contenir jusqu’à 80% de pulégone, le pulégone est une cétone terpénique insaturée (Botineau, 2010).

Dans une étude Derwich et al. (2010), a trouvé que l’huile de feuilles était caractérisée par des teneurs élevées en pipéritone (35,56%), et dans autre étude (Chraïbi et al., 2016) les principaux composants trouvés étaient la R (+) - pulegone (75,48%), la carvone (6,66%) et la dihydrocarvone (4,64%). La composition de l’HE peut être variée selon par

exemple, le lieu géographique, l'ensoleillement, la composition du sol...etc. (**Silvant, 2015**).

6.2.2. Utilisation

L'HE de *M. pulegium* (Pennyroyal oil) est parfois utilisée dans les boissons comme additif alimentaire pour la consommation humaine et parfois en phytothérapie comme médicament abortif (**Hüsnü Can Başer et Buchbauer, 2010**).

Plusieurs huiles du genre de la menthe, comme le pennyroyal (*M. pulegium*) ont une activité antimicrobienne, ils contiennent généralement des niveaux élevés d'alcool terpénique menthol, qui est susceptible de contribuer à l'activité globale (**Thormar, 2011**).

Une étude qui se fait par **Amalich et al. (2016)** sur *M. pulegium* L. de M'rirt (Maroc), a montré que l'HE de *M. pulegium* a une activité antibactérienne très importante vis-à-vis *Escherichia coli* et *S. aureus*, ainsi, l'évaluation de l'activité antifongique a révélé que cette HE est capable d'inhiber la croissance mycélienne des moisissures testées. Dans une étude faite par **Chraïbi et al. (2016)** dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques au Maroc, les résultats ont montré que l'HE étudiée a un potentiel à la fois antimicrobien et antioxydant, suggérant l'intérêt majeur pour le développement d'un nouveau conservateur sûr pour l'extension de la durée de conservation des aliments crus et transformés et respectueux de l'environnement.

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

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

1.1 L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

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 6**).

Le principe : dans cette méthode, la matière première végétale reste en contact avec de l'eau bouillante; la vapeur force l'ouverture des parois cellulaires et l'évaporation de l'essence se produit entre les cellules végétales. La vapeur, qui consiste en un mélange d'huile et d'eau, passe ensuite à travers un condenseur où elle se refroidit et, comme les composants volatils et l'eau sont non miscibles, l'huile peut être séparée facilement (**Peters, 2016**).



Figure 6 : Montage d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**Photo originale, 2020**)

Cent cinquante grammes (150 g) du matériel végétal sont mises dans un ballon à fond rond et additionnés à l'eau distillé (1500 mL), puis sont portés à l'ébullition pendant 4 h à l'abri de la lumière selon la méthode de **British Pharmacopoeia (1990)**. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le réfrigérant. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile extraite est conservée dans le réfrigérateur à 4 °C dans des tubes en verre, fermés hermétiquement jusqu'à son usage.

1.2 Détermination de la composition chimique d'huile essentielle

L'échantillon d'HE 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'HE est diluée dans du n-hexane (1%, v/v) avant de procéder aux analyses CG/SM. Le volume injecté est 1 µL. L'analyse CG/SM a été réalisée dans les conditions suivantes: débit de gaz vecteur (hélium, pureté 99,95%) 1 mL/min; mode d'injection splitless (débit 40 mL/min, rapport 20) avec une tension d'ionisation de 70 eV; gamme de spectres de masse de 50 à 600 m/z; température du four à colonne programmée de 50 °C à 240 °C (3 min) et température de l'injecteur 250 °C.

2. 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 BHI 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 (Jenway, 6405

UV / VIS, Essex, UK) à une longueur d'onde de 600 nm afin d'obtenir une concentration finale approximative de 10^7 à 10^8 UFC/ mL.

3. Préparation de la mousse au chocolat

La mousse au chocolat a été préparée manuellement dans le laboratoire du Département des Sciences Agronomiques de la Faculté des Sciences de l'Université de Laghouat suivant la recette de LAROUSSE Cuisine (<https://cuisine.larousse.fr/recette/mousse-au-chocolat-2>), 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 :

La première étape c'est de mettre le chocolat dans un grand bol après de le hacher à l'aide d'un couteau, ensuite on verse le liquide bouillant de lait et de la crème sur le chocolat en mélangeant au fouet manuel 1 ou 2 min, après, on coupe le beurre en petites morceaux et incorporer-le au mélange en tournant avec le fouet, ensuite on sépare les blancs des jaunes d'œufs, et on monte les blancs en neige et incorpore le sucre petit à petit une fois que les blancs ont doublé de volume, on l'ajoute les jaunes quelque secondes avant d'arrêter l'appareil, à la fin on incorpore 1/5 des blancs dans le chocolat et mélange, on reverse le tout dans le reste des blancs, en soulevant délicatement la préparation, et on garde au frais.

4. Incorporation de l'huile essentielle et l'inoculum de *S. 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'HE selon les groupes suivants :

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

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.

5. Analyse microbiologique

Le dénombrement des *S. aureus* a été fait selon le **JORADP n°68 (2014)**, des germes aérobies mésophiles totales et psychrotrophes selon **JORADP n°65 (2019)**. Le prélèvement et le dénombrement sont faits en duplicate (deux répétitions) et après chaque 24 h pour tous les groupes testés.

5.1. Réalisation de série des dilutions décimales

Les groupes destinés aux analyses microbiologiques sont préparés en pesant au moyen d'une balance de précision une quantité de 10 g de la mousse au chocolat, prélevé avec une spatule stérile. Ensuite, la quantité préalablement pesée (10 g) est homogénéisée 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}). A l'aide d'une pipette stérile, 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 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} (Guiraud, 2003). Tous les tubes sont agités soigneusement par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex (Bourgeois et Leveau, 1991). Dans ce cas, nous disposons de cinq dilutions décimales à partir desquelles les milieux de cultures seront ensemencés.

5.2. Recherche et dénombrement de microorganismes

➤ Recherche et dénombrement des staphylocoques :

Pour rechercher et dénombrer les staphylocoques, nous avons utilisé le milieu Baird Parker additionné de jaune d'œuf (élément nutritif et révélateur enzymatique) et de Téllurite 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 : N F-V-08-014**. Ce milieu est préparé en additionnant 1 mL de jaune d'œuf, 1 mL d'eau physiologique et 0.25 mL de Téllurite de potassium au flacon de Baird Parker fondu.

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 pendant 24 à 48 h à 37°C. 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.

➤ Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totales :

Le milieu utilisées pour le dénombrement les germes aérobies mésophiles totales est le milieu PCA. 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**).

➤ Recherche et 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.

5.3. Expression des résultats

Selon la norme **NF ISO 7218**, le calcul de nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essais, en tant que moyenne pondérée à partir deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0.1n_2) d}$$

N : le nombre de micro-organismes (ou UFC) présents dans 1 g d'échantillon pour essai ;

$\sum C$: est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ;

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n_1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution

n_2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Résultats

1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle

Après l'extraction, l'HE de la *M. pulegium* est de couleur jaune clair et d'une odeur aromatique forte (**Figure 7**). Le rendement moyen en huile essentielle de la partie aérienne de *M. pulegium* est de 0.8% (v/w) (le rendement est calcul    partir du volume de l'huile essentielle par rapport au poids de la partie aérienne sèche de la plante).



Figure 7 : L'huile essentielle de *M. pulegium* obtenue par hydrodistillation

L'analyse chromatographique par CG/SM de l'HE a permis d'identifier 4 composés majoritaires de l'HE de *M. pulegium* qui sont : Piperitenone (41.4%), Pulegone (27.1%), Piperitone (9%) et cis-Menthone (9.1%). D'autres composés sont également présents dans l'huile *M. pulegium*, mais à des teneurs moins importantes (**Tableau 3**), (**Figure 8**).

Tableau 3 : Les principaux composés de l'HE de *M. pulegium*

<i>M. pulegium</i>	
Composé	%
Piperitenone	41.4
Pulegone	27.1
Piperitone	9
cis-Menthone	9.1
Composés mineurs	13.4
Rendement	0.8

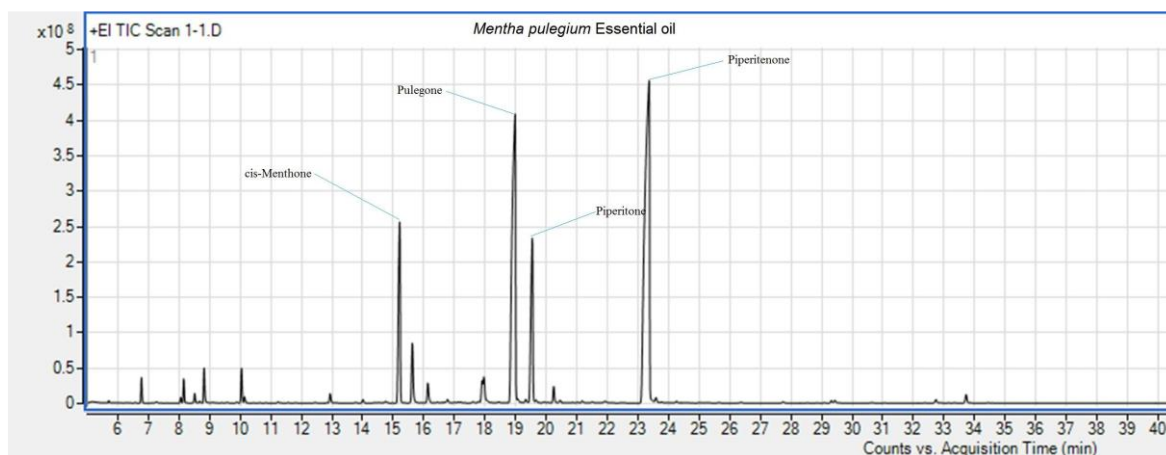


Figure 8 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *M. pulegium*

2. Résultats de l'analyse microbiologique

Les résultats de dénombrement des différents microorganismes de la mousse au chocolat inoculée par *S. aureus* et traitée par l'HE de *M. pulegium* sont présentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Résultats d'analyse microbiologique de la mousse au chocolat inoculée par *S. aureus* et traitée par l'HE de *M. pulegium*

Micro-organismes	Traitement	Charge bacterienne (UFC/g)			
		Durée de conservation (heures)			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Gérmes aerobies à 30°C	Témoin	2.6×10^3	7.3×10^6	1.7×10^8	10^8
	Groupe 1	2.6×10^3	1.1×10^4	5.3×10^3	2.2×10^4
	Groupe 2	2.6×10^3	1.4×10^4	1.1×10^4	9.3×10^3
	Groupe 3	2.6×10^3	1.4×10^4	9.7×10^3	9.5×10^3
	Groupe 4	2.6×10^3	1.7×10^4	1.3×10^4	1.3×10^4
Gérmes psychrotrophes	Témoin	0	4.5×10^2	2.7×10^3	4.5×10^4
	Groupe 1	0	0	0	1.4×10^2
	Groupe 2	0	0	10^2	91
	Groupe 3	0	0	0	4.5×10^2
	Groupe 4	0	0	3.2×10^2	45
<i>Staphylococcus aureus</i>	Témoin	10^6	2.2×10^8	9.2×10^7	5.1×10^7
	Groupe 1	10^6	2.5×10^4	9.1×10^3	4.0×10^3
	Groupe 2	10^6	2.4×10^4	1.4×10^4	1.2×10^4
	Groupe 3	10^6	1.8×10^4	7.3×10^3	2.0×10^3
	Groupe 4	10^6	1.8×10^4	1.1×10^4	5.9×10^3

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

Sur milieu Baird Parker, les colonies caractéristiques des *S. aureus* sont noires ou grises, brillantes et convexes et sont entourées d'une auréole claire qui peut être partiellement opaque (**Figure 9**). La charge initiale des *S. aureus* inoculée dans la mousse au chocolat est égale à 10^6 UFC/g. L'incorporation de l'HE de *M. pulegium* 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 (**tableaux 4**). Après 24 h de stockage, une croissance plus faible de *S. aureus* (réduction de 4 log) a été observée dans les groupes traités avec 0.2% d'huile essentielle que ceux traités avec 0.4% d'HE. Cette réduction de la croissance de *S. aureus* s'est poursuivie dans tous les groupes traités jusqu'à la fin du temps de stockage, enregistrant le plus faible nombre de *S. aureus* (2.0×10^3 UFC/g) dans le groupe 3 traités avec 0.2% de *M. pulegium* sous stockage réfrigéré. De façon notable, l'ajout de l'HE *M. pulegium* a effectivement réduit la croissance de *S. aureus* 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 10**).

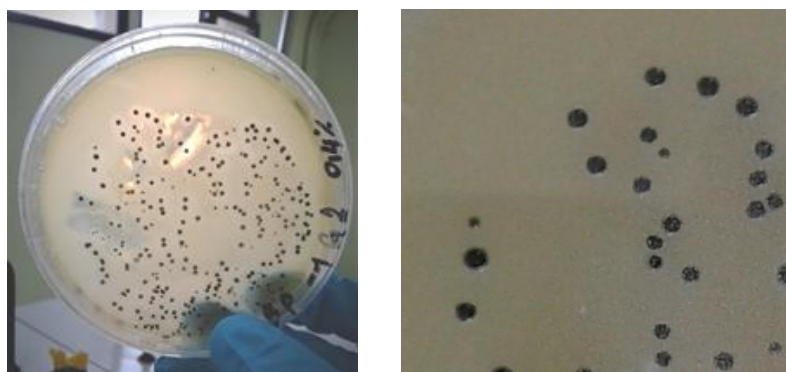
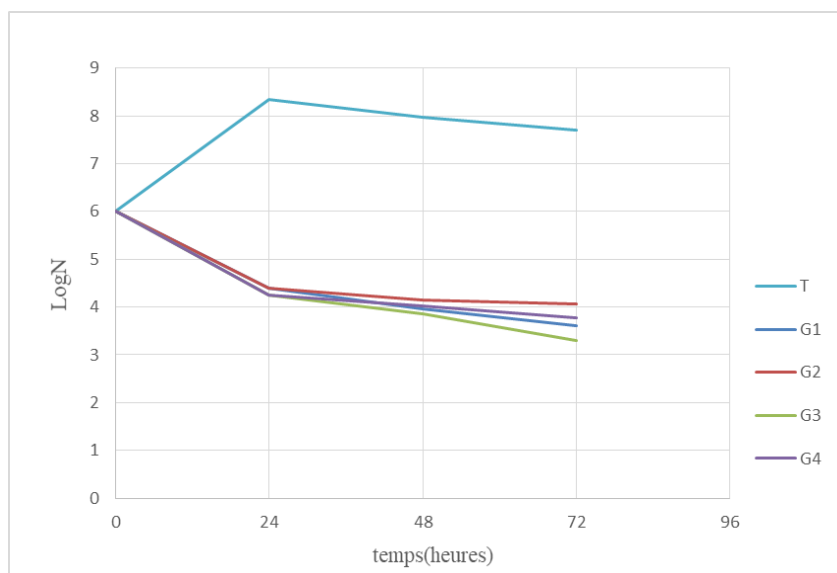


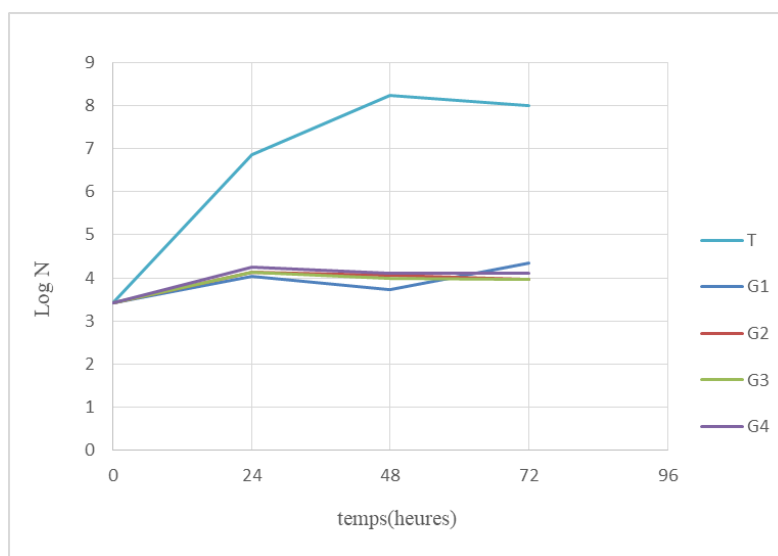
Figure 9 : Aspect morphologiques de colonies de *S. aureus* sur milieu de Baird Parker



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

Figure 10 : Courbe de croissance de *S. aureus* durant la période de conservation de la mousse au chocolat

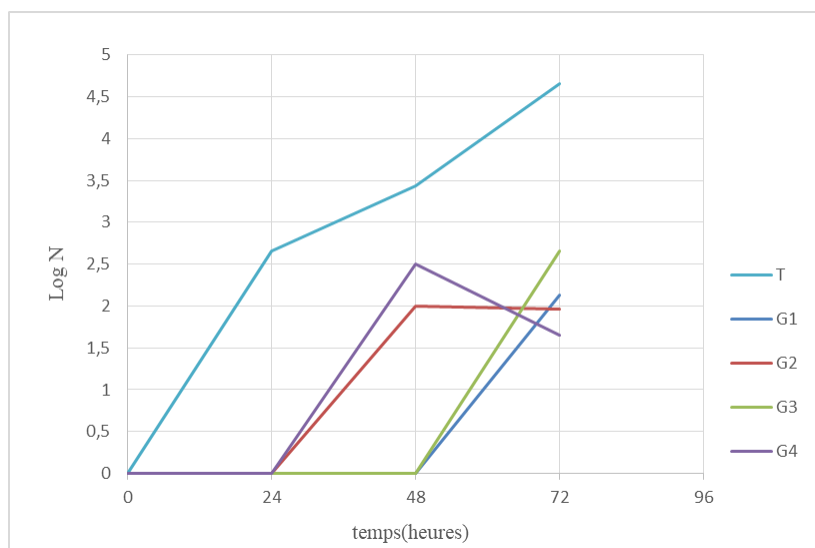
La charge initiale des germes aérobie mésophile est égale à 2.6×10^3 UFC/g de mousse au chocolat. Après l'incorporation de l'HE de *M. pulegium*, cette charge a montré une nette réduction dans les groupes traités pendant toute la durée de stockage, par rapport au témoin (**Tableaux 4**). Après 24 h de stockage, une réduction de 2.6 log a été observée dans tous les groupes traités avec l'HE de *M. pulegium* et cette réduction des germes totaux s'est poursuivie jusqu'à la fin du temps de stockage, à l'exception du groupe 1 traité par 0.4% de *M. pulegium* sous stockage réfrigéré qu'a montré une légère augmentation. A la fin de la période de stockage, une réduction de 3.6 log a été observée dans tous les groupes traités avec l'HE de *M. pulegium* par rapport au témoin, enregistrant la plus faible charge (9.3×10^3 UFC/g) dans le groupe 2 traité par 0.4% de *M. pulegium* sous température abusive. Notons que, l'ajout de l'HE *M. pulegium* a effectivement réduit la croissance des germes totaux dans la mousse au chocolat pendant le temps de stockage et cette charge n'est pas dépassée les limites critiques fixées par le **JORADP (2017)**, sans montrer d'effets notables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage (**Figure 11**).



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

Figure 11 : Courbe de croissance de germes aérobie mésophile totale durant la période de conservation de la mousse au chocolat

De plus, la charge initiale des germes psychrotrophes est nulle dans la mousse au chocolat. Cette charge a montré une augmentation rapide dans le groupe témoin pendant la période de stockage, enregistrant la charge la plus élevée de 4.5×10^4 UFC/g (**Tableaux 4**). Cependant, l'incorporation de l'HE de *M. pulegium* a inhibé la croissance des germes psychrotrophes dans les groupes traités après 24 h de conservation, mais cette charge a subit une légère augmentation jusqu'à la fin de la période de stockage, enregistrant la plus faible charge (45 UFC/g) dans le groupe 4 traité par 0.2% de *M. pulegium* sous température abusive. De façon notable, l'ajout de l'HE *M. pulegium* a effectivement réduit la croissance des psychrotrophes dans la mousse au chocolat pendant le temps de stockage, par rapport au témoin, avec des effets remarquables dans les groupes stockés dans les conditions de température abusive (groupes 2 et 4) (**Figure 12**).



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

Figure 12 : Courbe de croissance des germes psychrotrophes durant la période de conservation de la mousse au chocolat

Discussion

Le rendement moyen d'extraction de l'HE pour la plante *M. pulegium* était d'environ 0.8%. Ce rendement très faible par rapport à celui qui a été trouvé par **Amalich et al. (2016)** au Maroc et **Ouakouak et al. (2015)** au Sud-est de l'Algérie, avec des taux de 5.2% et 2.34%, respectivement. Cependant, **Mahboubi et Haghi (2008)** ont montré un taux très inférieur avec 0.27%. La variation des teneurs en HEs peut être due soit à des chémotypes, soit à des différences de paramètres géographiques et climatiques (mouvement de l'air, humidité relative, précipitations, température, altitude, durée d'ensoleillement, etc.), ainsi que du type de sol, du l'âge des feuilles, du régime de fertilité et de la méthode utilisée pour sécher le matériel végétal et l'extraction de l'huile (**Brahmi et al., 2016**).

Le résultat de l'analyse chromatographique par CG/SM d'HE de *M. pulegium* a montré que l'huile contenait principalement de la pipériténone (41.4%), de la pulegone (27.1%), du cis-menthone (9.1%) et de la pipéritone (9%). Cependant, des études antérieures avec la même plante récoltée en Turquie, en Uruguay, en Bulgarie, en Égypte, en Espagne, au Portugal, en Tunisie, en Grèce, en Iran, en Inde, en Algérie et au Maroc ont signalé que la pulegone était la principale composante de l'HE, mais à des proportions différentes (**Brahmi, 2016**). Similaire à nos résultats, **Kokkini et al. (2002)** ont signalé que la pipériténone (39.8%) et la pulegone (34.8%) étaient les constituants dominants de l'huile de *M. pulegium* de l'île de Samothrace (près de Chora, Grèce), contrairement à une autre étude dans laquelle la menthone (35.9%) et la pulegone (23.2%) ont été signalés comme les principaux composés, tandis que la teneur en pipériténone était assez faible (0.4%) (**Teixeira et al., 2012**). Cette variation dans la composition de l'HE peut être attribuée à divers facteurs tels que les conditions géographiques et climatiques, la méthode utilisée pour le séchage et l'extraction de l'HE ainsi que le stade de croissance de la plante. En effet, ces facteurs affectent et régulent le métabolisme des HEs via la répression ou l'activation des gènes enzymatiques responsables de leur synthèse. Cette régulation est contrôlée par plusieurs facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et les modifications des histones (**Bouyahya et al., 2017**).

Cependant, peu de rapports sur l'application de l'huile de *M. pulegium* dans les matrices alimentaires sont disponibles. Dans une étude (**Sadeghi et al., 2016**), l'addition de l'HE de *M. pulegium* dans le fromage blanc Iranien inoculé avec *L. monocytogenes* a non seulement amélioré les propriétés organoleptiques du fromage mais a également retardé la croissance de *L. monocytogenes*. De nombreux films comestibles actifs incorporés avec de

l'HE de *M. pulegium* ont été utilisés pour contrôler les bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Par exemple, les films comestibles à base de mucilage salep contenant différentes concentrations d'HE de *M. pulegium* ont montré un puissant effet inhibiteur contre les bactéries testées parmi elles *S. aureus* (**Ekrami et al., 2019**). **Salarbashi et al. (2014)** ont également signalé que les films d'emballage actifs incorporés à 2% d'HE de *M. pulegium* inhibaient efficacement la croissance de *S. aureus* et *B. cereus*. De plus, un film à base d'amidon de maïs incorporé avec 1, 2 et 3% de *M. pulegium* a efficacement inhibé la croissance de *S. aureus* et *E. coli* O157: H7 et cet effet a été augmenté de manière significative avec la concentration d'huile la plus élevée (**Ghasemlou et al., 2013**).

Plusieurs études ont également étudié *in vitro* l'effet des HEs de *M. pulegium* vis-à-vis des bactéries pathogènes et d'altération d'origine alimentaire. **Ait-Ouazzou et al. (2012)** ont signalé que l'HE de *M. pulegium* était bactéricide contre cinq souches testées, dont *S. aureus*. De même, les bactéries à Gram positif, particulièrement *S. aureus*, sont les bactéries les plus sensibles à l'HE de *M. pulegium* à la plus faible concentration bactéricide minimale de 0.25 µL/mL. Cependant, le test antimicrobien de **Brahmi et al. (2016)** et **Boukhebti et al. (2011)** ont enregistré les faibles effets inhibiteurs des HEs de *M. pulegium* contre différentes souches de *Staphylococcus aureus*. L'effet antibactérien de l'HE de *M. pulegium* peut être dû aux concentrations élevées de monoterpènes oxygénés, en particulier la pulegone (**Ait-Ouazzou et al., 2012**). Dans la présente étude, l'huile essentielle de *M. pulegium* principalement dominé par la pipériténone et la pulegone représentant 41.4% et 27.1%, respectivement. Généralement, la plupart des bactéries à Gram positif sont sensibles à l'activité des HEs en raison de leurs parois structurales constituées d'une épaisse couche de peptidoglycane (**Scherer et al., 2013; Xylia et al., 2017**), et les composés actifs des HEs peuvent facilement pénétrer dans la cellule et perturber les structures lipidiques de la membrane bactérienne, endommager son intégrité et conduire à la mort cellulaire.

En effet, l'incorporation de l'huile de *M. Pulegium* 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)**. En général, les produits à base de lait comme la mousse au chocolat contenant de la crème liquide et des œufs 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. Des tests microbiens ont été effectués sur 228 échantillons de

pâtisseries remplis de crème et prélevés au hasard dans diverses confiseries, situées dans six villes au sud-ouest de l'Iran, enregistrant une contamination élevée des coliformes (61.84%), des staphylocoques (48.68%) et des levures (27.63%) dans presque tous les échantillons (**Sharifzadeh et al., 2016**). **Bornert (2000)** a rapporté que les micro-organismes psychrotrophes ne sont pas les seuls agents d'altération au froid des denrées alimentaires, mais également un nombre très important d'espèces de micromycètes. Une autre étude a été effectuée par **Asadi et al. (2015)** sur 120 échantillons de crème pâtissière fournie à Arak et prélevés au hasard dans des confiseries, montrant que 115 échantillons (95,8%) étaient contaminés par divers microbes.

Une température abusive ou une rupture de la chaîne du froid est utilisée dans cette étude parce que les *S. aureus* se développent et produisent des toxines à des températures inadéquates généralement supérieures à celles utilisées pour la réfrigération (**Alonso-Hernando et al., 2015**). Dans cette étude, une nette réduction de la croissance de *S. aureus*, des germes totaux et psychrotrophes a été enregistrée dans la mousse au chocolat traitée avec l'HE de *M. pulegium* sans effets remarquables entre la réfrigération et les conditions de température abusive. Dans une étude similaire, **Shahbazi et al. (2019)** ont rapporté que le traitement à l'huile essentielle de menthe verte retardait considérablement la croissance de *S. aureus* dans la soupe de poisson conservée à la température de réfrigération et abusive, par rapport à la température ambiante. La croissance de *L. monocytogenes* a également été réduite par l'huile essentielle de clous de girofle à 25 °C qu'à 4 °C (**Miladi et al., 2010**), car leurs principaux composants antimicrobiens sont moins dissous lorsqu'ils sont exposés à la réfrigération (**Tajik et al., 2014**). Cependant, **Moore-Neibel et al. (2013)** ont conclu que la température de stockage a un effet limité sur l'efficacité de l'huile d'origan vis-à-vis de *Salmonella*, suggérant que l'activité antibactérienne des huiles essentielles n'est pas toujours influencée de la même manière par la température de conservation dans différents produits alimentaires.

Conclusion

La présente étude nous a permis d'une part de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*, et d'autre part 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 (0.2 et 0.4%) de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) durant son stockage à 4 °C et à la température abusive. Le rendement moyen en huile essentielle de la partie aérienne de *M. pulegium* est de 0.8% (v/w). L'analyse chromatographique par CG/SM de l'HE a permis d'identifier 4 composés majoritaires de l'HE de *M. pulegium* qui sont : Piperitenone (41.4%), Pulegone (27.1%), Piperitone (9%) et cis-Menthone (9.1%). D'autres composés sont également présents dans l'huile *M. pulegium*, mais à des teneurs moins importantes.

L'incorporation de l'HE de *M. pulegium* a effectivement réduit la croissance de *S. aureus* dans la mousse au chocolat pendant le temps de stockage, sans montrer d'effets remarquables entre les concentrations et/ou les conditions de stockage. De plus, le traitement de la mousse au chocolat avec l'huile de *M. Pulegium* a inhibé la croissance des germes psychrotrophes et réduit la croissance des aérobies mésophiles à un niveau inférieur aux limites critiques fixées par la réglementation nationale.

L'étude présente également un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle suggère l'utilisation de l'HE de *M. pulegium* comme alternative aux conservateurs synthétiques dans les produits de pâtisserie pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et améliorer la sécurité et la qualité des produits. Néanmoins, des enquêtes réglementaires et toxicologiques sont nécessaires avant d'utiliser cette huile comme additif alimentaire.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées comme perspectives :

- Evaluation de l'effet de l'HE de *M. pulegium* sur la production de toxines staphylococciques dans la même matrice alimentaire ou dans d'autres aliments;
- Evaluation de l'effet groupé et séparé des composés majoritaires de l'huile *M. pulegium* sur la croissance de *S. aureus* pour déterminer le composé ou les composés responsables de l'activité antibactérienne;

- Evaluation de l'effet de l'HE de *M. pulegium* sur d'autres microorganismes pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires, comme *Listeria*, *E. coli* et *Salmonella*.

Références bibliographiques

- Adams M R., Moss M O., (2008).** *Food Microbiology*. 3^{ème} éd. RSC Publishing The Royal Society of Chemistry, 463p.
- Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R et Conchello P., (2012).** Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha* ., *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), 313-319.
- Akram MZ., Firincioğlu S Y., Jalal H et Doğan S C., (2019).** The Use of Essential Oils in Active Food Packaging: A Review of Recent Studies. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(11), 1799-1804.
- Ala'Aldeen D., Hiramatsu K., (2004).** *Staphylococcus aureus Molecular and Clinical Aspects*. Horwood Publishing Limited, England, 267p.
- Alonso-Hernando A., Alonso-Calleja C et 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.
- Amalich S., Zerkani H., Cherrat A., Soro N'Dédianhoua K., Bourakhouadar M., Mahjoubi M., EL Hilali F et Zair T., (2016).** Study on *Mentha pulegium* L. from M'irt (Morocco): Antibacterial and antifungal activities of a pulegone-rich essential oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(5), 363-370.
- Aragon-Alegro L C., Alarcon Alegro J H., Roberta Cardarelli H., Chih Chiu M., & Isay Saad S M., (2007).** Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669–675.
- Asadi S., Rezaei Maram Z & 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.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D et Idaomar M., (2008).** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, (46), 446-475.
- Bardeau F., (2009).** *Les Huiles Essentielles*. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Fernand Lanore, 315p.
- Baumert H., Spannagel C et Wisniewski E., (2015).** *CAP Agent Polyvalent de Restauration: CAP*. Editions BPI, 323p.

- Bendjelloul F., (2018).** Détermination du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. sur quelques microorganismes phytopathogènes. Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, 52p.
- Bhatia A., Zahoor S., (2007).** Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 1(2), 188-197.
- Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G et Verne-Bourdais E., (2002).** *Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires*, Doin. 245p.
- Bornert G., (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(11), 1003-1010.
- Botineau M., (2010).** *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*.Lavoisier, Paris, 1403p.
- Boukhebt H., Chaker AN., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M., Laouer H et Harzallah D., (2011).** Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3(4), 267-275.
- Bourgeois C M., Leveau J Y., (1991).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, coordonnateurs, 422.
- Bouyahya A., Et-Touys A., Bakri Y., Ahmed T., Fellah H, Abrini J et Dakka N., (2017).** Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*, (111), 41-49.
- Brahmi F., Abdenour A., Bruno M., Silvia P., Alessandra P., Danilo F., Drifa Y-G., Fahmi E M., Khodir M et Mohamed C. (2016).** Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.
- British Pharmacopoeia. (1990).** London: Her Majesty's Stationary Office.
- Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Cardarelli H R., Aragon-Alegro L C., Alegro J H A., de Castro I A., & Saad S M I., (2008).** Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture

properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(8), 1318–1324.

Chraibi M., Farah A., Lebrazi S., El Amine O., Houssaini MI et Fikri-Benbrahim K., (2016). Antimycobacterial natural products from Moroccan medicinal plants: Chemical composition, bacteriostatic and bactericidal profile of *Thymus satureioides* and *Mentha pulegium* essential oils. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10(6), 836-840.

Couplan F., (2009). *Le régal végétal: plantes sauvages comestibles*. Editions Ellebore, 527p.

Delarue C., (2015). *The everything easy French cookbook* : Includes Boeuf Bourguignon, Crepes Suzette, Croque-Monsieur Maison, Quiche Lorraine, Mousse au Chocolat...and Hundreds More!. Adams Media, 320p.

Derwich E., Benziane Z., Taouil R., Senhaji O et Touzani M., (2010). Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4(1), 47-54.

Dromigny E., (2012). *Les critères microbiologiques des denrées alimentaires: Réglementation, agents microbiens, autocontrôle*. Lavoisier.Paris, 509p.

Ekrami M., Emam-Djomeh Z., Ghoreishy S A., Najari Z., et Shakoury N. (2019). Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha pulegium*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 529-537.

Eley A R., (1992). *Food poisoning*. Springer-Science & Business Media, BV,191p.

FAO/OMS. (2005). *Hygiène Alimentaire: Textes de Base, Codex Alimentarius - Programme Mixte FAO/OMS Sur Les Normes Alimentaires*. Food & Agriculture Org, 76p.

Fetsch A., (2018). *Staphylococcus aureus*. Elsevier Science. Academic Press, 316p.

Forsythe S J., (2000). *The Microbiology of Safe Food*. Blackwell Science, 412p.

Freeman-Cook L., Freeman-Cook K.,(2006). *Staphylococcus aureus infections*. 2^{ème} éd. Philadelphia: Chelsea House Publishers, 182p.

- Ghasemlou M., Aliheidari N., Fahmi R., Shojaei-Aliabadi S., Keshavarz B., Cran M J et Khaksar R., (2013).** Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1117-1126.
- Gillespie S., Hawkey P M., (2006).** *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. John Wiley & Sons, 620p.
- Guiraud J P., (2003).** *Microbiologie Alimentaire*. DUNOD, Paris, 651p.
- Gyawali R., Ibrahim S A., (2014).** Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Hanneman L J., (2005).** *Pâtisserie* 2^{ème} éd. Butterworth-Heinemann, 334p.
- Hashemi S M B., Khaneghah A M et Sant'Ana AS., (2018).** *Essential Oils in Food Processing Chemistry, Safety and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, 373p.
- Hayes R., (1995).** *Food Microbiology and Hygiene* 2^{ème} éd. Springer Science & Business Media, 516p.
- Honeyman A L., Friedman H et Bendinelli M. (2002).** *Staphylococcus aureus Infection and Disease*. Kluwer Academic Publishers, New York, 330p.
- Huete A., (2012).** *Huiles Essentielles pour tous les Jours*. Ed Artémis, France, 224p.
- Hunter M., (2009).** *Essential Oils Art, Agriculture, Science, Industry and Entrepreneurship (A Focus on the Asia-Pacific region)*. Nova Science Publishers, Inc, New York, 780p.
- Hüsni Can Başer K., Buchbauer G., (2010).** *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications*. CRC Press Taylor & Francis Group, 1109p.
- Jay J M., (2000).** *Modern Food Microbiology*. 6^{ème} éd. Aspen Publishers, Inc. 635p
- Johnson S A., (2015).** *Evidence-Based Essential Oil Therapy : The Ultimate Guide to the Therapeutic and Clinical Application of Essential Oils*. Ed Scott A. Johnson Professional Writing Services, LLC, 506p.
- JORADP n°39 (2017) :** Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
- JORADP n°65 (2019) :** Arrêté du 11 Moharram 1441 correspondant au 11 septembre 2019 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des micro-

organismes par comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface.

JORADP n°68 (2014) : Arrêté du 21 Rajab 1435 correspondant au 21 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces).

Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., (2012). *La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée.* Ed Springer, Paris, 226p.

Khardori N M., (2016). *Food Microbiology In Human Health and Disease.* CRC Press, 187p.

Kokkini S., Hanlidou E., Karousou R et Lanaras T., (2002). Variation of Pulegone Content in Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) Plants Growing Wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research.*, 14, 224-227.

Lanciotti R., Sinigaglia M., Gardini F., & Elisabetta Guerzoni M. (1998). *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. *Microbiological Research*, 153(2), 145–148.

Lawrence B M., (2007). *Mint The Genus Mentha.* CRC Press Taylor & Francis Group, New York, 527p.

Le Loir Y., Gautier M., (2010). *Staphylococcus aureus* collection Monographies de microbiologie. Ed Lavoisier, 300p.

Lubrano-Lavadera A S., Braesco V et Chnson-rollé A., (2014). Desserts lactés frais. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 50(2), 109–116.

Mahboubi M., Haghi G., (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 325-327.

Malik S., (2019). *Essential Oil Research Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production.* Springer Nature Switzerland AG, 449p.

Marth E H., Steele J L., (2001). *Applied Dairy Microbiology.* 2^{ème} éd. Marcel Dekker. New York, 744p.

- Ménard G., (1992).** *Le blé : éléments fondamentaux et transformation*. Les presses de l'université Laval. Sainte-Foy, Canada, 439p.
- Mhamdi N E H., Henanou K E A., (2019).** Evaluation de la qualité microbiologique des pâtisseries commercialisées au centre de la wilaya de Biskra, mémoire de master, Université Mohamed Khider de Biskra, 51p.
- Miladi H., Chaieb K., Ammar E et Bakhrouf A., (2010).** Inhibitory effect of clove oil (*Syzyium aromaticum*) against *Listeria monocytogenes* cells incubated in fresh-cut salmon. *Journal of Food Safety*, 30, 432–442.
- 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. 91p.
- Miraj S., Kiani S., (2016).** Study of pharmacological effect of *Mentha pulegium* : A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8(9), 242-245.
- Montville T J., Matthews K R., (2008).** *Food Microbiology An Introduction* 2ème éd. ASM Press, Washington USA, 408p.
- Moore-Neibel K., Gerber C., Patel J., Friedman M., Jaroni D., Ravishankar S., (2013).** Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. *Food Microbiology*, 34, 123-129.
- Norme NF ISO 7218., (1996).** Microbiologie des aliments : Règles générales pour les examens microbiologiques. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
- Norme NF-V 08-51., (1999).** Technique de dénombrement de la flore aérobie mésophile totale par comptage des colonies obtenues à 30°C. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
- Norme NF-V-08-014., (1999).** Microbiologie des aliments : méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus* et autres espèces). Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
- Nout R., Hounhouigan J D et Boekel T V., (2003).** *Les aliments transformation, conservation et qualité*. Backhuys Publishers. CTA Le Centre technique de coopération agricole et rurale, 268p.

O'Connor L., (2006). *Diagnostic Bacteriology Protocols* 2^{ème} éd. Humana Press. Totowa, New Jersey, 225p.

Ouakouak H., Chohra M et Denane., (2015). Chemical Composition, Antioxidant Activities of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L, South East of Algeria. *International Letters of Natural Sciences*, (39), 49-55.

Pebret F., (2003). *Maladies infectieuses* : toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. Heures de France, 592p.

Peters M., (2016). *Essential Oils* Historical Significance, Chemical Composition and Medicinal Uses and Benefits. Nova Science Publishers Inc, New York, 201p.

Pierre M., Lys M., (2000). *Secrets des plantes*. Ed Artemis, 463p.

Prost J., Christine de Sainte Marie et Delfosse C., (2000). *Patrimoine rural et économie locale* : le cas des pâtisseries corses au brocciu. In *Campagne de tous nos désirs. Patrimoines et nouveaux usages sociaux*. Maisons des Sciences de l'Homme. Collection Ethnologie de la France.

Rai M K., Kon K V., (2013). *Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essential Oils And Their Components*. Elsevier Academic Press, 271p.

Raut J S., Karuppayil S M., (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, (62), 250–264.

Ray B., (2004). *Fundamental Food Microbiology*. 3^{ème} éd. CRC PRESS, 608p.

Reyes-Jurado F., Franco-Vega A., Ramírez-Corona N., Palou E et López-Malo A., (2014). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, (7), 275–297.

Rice L B., (2006). Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 6A(119), S11-S19.

Rinsky G., Rinsky L H., (2009). *The Pastry Chef's Companion: A Comprehensive Resource Guide for the Baking and Pastry Professional*. John Wiley & Sons, New Jersey, 384p.

- Rumjuankiat K., Keawsompong S et Nitisinprasert S., (2017).** Bacterial contaminants from frozen puff pastry production process and their growth inhibition by antimicrobial substances from lactic acid bacteria. *Food Science & Nutrition*, 5, 454-465.
- Sadeghi1 E., Mohammadi A., Jamilpanah M., Bashiri M., Bohlouli S., (2016).** Antimicrobial Effects of *Mentha pulegium* Essential Oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian White Cheese. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 3, 20-24.
- Salarbashi D., Tajik S., Shojaee-Aliabadi S., Ghasemlou M., Moayyed H., Khaksar R et Noghabi M S., (2014).** Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated Zataria multiflora Boiss and Mentha pulegium essential oils. *Food Chemistry*, 146, 614-622.
- Salehi B., Stojanović-Radić Z., Matejić J., Sharopov F., Antolak H., Kręgiel D., Sen S., Sharifi-Rad M., Acharya K., Sharifi-Rad R., Martorell M., Sureda A., Martins N et Sharifi-Rad J., (2018).** Plants of Genus Mentha: From Farm to Food Factory, *Plants*, 7(3), 70.
- Scherer R., Lemos M F., Lemos M F., Martinelli G C., Martins J D L et da Silva A G., (2013).** Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 50, 408-413.
- Seidemann J., (2005).** *World Spice Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 591p.
- 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.
- Sharifzadeh A., Hajsharifi-Shahreza M et 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.
- Silvant C., (2015).** *L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité*. Editions Publibook, 208p.
- Smith J P., Daifas D P., El-Khoury W., Koukoutsis J., El-Khoury A., (2004).** Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(1), 19-55.

- Taghizadeh G., Jahadi M., Abbasi H., (2018).** Physicochemical Properties of Probiotic Soy Milk Chocolate Mousse During Refrigerated Storage. *Applied Food Biotechnology*, 5 (2), 79-86.
- Tajik H., Farhangfar A., Moradi M., & Razavi Rohani S M., (2012).** 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*, 38(1), 31–38.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N R., Nogueira J M F., Saraiva J A et Nunes M L., (2012).** European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 81-87.
- Thormar H., (2011).** *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons, 315p.
- Vollum R L., Jamison D G et Cummins C S., (1970).** *Fairbrother's Textbook Of Bacteriology*. 10^{ème} éd. R. W. Faibbrother And William Heinemann Medical Books Ltd, 447p.
- Vos P D., Garrity G M., Jones D., Krieg N R., Ludwig W., Rainey F A., Schleifer K H et Whitman W B., (2011).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2^{ème} éd. volume 3. Springer Science & Business Media, 450p.
- Wilson M., (2008).** *Bacteriology of Humans An Ecological Perspective*. Ed Blackwell, 351p.
- Xylia P., Chrysargyris A., Botsaris G et Tzortzakis N., (2017).** Potential application of spearmint and lavender essential oils for assuring endive quality and safety. *Crop Protection*, 102, 94-103.