

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences

Département de science de la nature et de la vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Présenté par :

Melle. ABADA Houda

Melle. MESLOU Soulef Yasmine

Contribution à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des graines de la plante *Mentha suaveolens* de la région d'Ain Témouchent

Encadrant :

M. Bennabi Farid

Maitre de conférence "B" à C.U.B.B.A.T.

Soutenu le 26 juin 2019

Devant le jury composé de :

Président : Mme. Bentabet Nesrine (M.C.B) C.U.B.B.A.T.

Examineur : M. Mouedden Nasreddine Riad (M.A.A) C.U.B.B.A.T.

Encadrant : M. Bennabi Farid (M.C.B) C.U.B.B.A.T.

Année universitaire : 2018-2019

Remerciement

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de DIEU, qui nous a offert santé, force, patience et volonté jusqu'au dernier moment. Nous remercions DIEU pour ça et pour tout le reste.

Alors, Il ne serait pas possible de nous présenter ce mémoire sans témoigner de nos profondes gratitude et nos sincères remerciements à Monsieur Bennabi Farid, pour avoir encadré, pour sa gentillesse, ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail.

Nous remercierons : Mem. Bentabet Nesrine d'être le président de membre de juré de notre mémoire.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr.Mouedden Riad, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos remerciements aussi à toute l'équipe de labo :

Mem. Meftahi chokria, Mr. Mehammadi walid, pour leurs, gentillesse, encouragements, disponibilité et pour toute aide apportée.

Mr. Rahmani khaled, pour son aide, sa disponibilité. Leur conseil et encouragement durant la préparation de notre mémoire.

A tous Les collègues de la promotion 2018-2019 pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

Enfin un énorme Merci à tous ceux qui nous ont aidé, conseillé, et ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront certainement.



Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

A mes Parents, sans qui, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, la conséquence de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude Je vous aime énormément que dieu vous garde pour moi.

A mes sœurs Loubna, Marwa, Riheb et Hiba et ma chère amie ***sabrina*** qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et confiance, je vous aime du fond de mon cœur.

A ma chère copine Houda, pour leur bonne compagnie au cours de ce chemin, avec des beaux souvenirs qui perpétué par notre amitié, je te souhaite que de bien et de bonheur a ta vie.

Une spéciale dédicace pour tous ma famille pour leur amour et leur soutien que dieu les protègent.

Ainsi qu'à tous mes amis.

Soulef Yasmine



Dédicace

Avant tout, je tiens à remercier le bon dieu et l'unique qui m'a offert le courage et la volonté nécessaire pour affronter les différentes épreuves de la vie.

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère, *Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse qui n'a pas cessé de m'encourager.*

Aucune dédicace ne saurait exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices et les efforts que tu n'as jamais cessé de me donner.

A mon très cher père, *en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens, les sacrifices et la tendresse tout au long de mes études, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous m'avez donné pour mon éducation et ma formation.

*À tous mes très chers frères :**Hamza et Athmane.***

À mes très chères sœurs *pour leur grand amour, leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

A mon binôme Soulef, *en témoignage d'amitié sincère qui nous a liées et des bons moments passés ensemble. Merci du fond du cœur*

A toute ma famille, *pour leur patiente et leur encouragement même de loin.*

A tous ceux que j'aime, qui ont cru en moi, qui ont répondu présent à chaque fois que j'avais besoin d'eux et qui me donnent l'envie d'aller en avant.

Ainsi qu'à tous mes amis.

Houda



Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Première partie : synthèse bibliographique	
Chapitre I : les plantes médicinales	
1. Généralité sur les plantes médicinales	3
1.1. Définition	3
1.2. L'origine des plantes médicinales	3
1.2.1. Plante sauvage « de cueillette »	3
1.2.3. Les plantes de culture	4
2. Les métabolites secondaires.....	4
2.1. Classification des métabolites secondaires	5
2.1.1. Les composés phénoliques	5
2.1.2. Les composés terpéniques	10
2.1.3. Les saponines	11
2.1.4. Les alcaloïdes	12
Chapitre II :Généralité sur la plante mentha suaveolens	
1. Famille des lamiacée.....	14
2. Définition de la plante	14
3. taxonomie	14
4. Description botanique	15
5. Répartition géographique.....	15
Chapitre III : Les huiles essentielles	
1. Généralité sur les huiles essentielles	16

2. L’historique des huiles essentielles	16
3. Localisation des HE dans les plantes	17
4. La biosynthèse des huiles essentielles	17
4.1. Voies des terpènes	17
4.2. Voies des phénylpropanes	17
5. La composition des huiles essentielles	18
6. Rôle des HE dans les plantes	20
7. L’activité des huiles essentielles	20
7.1. Les propriétés antimicrobiennes important.....	20
7.1.1. Pouvoir antiseptique	21
7.1.2. Mode d’action contre les bactéries	21
8. Procédé d’extraction	21
8.1. Extraction par hydrodistillation à l’eau	21
8.2. Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d’eau	22
8.3 Extraction par les solvants organiques.....	22
8.4. Expression à froid	23
8.5. L’extraction au CO2 supercritique.....	23

Matériel et méthode

1. Collecte du matériel végétal	25
2. Préparation des extraits végétaux.....	27
2.1. Préparation de l’extrait aqueux	27
2.1. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante	27
3. Tests phytochimiques	29
3.1. Etudes qualitatifs	29
3.1.1. Tanins.....	29
3.1.2. Saponosides.....	29
3.1.3. Flavonoïdes	30
3.1.4. Glucosides cardiotoniques.....	30

3.1.5. Coumarine	30
3.1.6. Alcaloïdes	30
3.1.7. Amidon.....	30
3.1.8. Mucilage.....	31
3.1.9. Emodols.....	31
3.1.10. Quinone libre	31
3.1.11. Stérol (réaction de Libermann-Burchard)	31
3.2. Etude quantitative	32
3.2.1. Composés phénolique (méthode de bleu au prusse)	32
3.2.2. Sucre totaux.....	33
4. L'étude de l'activité antimicrobienne d'huiles essentielle	34
4.1. Extraction et conservation d'HE.....	34
4.1.1. Détermination de rendement	35
4.1.2. Détermination de l'humidité.....	35
4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	36
4.2.1. Méthode en milieu solide	37
4.2.2. Méthode en milieu liquide	40
4.2.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	41
4.2.5. L'interaction synergique de l'huile avec quelque antibiotique.....	42
Résultat et discussion	
1. Les tests phytochimiques	44
2. Teneurs en composés phénoliques	46
3. Teneurs en sucres totaux	47
4. Analyses d'huile essentielle extraite.....	48
5. Etude de l'activité anti microbienne.....	50
5.1. L'activité antibactérienne	52
5.2. L'activité antifongique	54
6. Etudes de l'effet des antibiotiques et l'association « huile essentielle/antibiotique »..	54

6.1. L'antibiogramme	56
6.2. Effet de l'association « huile essentielle/antibiotique »	56
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	57
8. Détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu solide.....	59
9. Qualification de l'activité antimicrobienne de l'HE	60
Conclusion.....	62

Résumé

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

% : Pourcentage

µl : Micro – litre

ATB : Antibiotique

ATP : Adénosine-tri-phosphate

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMADP : dimethylallyl diphosphate

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DZI : diamètre des zones d'inhibition

EA : extrait aqueux

EAc : extrait acétonique

ED : eau distillé

EDE : extrait éther-diéthylique

Er : Erythromycine

GEN : Gentamicine

H % : taux d'humidité exprimé en pourcentage

HE : Huile Essentielle

IPP : isopentényl diphosphate

MEP : méthyle- érythritol-4-phosphate

MEV : voie de l'acide mévalonique

Mg : Milligramme

MH: Mueller Hinton

ml : Millilitre

mm : Millimètre

M.S : Mentha Suaveolens

nm : nanomètre

P : la prise d'essai en « mg »

PDA : Potato Dextrose Agar

RHE : Rendement de l'Huile Essentielle

ST : Sucre totaux

T (-) : témoin négative

T (+) : témoin positive

UFC : Unité Formant Colonie

UV : Ultra Violet

Van : Vancomycin

Liste des figures

Figure n°01 : la structure simple du noyau aromatique.....	05
Figure n°02 : structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone.....	06
Figure n°03 : modèle des tanins hydrolysables (gallotannin et ellagitannins).....	07
Figure n°04 : modèle des tanins condensés type B.....	08
Figure n°05 : Structure générale des anthocyanes.....	08
Figure n°06 : Deux squelettes représentatifs de sapogénines triterpénoïdes (acide Oléanolique) et stéroïdiens (diosgénine).....	12
Figure n° 07 : Carte de répartition en Europe et la région méditerranéenne.....	15
Figure n°08 : structure de phénylpropane.....	18
Figure n°09 : schéma des étapes de l'hydrodistillation.....	22
Figure n°10 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction Par entraînement à la vapeur de l'eau.....	22
Figure n°11 : Schéma du « procédé de récupération de l'huile essentielle des fruits».....	23
Figure n°12 : Schéma du système d'extraction CO2 des solides.....	23
Figure n°13 : la plante mentha suaveolens.....	25
Figure n°14 : les graines de la plante mentha suaveolens.....	25
Figure n°15 : zone de récolte de <i>M. suaveolens</i>	26
Figure n°16 : Broyage de la partie aérien de la plante « <i>M. suaveolens</i> » sèche.....	26
Figure n°17 : les étapes de la préparation des extraits.....	27
Figure n°18 : Les extraits de <i>M. suaveolens</i>	28
Figure n°19 : Montage de l'extraction d'huiles essentiel de M.S.....	34
Figure n°20 : Les différentes dilutions d'HE.....	37
Figure n°21 : Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	39
Figure n°22 : Méthode des micro-dilutions.....	40
Figure n°23 : Représentation graphique de taux d'humidité de la plante <i>M.suaveolens</i>	49
Figure n°24 : Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne et mycélienne.....	51
Figure n°25 : représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne.....	52
Figure n°26 : Représentation graphique des résultats de l'association d'huile <i>M.suaveolens</i> avec les antibiotiques testés.....	55
Figure n°27 : Représentation graphique des CMI d'huile essentielle <i>M.suaveolens</i> relative	

aux souches bactériennes et fongique.....57

Figure n°28 : Représentation graphique des CMB d'huile essentielle *M.suaveolens* relative aux souches bactériennes et fongique.....59

Liste des tableaux

Tableau 01 : Structure des classes des coumarines.....	10
Tableau 02 : Composition chimique et de l'huile essentielle de <i>M. suaveolens</i>	19
Tableau 03 : Les souches bactériennes.....	36
Tableau 04 : Composition phytochimique des extraits de la partie aérienne de la plante <i>M.suaveolens</i>	44
Tableau 05 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) des différentes concentrations d'HE et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes.....	51
Tableau 06 : Effets des différentes associations « HE /Antibiotiques », l'antibiotique et HE sur les cinq souches microbiennes.....	56
Tableau 07 : Résultats de l'activité antimicrobienne de huile essentielle <i>M. suaveolens</i> réalisé par la méthode de CMI.....	57
Tableau 08 : Résultats des CMB et CMF d'HE de <i>M.suaveolens</i>	59
Tableau 09 : Le rapport CMB/CMI et CMF/CMI relative aux cinq souches microbiennes...	60

Introduction



Introduction

Actuellement, selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale, surtout dans les pays sous-développés, ont recours aux traitements traditionnels pour satisfaire leurs besoins en matière de santé et de soins primaires(**Eddouks et al., 2007**).

La plus grande partie des plantes, utilisée au niveau mondiale, est destinée à la phytothérapie, à la production de molécules pour la médecine allopathique, à l'élaboration des arômes(**Elmeskaoui et al., 2008**).

La Phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes « ou la seule "partie active" de ces plantes » ayant des propriétés thérapeutiques. Ces plantes sont appelées "plantes médicinales". Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais dans la plupart des cas des espèces sauvages (**Mohammedi, 2013**).

L'Algérie, offre une végétation riche et diverse avec un grand nombre de plantes aromatiques spontanées. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années (**Adida et al., 2016**).

Cependant, la flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% d'endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**Bouzig et al., 2017**).

Cette richesse et cette originalité font que l'étude de la flore d'Algérie présente un intérêt scientifique fondamental dans le domaine de l'ethnobotanique, de la pharmacopée traditionnelle mais également un intérêt scientifique appliqué dans le domaine de la valorisation des substances naturelles (**Bouzig et al., 2017**).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs(**Boukezata, 2015**).

Les plantes possèdent des métabolites dites « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces à l'autre (**Krief, 2003**).

Introduction

La famille des Lamiacées englobe une grande variété de plantes aromatiques, distribuées principalement dans les pays à climat tempéré (**Derwich et al., 2011**). Elle comprend environ 220 genres et plus de 4000 espèces (**Arijit et Arpita, 2013**), dont le genre *Mentha* avec ses 25 espèces (**Rodrigues et al., 2013**). *M. suaveolens* « plante médicinales largement distribuée en Algérie » est plus utilisée et la plus commune de toute la famille des Lamiacées. Elle est utilisée comme condiment et en médecine traditionnelle pour ses propriétés: tonique, stimulante, digestive, carminative, analgésique, cholérique, antispasmodique, anti-inflammatoire, sédative et hypotensive (**Tripathi et al., 2004**).

L'objectif de notre travail consiste à la valorisation de la plante *M. souaveolens* de la région Sid Safi à l'Ouest Algérien, par la recherche des composés qui peuvent trouver une utilisation thérapeutique. Pour cela, une plante, de la famille lamiacée, a fait l'objet d'une étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *M.souaveolens* vis-à-vis de cinq souches par la méthode de diffusion sur gélose.

Ce travail sera présenté comme suit :

Une partie relative à l'étude bibliographique qui se compose en trois chapitres:

L'état des connaissances des plantes médicinales et les métabolites secondaires sera présenté dans un premier chapitre.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général et botanique sur l'espèce *M.souaveolens*. Et pour le troisième chapitre concernant les huiles essentielles.

Une autre partie réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux : l'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacré à la présentation des résultats obtenus et la discussion.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Synthèse

Bibliographique



1. Généralité sur les plantes médicinales

L'utilisation des plantes pour leurs propriétés médicinales est une pratique très ancienne remontant aux premières civilisations et bien préservée depuis des siècles dans le monde entier (**Landoulsi et al., 2018**).

Les archives historiques des plantes médicinales ont révélé que leur utilisation remonte à 5000 ans av. Par les Syriens, les Babyloniens, les Hébreux et les Égyptiens (**El Azzouzi et Zidane, 2015**).

1.1. Définition

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux de l'humanité, en particulier pour la plupart des communautés qui en dépendent pour leurs soins de santé primaires et leur subsistance (**Salhiet al., 2010**). Il s'agit de plantes contenant une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou comme précurseurs dans la fabrication de drogues utiles (**Sofowora, 2010**).

Les plantes médicinales sont actives dans différents secteurs sous la forme de principes actifs, des huiles, des extraits ou des solutions, qu'elles soient aqueuses ou biologiques (**Zbalah et Belarbi 2018**).

1.2. L'origine des plantes médicinales

L'Organisation mondiale de la santé définit les plantes médicinales comme "toutes les plantes, sauvages ou cultivées, utilisées à des fins médicinales (**Abdelnour et Arnold, 2004**).

L'activité pharmacologique des plantes médicinales sélectionnées doit être évaluée scientifiquement et déterminer si elles confirment leur réputation, et il est également nécessaire de vérifier l'absence de toxicité des plantes utilisées (**Arab et al., 2013**).

1.2.1. Plante sauvage « de cueillette »

Les plantes sauvages sont des membres du règne végétal capables de se reproduire sans l'aide de l'homme. C'est la première plante indigène appelée "spontanée" et ensuite les plantes sont introduites par l'homme qui s'adapte parfaitement à son nouvel environnement (**Couplan, 2009**).

Synthèse bibliographique

Les recherches ont montré l'importance des espèces de plantes sauvages dans le régime alimentaire des hommes, en particulier en période de pénurie (**Diarra et al., 2016**), a joué un rôle important dans la vie de nombreuses personnes dans les pays en développement, où elles sont généralement utilisées à des fins médicales ou en tant que sources d'énergie et de nutriments (**N'zebo Jean-Michel et al., 2018**).

1.2.3. Les plantes de culture

Dans la majorité des cas, les plantes médicinales sont obtenues par culture, ce mode de production peut être organisé afin d'abaisser les coûts de production. De plus la qualité des plantes cultivées peut être améliorée afin d'augmenter les teneurs en principes actifs, d'augmenter leur résistance à divers agents (conditions climatiques défavorables, maladies, parasites).

Pour réaliser cette amélioration, on peut jouer sur différents facteurs :

Action sur les facteurs génétiques : on effectue alors une sélection qui peut être :

-Conservatrice ou naturelle à l'intérieur d'une population hétérogène de plante dans laquelle sont sélectionnées les plantes qui possèdent dans leur patrimoine génétique les caractères les plus intéressants.

-Créatrice ou artificielle, dans ce cas le patrimoine génétique est modifié diverses techniques agronomiques (mutations, hybridations et gynogenèse fusions de protoplastes....).

Action sur les facteurs écologiques : l'influence du lieu de culture et des conditions culturales (sol, altitude, température, insolation, humidité...), ils sont étudiés de manière systématique (**Gazengel et Orechioni, 2001**)

2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés biosynthésés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal (**Guillaume et Charrouf, 2005**).

Les principales fonctions dans les plantes sont protection contre les virus, les maladies bactériennes, les infections fongiques, et résister à un stress environnemental (**Pegoraro, 2007**).

2.1. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes, qui sont très inégalement réparties chez les végétaux (**Macheix et al., 2005**).

Ces composés sont très nombreux et variés, et certains sont largement répandus, comme les alcaloïdes, les terpènes et les tanins, tandis que d'autres ont une répartition plus restreinte comme les composés soufrés(**Najjaa et al., 2011**).

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Ces classes sont présentées ci-après.

2.1.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles (**Boizot et Charpentier, 2006**) libres ou engagés avec une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre...). A l'heure actuelle plus de 8000 composés a été isolé et identifier (**Mompon et al., 1998**).

Ils sont retrouvés dans tous les niveaux de la plante (**Ranjeva et al., 1977**) racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits... jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits(**Amiot et al., 1989**).

Structures et classifications des composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont synthétisés à partir des hydrates de carbone par **la voie de l'acide shikimique** et **la voie de l'acétate**.

La structure des composés phénoliques caractérisé par une simple noyau aromatique(figure n°01) de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire(**Chira et al., 2008**).

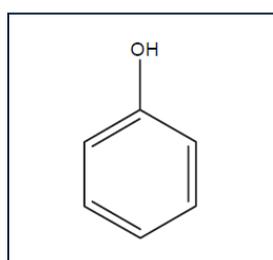


Figure n°01 : la structure simple du noyau aromatique.
(**Vermerris et Nicholson 2008**)

Synthèse bibliographique

Les polyphénols sont communément subdivisés en acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, tanins, coumarines, quinones, flavonoïdes, et lignanes (Vermerris et Nicholson, 2008).

2.1.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques présents dans les végétaux (Hollman et Katan, 1997) Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

On les trouve dans divers fruits, légumes, noix, graines, herbes, épices, tiges, fleurs, ainsi que dans des boissons telles que le thé, vin rouge (Middleton et al., 2000), près de 5000 flavonoïdes repartis en 13 classes sont connus (Wollgast et Anklam, 2000).

L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle A, B et C, qui constituent leur structure chimique ; on distingue différents types de noyaux : (Saito et al., 2013)

Chalcones, Dihydrochalcones, Aurones, Flavones, Flavonols, Dihydroflavonols, Flavanones, Flavanols, Flavandiol, Anthocyanidin, Isoflavonoïdes, Biflavonoïdes, Proanthocyanidins (Wollgast et Anklam 2000).

Structure:

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone (Ghedira, 2005).

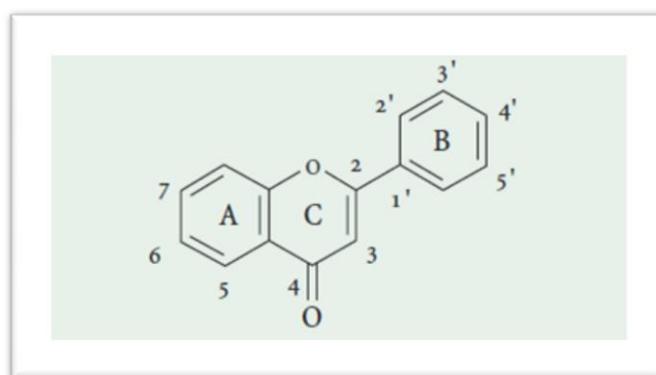


Figure n°02 : structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone.

Synthèse bibliographique

Les flavonoïdes sont le groupe le plus connu de composés phénoliques d'origine biosynthétique mixte comprenant 15 atomes de carbone, formant une structure C6-C3-C6 constitué de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné (C) et ils existent sous forme simples ou glycosylés (**Pietta, 2000**).

2.1.1.2. Les tanins

Le nom «tanin» est dérivé du français «tanin» (tannant substance) utilisé pour une gamme de polyphénols naturels. Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir (**Khanbabaee et Van Ree, 2001**). Ce terme a été utilisé pour la première fois par Seguin en 1796 (**White, 1957**).

Les tanins sont un groupe des polyphénols du poids moléculaire moyenne ou élevé. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (**Refat et al., 2008**).

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, graine, fruits, etc.) (**Khanbabaee et Van Ree, 2001**).

Ils se composent en deux grands groupes : les tanins hydrolysables ou tanins galliques qui sont des esters de l'acide gallique ou l'acide ellagique et les tanins condensés non hydrolysables ou tanins catéchiques (**Khanbabaee et Van Ree, 2001**).

2.1.1.2.1. Tanin hydrolysables

Les tanins Hydrolysables sont constitués d'acide gallique et de ses dimères. Ces tanins sont facilement hydrolysés avec acide, alcalin et eau chaude et par action enzymatique cédant à l'alcool polyhydrique et à l'acide phénylcarboxique.

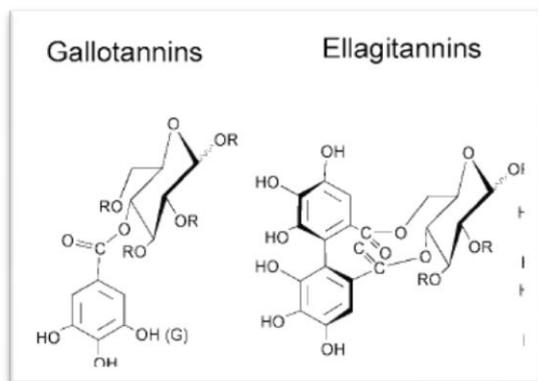


Figure n°03: modèle des tanins hydrolysables (gallotannin et ellagitannins) (**Khanbabaee et Van Ree 2001**)

2.1.1.2.2. Tanin condensé

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées(Wollgast et Anklam, 2000), et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A(Dykes et Rooney, 2006).

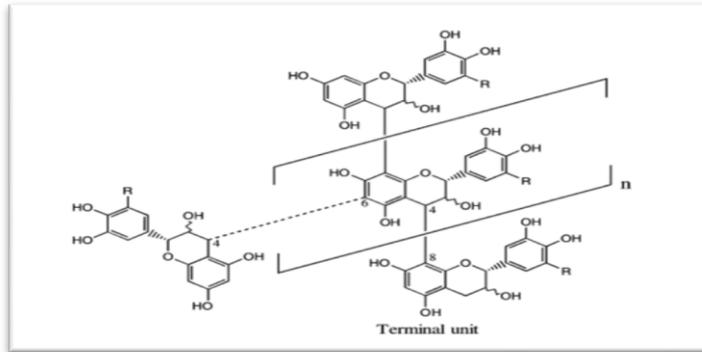


Figure n°04 : modèle des tanins condensés type B (Schofield et al., 2001).

2.1.1.3. Les anthocyanes :

Les anthocyanes ou les anthocyanines est un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leur dérivés glycosylés, ces molécules faisant parties de la famille des flavonoïdes sont des pigments naturels qui confèrent aux fleurs, fruits et les baie tous les couleurs allant du bleu ou rouge(Castaneda-Ovando et al., 2009).

2.1.1.3.1. Structure des anthocyanes

La structure de base des anthocyanes est caractérisée par un noyau « flavon », généralement glycolyse en position C3(Lee et al., 2005)

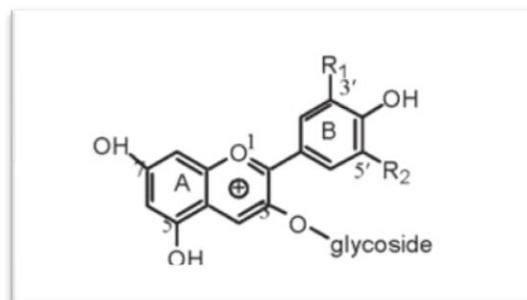


Figure n°05 :Structure générale des anthocyanes(Lee et al., 2005)

2.1.1.3.2. Classification des anthocyanes

Les anthocyanes peuvent être groupés en différentes classes basées sur le degré de méthylation, la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. Il y a au moins six principaux types d'anthocyanines: pélagonidines, cyanidines, delphinidins, peonidines, pétunidines et malvidines (Tsuda, 2012).

2.1.1.4. Les coumarines

Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1822 et synthétisées en 1868 par Perkin (Egan et al., 1990). Plus de 1300 des coumarines ont été identifiées comme métabolites secondaires à partir de plantes, de bactéries et de champignons (Venugopala et al., 2013).

Les coumarines sont classées dans la famille des composés benzopyrone, tous constitués d'un cycle benzénique liés à un cycle pyrone (Lacy et O'Kennedy 2004). Les coumarines sont des substances naturelles connues, Il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2 H)-1 pyranone-2 (Venugopala et al., 2013).

Les coumarines constituent une très grande classe de composés trouvés dans tout le règne végétal. Ils se trouvent à niveaux élevés dans certaines huiles essentielles. Et également présente dans les fruits, thé vert et autres aliments tels que la chicorée. (Lacy et O'Kennedy, 2004).

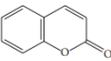
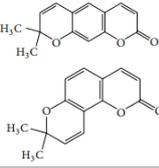
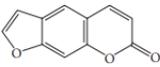
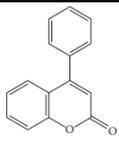
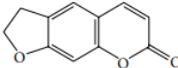
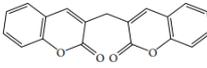
La coumarine et ses dérivés représentent une classe très importante des composés naturels présentant un large spectre d'activités biologiques, telles que les activités cytotoxiques, cardiotoniques et activité photodynamique et antioxydant (Stojković et al., 2018).

2.1.1.4.1. Classification

Les coumarines sont substituées par un hydroxyle ou plus sur les six positions disponibles. La majorité des coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Les auteurs ont classé les coumarines selon la nature des substituants sur leurs structures en six catégories (tableau n°01) (Venugopala et al., 2013).

Synthèse bibliographique

Tableau 01 : Structure des classes des coumarines

classe	structure	Classe	structure
1 -Simple coumarine		4 -Pyrano coumarines divisé en deux types : • type linéaire. • type angulaire.	
2 -Furanocoumarines		5- Phenylcoumarins	
3 -Dihydrofuranocoumarins		6 -Dicoumarines	

2.1.2. Les composés terpéniques

Les terpénoïdes représentent l'un des plus grandes catégories de métabolites secondaires (Leonard et al., 2010). Ils constituent la famille de produits naturels la plus diverse structurellement, stéréochimiquement et fonctionnellement avec plus de 55 000 molécules identifiées à ce jour dans toutes les formes de vie (Christianson, 2008)

Tous les terpénoïdes proviennent des précurseurs simples à 5 atomes de carbone, l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP) assemblés et modifiés de milliers de façons (Christianson, 2007). Les terpènes ont une masse moléculaire relativement faible, ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (Jean, 2009).

Chez les végétaux, les terpénoïdes sont produits par tous les tissus végétatifs dont les racines mais aussi par les diverses pièces florales (Dudareva et al., 2004).

En raison de leurs nombreuses structures, les terpénoïdes constituent un groupe hétérogène de molécules avec différentes propriétés physiques et chimiques. Ils peuvent être saturés et insaturés, volatils, semi-volatils ou non-volatils, à chaîne droite, à chaîne ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou achiraux, portant éventuellement divers groupes fonctionnels oxygénés (ex. alcools, aldéhydes, cétones, esters et éthers) ou contenant de l'azote ou du soufre et solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann et Keeling, 2008; Schwab et al., 2008).

Synthèse bibliographique

Les terpènes ont des fonctions biologiques importantes chez les plantes. De nombreux terpènes sont essentiels pour la croissance des plantes, le développement et le métabolisme général (**Bohlmann et Keeling 2008**). Et représentent des outils importants dans interactions des plantes avec l'environnement (**Tholl, 2006**).

2.1.2.1. La biosynthèse

Les voies métaboliques différentes des terpénoïdes végétales sont tous ancrés dans la formation de seulement deux isomères à 5 carbone (C 5) précurseurs, diméthylallyl diphosphate (DMADP) et isopentényl diphosphate (IDP) .DMADP et IDP sont formées dans la voie de l'acide mévalonique (MEV) et dans la voie de 2 C- méthyle- RÉ- érythritol-4-phosphate (MEP)(Annexe I)(**Bohlmann et Keeling, 2008**).

2.1.2.2. Classification des composés terpéniques

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène dans leur structure de base

- Les terpènes simples ou monoterpènes : formés de deux isoprènes : C₁₀H₁₆
- Les sesquiterpènes : formés de trois isoprènes : C₁₅H₂₄
- Les diterpènes : formés de quatre isoprènes : C₂₀H₃₂
- Les triterpènes : formés de six isoprènes qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines.
- Les tétraterpènes : formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes
- Les polyterpènes : à n isoprènes qui comprennent en particulier, le caoutchouc.(Amel 2018)

2.1.3. Les saponines

Les saponines sont largement distribués dans le règne végétal, compris un groupe hétérogène de composés caractérisé par leur structure contenant des triterpènes ou des stéroïdes et une ou plusieurs chaînes de sucres (**Güçlü-Üstündağ et Mazza, 2007**), lié à une aglycone hydrophobe (sapogénine)(**Francis et al., 2002**).

La grande complexité de la structure des saponines provient de la variation structurale de l'aglycone et de la nature des chaînes latérales et la position de fixation de ces parties sur l'aglycone(**Francis et al., 2002**).

Les saponines ou les extraits de plantes contenant les saponines sont utilisées par l'industrie comme additifs pour l'alimentation et les cosmétiques(**Augustin et al., 2011**).

2.1.3.1. Structure des saponines

Sur le plan structurel, la saponine peut être classée en deux groupes en fonction de la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique(Manase, 2013).

2.1.3.1.1. Les saponines triterpénoïdes

Les saponines triterpénoïdes est une classe de métabolites végétaux de structure différente qui contiennent un ou plusieurs types de sucre associés à aglycones triterpénoïdes hydrophobe (Seki et al., 2015), dans la plupart des cas, une série de saponines peut exister dans la plante, avec le même squelette, mais la chaîne de sucre varie légèrement(Zhang et al., 2018).

2.1.3.1.1. Les saponines stéroïdiennes

Les stéroïdes saponines constituent une catégorie importante de produits naturels pouvant constituer la matière première pour la synthèse des hormones stéroïdes. Il se compose d'une partie d'aglycone et d'une chaîne de sucres composée de sucres simples ou plus(Yang et al., 2006).

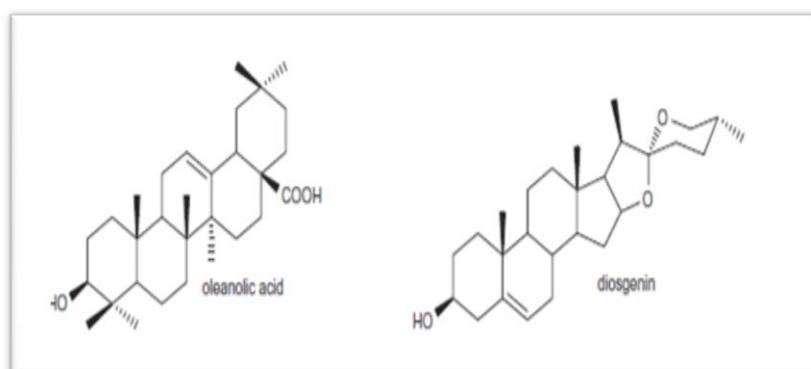


Figure n°06 : Deux squelettes représentatifs de sapogénines triterpénoïdes (acide oléanolique) et stéroïdiens (diosgénine) (Augustin et al., 2011).

2.1.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, (Baxter et al., 1998). plus de dix mille des alcaloïdes ont été isolés des plantes(Hesse, 2002).

Les alcaloïdes sont produits de différentes voies biosynthétiques(Baxter et al., 1998), la plupart du temps à partir des acides aminés(Dewick, 2002). Et sont classés en fonction de l'acide aminé qui fournit l'atome d'azote par exemple :Lysine en pipéridine, La quinolizidine alcaloïde et l'acide nicotinique en pyridine , La tyrosine en phényléthylamines et tétrahydroisoquinolines simples(Dewick, 2002).

Synthèse bibliographique

Les alcaloïdes se composent en deux grands groupes : les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes.

- **Les pseudo-alcaloïdes** présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés d'acides aminés.
- **Les proto-alcaloïdes** sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique (**Jean, 2009**).

1. Famille des lamiacée

La menthe (Lamiacée) est une plante herbacée vivace très parfumée. La variété de menthe, qui comprend 20 espèces réparties dans le monde entier, certaines, telles que *M. pulegium* et *M. suaveolens*, poussent spontanément en Algérie (**Brada et al., 2007**).

Les espèces de lamiacée ont une grande importance en raison de leur utilisation dans la médecine traditionnelle, la cuisine, les cosmétiques, l'aromathérapie et la production d'huiles essentielles (**Riahi et al., 2013**).

2. Définition de la plante

Mentha rotundifolia L. (Labiacée), connue sous le nom de Timija vulgaris ou menthe, (**El Arch et al. 2003**), est une combinaison de *Mentha longifolia* et de *Mentha suaveolens* (**Brada et al., 2007**), qui pousse dans les zones humides et près de rivières dans les petites et moyennes montagnes. Ses feuilles sont utilisées avec d'autres plantes pour combattre les maux d'estomac, la fièvre, la toux, et la décontamination D'hygiène en cas d'infection génitale des voies urinaires (**Zekri et al., 2013**).

3. taxonomie

La *Menthe suaveolens* peut être classée comme suit : (**Seladji, 2015**)

- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous-embranchement** : Angiospermes.
- **Classe** : Eudicots.
- **Sous-classe** : Euastéridées I.
- **Ordre** : Lamiales.
- **Famille** : Lamiacées.
- **Genre** : *Mentha*.
- **Espèce** : *Mentha rotundifolia* L.

Synthèse bibliographique

4. Description botanique

Les principales caractéristiques des espèces de la famille lamiacée sont : **(Chibani, 2013)**

- une tige quadrangulaire.
- des feuilles simples et opposées.
- l'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché.

M. suaveolens est une plante de 10 à 80 cm de hauteur, La tige dressée ou ascendante, à section carrée, est ramifiée pyramidale. La floraison s'étale de juillet à septembre possède des feuilles opposées, crénelées-dentées sur les bords et fortement ridées en réseau et sont sessiles. Le limbe est à nervation réticulée, fortement saillante sur la face inférieure, donnant un aspect gaufré, bosselé typique. La face inférieure, recouverte de poils mous et ramifiés, donne un aspect blanchâtre. Les fleurs sont plutôt violettes. Les fruits sont des akènes en 4 parties lisses à la surface et ovoïdes **(Sutour, 2010; Zekri, 2017)**.

5. Répartition géographique

La forme vert sauvage se trouve dans l'ouest de l'Europe du Danemark à l'est de l'Europe et de l'Afrique du Nord et les Canaries, présente généralement le long des berges, des champs, les rives des lacs humides et le long des routes. et aussi présente en Amérique et au Japon **(Lawrence, 2006; Sutour, 2010)**.

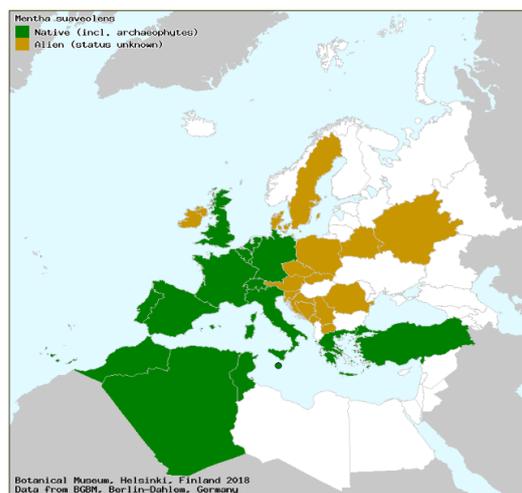


Figure n° 07 : Carte de répartition en Europe et la région méditerranéenne **(Mifsud 2002)**

Synthèse bibliographique

1. Généralité sur les huiles essentielles

Les HE, appelées communément essences végétales. Sont des métabolites secondaires produits par les plantes, odorant et généralement de composition complexe (**Chiasson et Beloin, 2007; Lardry et Haberkorn, 2007; Vigan, 2010**)

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, pharmacie, cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues(**Amarti et al., 2010**).

Selon les normes internationales, les huiles essentielles doivent être liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, lipophile et très volatile, pour atteindre une masse en dessous d'un poids moléculaire de 300(**Lardry et Haberkorn, 2007; Couic-Marinier et Lobstein, 2013; Turek et Stintzing, 2013**).

2. L'historique des huiles essentielles

L'utilisation de substances odorantes de plantes est connu depuis l'antiquité et a été décrit par les plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient puis le nord de l'Afrique suivi de l'Europe. Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des HES occupent une place de plus en plus importante(**Benabdelkader, 2012**).

En 1887, le français Chamberland effectue la première expérimentation scientifique démontrant le pouvoir antiseptique des HE.

En 1889, Cadéac et Meunier, de l'Institut Pasteur, reproduisent avec le même succès les travaux du précédent.

En 1910, l'anglais Martindale, quantifie le pouvoir anti infectieux des HE en procédant à leur classification.

En 1922, les professeurs Courmont, Morel et Rochaix poursuivent et confirment ces travaux.

En 1937, un chimiste de Lyon, René Maurice Gattefossé, publie un ouvrage «Aromathérapie».

En 1980, le Dr Jean Valnet publie aussi un livre intitulé *Aromathérapie*(**Lardry and Haberkorn 2007**)

3. Localisation des HE dans les plantes

Les huiles essentielles sont retrouvées dans tous les organes de la plante (racine, écorce, feuille, fleur, fruit, graine...) Elle provient d'une sécrétion élaborée par certains végétaux et contenue dans des structures spécialisées (poils, poches et canaux sécréteurs) situées le plus souvent dans les fleurs et les feuilles(Lardry et Haberkorn, 2007; Couic-Marinier et Lobstein 2013).

4. La biosynthèse des huiles essentielles

La biosynthèse des huiles essentielles démarre par la photosynthèse (métabolite primaire) qui va se diviser ensuite en 2 voies majeures : (Gauriat, 2015).

4.1. Voies des terpènes

Cette voie aboutit à la synthèse des monoterpènes, des sesquiterpènes, et des diterpènes. La synthèse de ces terpènes fait à partir de l'IPP (isopentényl pyrophosphate en C5), IPP est issue de la voie du mévalonate(Ouali et al., 2017). A ceux-ci pourront s'ajouter des fonctions chimiques diverses (alcool, aldéhyde, phénol, cétone, oxyde) apportant des propriétés chimiques particulières.

Ces molécules apporteront à la plante le côté aromatique et volatil (Gauriat, 2015).

4.2. Voies des phénylpropanes

Cette voie démarre par un acide aminé : la phénylalanine obtenue par la voie du shikimate (Gauriat, 2015).

La phénylalanine conduit à la formation de plusieurs composés des huiles essentielle, des phénols, des acides ou encore des coumarines. Plus rarement, des molécules de type lactones ou phénols méthyl-éthers peuvent être retrouvés(Ouali et al., 2017).

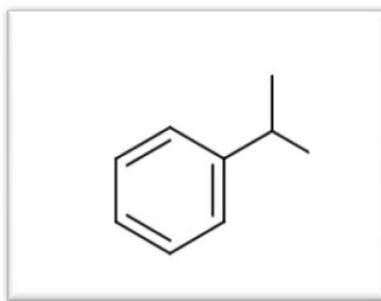


Figure n°08 : structure de phénylpropane.

(Gauriat, 2015)

5. La composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances à partir de matières végétales, La composition de chaque huile essentielle dépend non seulement de la famille, mais aussi de la part de la plante à partir de laquelle il est extrait, et parfois sur le sol où la plante pousse, ou même sur le moment de la récolte(Vigan, 2010).

Pour la plupart, les composants d'huiles essentielles peuvent être affectés en tant que terpénoïdes lipophiles, les phénylpropanoïdes, ou des dérivés d'hydrocarbures aliphatiques(Turek et Stintzing, 2013).

Les résultats des analyses chromatographiques ont permis d'identifier environ 32 composés dans l'huile essentielle de *M.suaveolens* (Tableau n°02). La pulegone est le constituant majoritaire d'huiles essentielles de *M.suaveolens* avec un taux d'environ 85,5%. Le reste (14,5%) est constitué de monoterpènes et de sesquiterpènes. Ainsi que la présence d'acétate de menthyle, menthone ,menthol limonene, le camphre l'isopulegol et d'autres constituants avec un taux légèrement inférieur ou faibles(El Arch et al., 2003).

Synthèse bibliographique

Tableau n°02 : Composition chimique et pourcentage de l'huile essentielle de MS (IK : indice de Kovats) (El Arch et al., 2003).

N°	IK	Composants	Pourcentage	N°	IK	Composants	Pourcentage
1	939	a-pinène	0.22	17	1204	verbénone	0.11
2	981	trans-m-mentha-2,8-diène	0.16	18	1213	trans-pulégol	0.21
3	985	cis-m-mentha-2,8-diène	0.34	19	1237	pulegone	85.47
4	991	Myrcène	0.28	20	1252	piperitone	0.20
5	1001	δ-2 carène	0.13	21	1273	acétate d'isopulegol	0.28
6	1031	Limonène	0.62	22	1275	acétate de menthyl	1.96
7	1040	Z-β-ocimène	0.33	23	1324	aldéhyde de limonene	0.85
8	1050	E-β-ocimène	0.22	24	1363	oxide piperitone	0.14
9	1072	p-mentha-3.8 diène	0.20	25	1376	α-copaène	0.14
10	1098	Linalol	0.10	26	1381	propanoate d'isobomyl	0.10
11	I 102	cis-thujone	0.12	27	1391	β-elemène	0.21
12	1118	Myrcenol	0.39	28	1404	Z-caryophyllène	0.39
13	1143	Camphre	0.64	29	1485	β-selinène	0.24
14	1154	Menthone	1.03	30	1512	β-curcumène	0.20
15	1164	isomenthone	0.66	31	1535	Z-nerolidol	0.14
16	1173	Menthol	1.77	32	1538	α-cadinène	0.42

6. Rôle des HE dans les plantes

Les huiles essentielles jouent un rôle important dans les plantes: ils sont sécrétés en réaction à l'environnement, en tant que moyen de protection (inhibition de la germination en hiver par exemple, le déclenchement de la floraison ou la protection contre les parasites, les insectes ou herbivore) ou pour aider en attirant pollinisation certains insectes Interviennent également sur les conditions de pluviosité pour lutter contre la sécheresse(Vigan, 2010; Soualeh et Soulimani, 2016).

7. L'activité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés désinfectantes et antimicrobiennes. Nombre d'entre eux possèdent des propriétés antitoxiques, antivirales, anti-oxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, on sait qu'ils ont des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

L'activité explique par quelques molécules, souvent présentes dans les huiles essentielles. Certains composés simples présents dans les huiles essentielles peuvent également fonctionner de manière synergique avec d'autres composés actifs(Boucher, 2015).

7.1. Les propriétés antimicrobiennes important

Actuellement, les gens utilisent des plantes médicinales comme une alternative naturelle aux drogues synthétiques. Il est bien connu pour sa capacité à produire une variété de composés, telle que les huiles essentielles en particulier, et peut donc agir en tant qu'agent antimicrobien(Fertout-Mouri et al., 2017).

L'utilisation d'huiles essentielles en tant qu'agents antimicrobiens présente deux avantages principaux:

Le premier est leur origine naturelle, ce qui signifie plus de sécurité pour la population et l'environnement, et le second est considéré comme un risque faible pour l'évolution de la résistance par les microorganismes pathogènes(Kpatinvoh et al., 2017).

7.1.1. Pouvoir antiseptique

Les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, Telles que les bactéries endocanaliennes ou les bactéries microbiennes vaginales, et d'origine fongique comme les dermatophytes, les moisissures allergiques ou les champignons opportunistes.

Ils ont également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent des antiseptiques et des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à spectre large(De Billerbeck, 2007).

7.1.2. Mode d'action contre les bactéries

De nombreuses études ont montré que les huiles essentielles pouvaient agir comme agents antibactériens contre un large spectre de souches bactériennes pathogènes (Kempf et al., 2011). Les huiles essentielles, leurs composants et leur nature, ont permis aux couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, de perturber les structures et de les rendre plus perméables(Goetz et Ghedira, 2012).

Cependant, les bactéries à Gram positif peuvent être résistantes à certaines huiles essentielles et cet effet dépend des souches bactériennes. Et pour les bactéries à Gram négatif peuvent être sensibles à l'action de certaines huiles essentielles, de plus la sensibilité de ces bactéries aux HE peut être augmentée par l'ajout des substances qui affectent l'intégrité de la membrane externe(Gabriel et al., 2013).

8. Procédé d'extraction

Les huiles essentielles sont généralement plus complexes comprenant les substances volatiles trouvées dans les plantes et plus ou moins modifiées au cours du processus de préparation (Lahlou, 2004), et sont obtenues par différents procédés, qui fournissent les extraits naturels les mieux adaptés à la consommation (Angone et al., 2015).

8.1. Extraction par hydrodistillation à l'eau

L'hydrodistillation implique l'immersion de la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition, elle est généralement conduite à la pression atmosphérique. La distillation peut être réalisée avec ou sans la consistance de l'eau aromatique obtenue lors de la décantation (Lagunez, 2006).

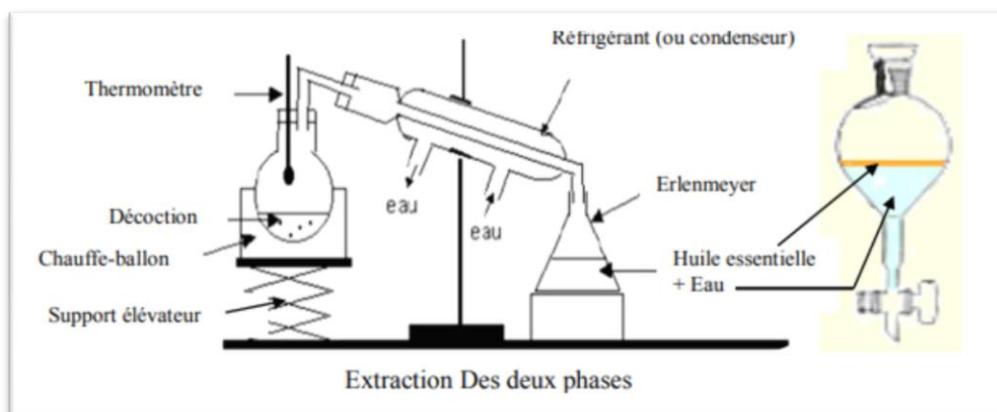


Figure n°09: schéma des étapes de l'hydrodistillation (Lagunez, 2006).

8.2. Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau :

Ce processus est fait en distillation. Le matériel végétal est soutenu par une grille ou une plaque perforée placée à une distance appropriée du fond de la dormance remplie d'eau. Sous l'influence de la chaleur, La vapeur revient à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation est divisé en deux phases distinctes: l'huile et l'eau condensée, et les parties insolubles de l'eau sont séparées par coulée pour donner les huiles essentielles (Benjlali, 2004 ; Garnero ,1991 ; Belaiche, 1979).

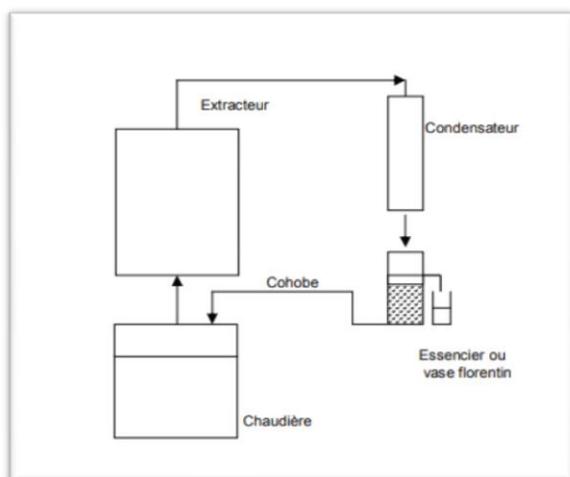


Figure n°10 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction Par entraînement à la vapeur de l'eau (Richard et Peyron, 1992).

8.3 Extraction par les solvants organiques

La technique d'extraction par solvant est utilisée pour les matières végétales fragiles telles que les fleurs, qui ne tolèrent pas la chaleur de distillation à la vapeur. Son principe est de mélanger le solvant avec le matériel végétal, puis de chauffer le mélange, ensuite de concentrer le filtre en évaporant le solvant.

Synthèse bibliographique

Ce concrète peut ensuite être mélangé avec de l'alcool absolu pour extraire l'huile, et distillée à basse température. L'huile est récupérée après évaporation de l'alcool (Ottai *et al.*, 2012).

8.4. Expression à froid

Il s'agit d'une simple technique "physique" d'extraction des huiles essentielles pour les fruits à l'aide de bobines ou d'éponges. La source de chaleur n'est pas utilisée. Le principe de cette méthode consiste à exploser avec différentes méthodes mécaniques (compression, perforation), puis l'huile est collectée et libérée par un cours d'eau (Marrouf et Tremblin, 2009 ; Bruneton, 1999).

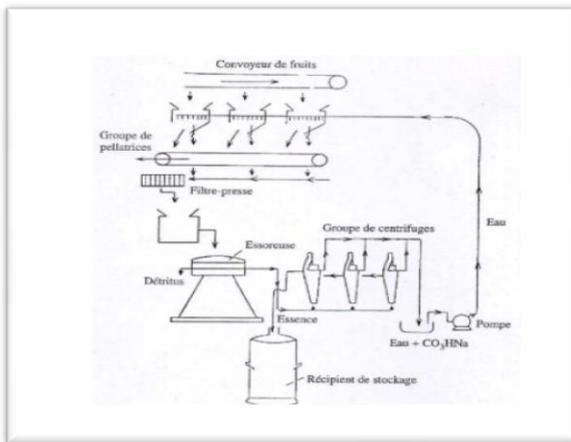


Figure n°11 : Schéma du « procédé de récupération de l'huile essentielle des fruits » (Martini et Seiller, 1999).

8.5. L'extraction au CO₂ supercritique

Lorsque le CO₂ se situe entre l'état liquide et l'état gazeux, il est capable de dissoudre les huiles essentielles. Le matériel végétal est chargé dans l'extrait où le CO₂ est inséré sous pression critique et refroidi. Le mélange est ensuite recueilli dans le vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et il ne reste que l'huile essentielle, proche de la normale et sans traces de solvants (Keville et Green, 1995 ; Baysal et Starmans, 1999).

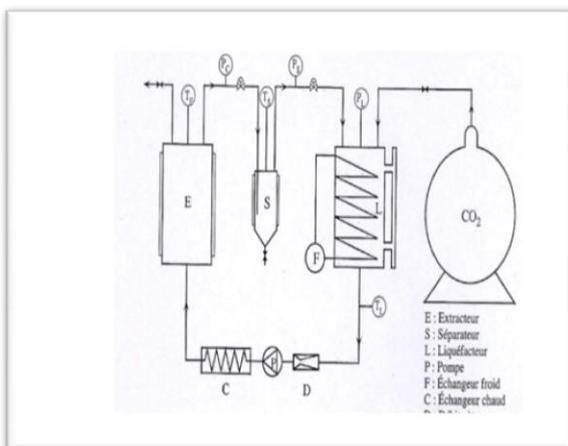


Figure n°12 : Schéma du système d'extraction CO₂ des solides (Lagunez Rivera ; 2006).

Matériels et Méthodes



Matériels et méthodes

Notre travail a été fractionné en deux parties d'études : la première partie est l'étude phytochimique de la plante à partir des extrait et la deuxième partie est l'activité antimicrobiennes d'huile essentielle extrait des graines de la plante, ont été effectuées au laboratoire de biochimie du Département de Science de la Nature et de la Vie - Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb - Ain Témouchent.

Objectifs d'étude

L'intérêt de ce travail est la valorisation d'une plante médicinale très connue par la population Algérienne qui est *M. suaveolens* poussant à l'état spontané dans la région d'Ain Témouchent.

Cette valorisation vient dans le but de mettre en évidence son activité antimicrobienne des huiles essentielles comme étude originale sur cette plante ainsi que la composition chimique de la plante.

Matériels et produits de laboratoire

Verrerie : béchers, tubes à essais, pipette pasteur, fioles, erlenmeyers, flacons, entonnoir, verre de montres.....

Autres matériel : papier filtre stérile, écouvillons, anse à platine, disques en papier stériles, bec benzène, boîte de pétri, les microplaques, micropipette, balance, moulin à café électrique.....

Milieux de culture utilisés : gélose Müller Hinton, bouillon nutritif, bouillon Müller Hinton, milieux PDA, bouillon PDA.

Appareil utilisés : balance, rotavapeur, autoclave, étuve, plaque chauffante, bain marie, la haute.

Micro-organisme : les bactéries utilisées sont les suivantes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candidat albicans*.

Solvant utilisés : Eau distillée, Eau physiologique, Méthanol, éther diétyl.

1. Collecte du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'extraction des HE est composé de la partie aérienne (graines) du *M. suaveolens* (figure n°13,14)



Figure n°13 : la plante mentha suaveolens.



Figure n°14 : les graines de la plante mentha suaveolens

L'espèce *M.suaveolens* a été récoltée dans leurs habitats naturels à Sidi Safi entre le mois de janvier et mois d'avril 2019.

Sidi Safi est situé dans la Wilaya de Ain Témouchent à l'ouest algérien, à une Latitude : 35° 16' 50" Nord, Longitude : 1° 18' 48" Ouest et une altitude par rapport au niveau de la mer égale à 239 m. Cette région a un climat méditerranéen, caractérisé par un été chaud et un hiver tempéré.

Matériels et méthodes



Figure n°15 : zone de récolte de *M. suaveolens*.

Le matériel végétal récolté trié et séché à l'ombre et à la température ambiante pendant six jours, une fois la plante devenue sèche les graines sont soumises à l'extraction, les feuilles sont broyées à l'aide d'un moulin à café.

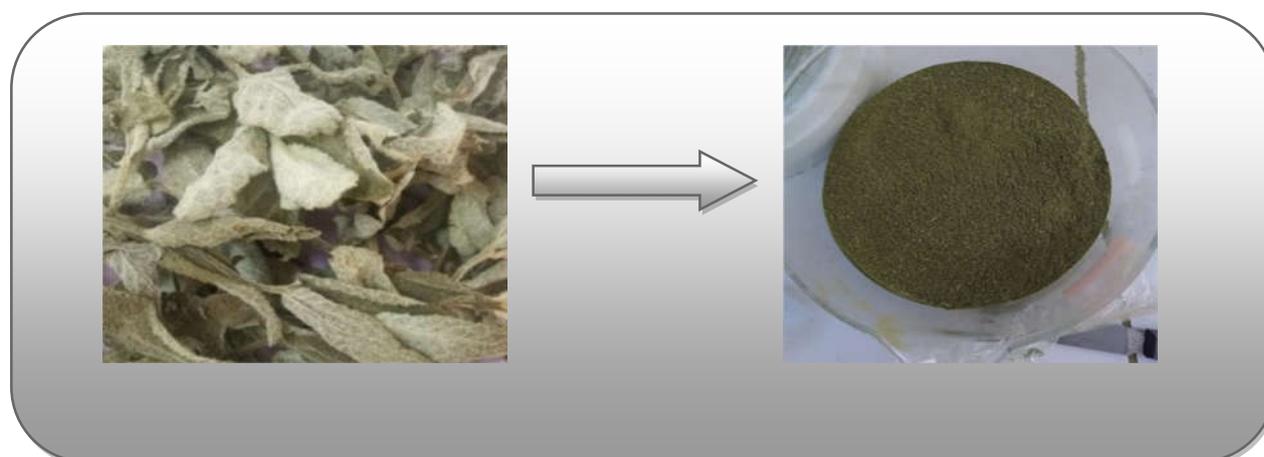


Figure n°16 : Broyage de la partie aérien de la plante
« *M. suaveolens* » sèche

Matériels et méthodes

2. Préparation des extraits végétaux

C'est une méthode simple qui consiste à prendre des feuilles séchées de la plante, on procède ensuite au broyage, l'extraction a été effectuée par macération en utilisant successivement trois solvants : acétone, diéthyl-éther, l'eau aqueux. L'extraction dure 24 heures pour chaque solvant.

2.1. Préparation de l'extrait aqueux

Tout d'abord on fait un broyage pour les feuilles de *M.suaveolens* déjà séchées à l'aide d'un moulin à café électrique jusqu'à leur réduction en poudre, puis on va peser 50g de poudre à l'aide d'une balance, après mis à macérer dans 500 ml d'eau distillée à température ambiante pendant 24h sous agitation, puis ce extrait a été filtré, et conservés à 4°C.

2.1. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

Une prise d'essai de 40g de poudre de matériel végétal a été mise à macérer dans 200 ml de solvant (acétone, diéthyl-éther), sous agitation magnétique durant 24h à une température ambiante. Les macérats ont ensuite été filtrés, puis conservés à 4 °C.

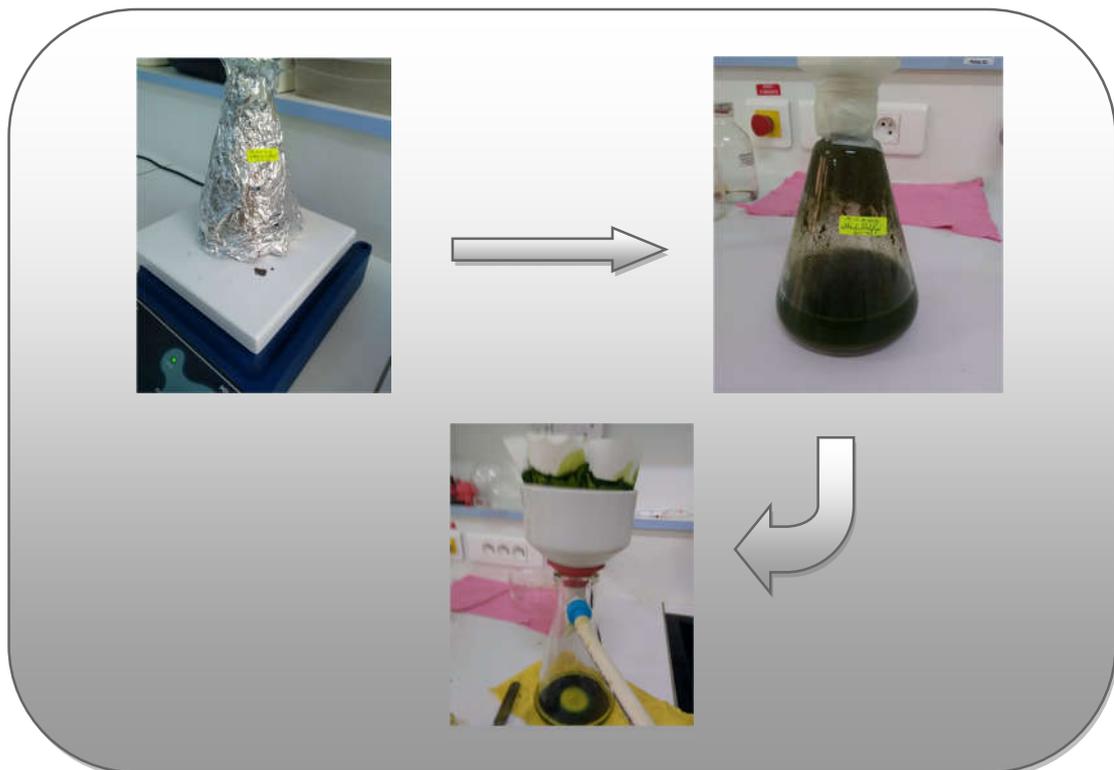


Figure n°17: les étapes de la préparation des extraits.

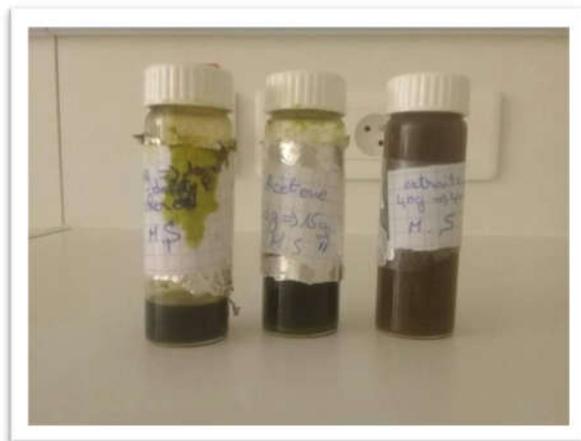


Figure n°18: Les extraits de *M. suaveolens*.

3. Tests phytochimiques

L'examen phytochimique est utilisé essentiellement afin de détecter les différentes classes de composés chimiques existantes dans la plante. Ceci constitue la première étape dans la recherche des molécules à activités thérapeutiques.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

3.1. Etudes qualitatifs

3.1.1. Tanins

A 2ml de la solution à tester, on ajoute 2 à 3 gouttes de solution FeCl₃ à 2%, un résultat positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu noir et un précipité obtenu quelques minutes après (**Dohou et al., 2003**).

3.1.2. Saponosides

Test1 :

5 ml de trois extraits aqueux, acétone, étherique bien mélangés avec 10ml d'eau distillée (**Karumi et al., 2004**).

La présence des saponosides est confirmée par la formation d'une mousse persistance 15minutes après(**Daira et al., 2016**).

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

Test2 :

5ml de chaque extrait sont mélangés avec 3ml d'acide sulfurique concentrés et 2ml de chloroforme qui donne lieu à la présence de triterpènes hétérosidique confirmée par une couleur rouge marron de couche d'interface (**Edeoga et al., 2005**).

3.1.3. Flavonoïdes

5ml de chaque extrait sont traités avec quelques gouttes de HCL concentrée aux quels on ajoute une quantité de tournure de magnésium qu'on laisse agir. L'apparition d'une couleur rouge confirme la présence de Flavone aglycone (**Karumi et al., 2004**).

3.1.4. Glucosides cardiotoniques

5ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl₃ et 5ml d'acide sulfurique contenant les traces de FeCl₃ pour 1ml de chaque extrait. La réaction de Killer-Kilani est basée sur ce test.

La formation de deux phase, une colorée en brun rouge (acide acétique) et l'autre en bleu – vert (acide sulfurique) confirme la présence de glucosides cardiotoniques.

3.1.5. Coumarine

Mettre 1g d'extrait de la plante dans un tube à essai recouvert de papier imbibé de NaOH qu'on met dans un bain marie pendant quelques minutes à laquelle on ajoute 0.5ml de NH₄OH a 10%. Le test réalisé (**Bruneton, 1999**).

3.1.6. Alcaloïdes

Le réactif de Mayer et le réactif de Wagner sont utilisés et préparés comme suit :

Réactif de Mayer : 5g de KI et 1.358g de HgCl₂ solubilisés dans 100ml d'eau distillée.

Réactif de Wagner : 2g de KI et 1.27g d'I₂ solubilisé dans 100ml distillée.

Pour 2ml de chaque extrait, on ajoute 1ml de réactif de Wagner ou Mayer Cette expérience donne lieu à la présence de turbidité ou de précipitation confirme la présence des alcaloïdes (**Bruneton, 1999**).

3.1.7. Amidon

Réactif d'amidon : 1.2g d'I₂ et 2.05g de KI solubilisés dans 500ml d'eau distillée.

On traite l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon, la présence d'amidon est confirmée par l'apparition d'une coloration bleu violacée (**Benmehdi, 2000**).

3.1.8. Mucilage

Un test positif est révélé par un précipité floconneux à la suite d'un mélange de 1ml d'extrait aqueux et 5ml d'alcool absolu.

3.1.9. Emodols

Faire évaporer 3ml de l'extrait éthérique auquel on ajoute 1 ml de NH_4OH ce test fait apparaître une teinte vive variant de l'orangé rouge au violet pourpre qui indique la présence des emodols.

3.1.10. Quinone libre

A un volume de 1 ml de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire aux jaune, rouge ou violet indique la présence des quinines libres (**Oloyede, 2005**).

3.1.11. Stérol (réaction de Libermann-Burchard)

On traite 1 ml d'extrait avec 2,5 ml d'analyse acétique et 10 gouttes d' H_2SO_4 concentrée.

Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

3.2. Etude quantitative

3.2.1. Composés phénolique (méthode de bleu au prusse) :

Principe :

Dans une première étape, l'échantillon est distillé. Dans la seconde étape, l'échantillon est mélangé avec un tampon alcalin (pH à proximité de 10.3), du ferricyanure de potassium et avec une solution d'amino-4-antipyrine pour former un complexe coloré. L'absorbance à 505 nm est mesurée et comparée à une courbe d'étalonnage obtenue avec le phénol (C₆H₅OH)

Mode opératoire :

On introduire 1 ml d'extrait végétal et 3ml de la solution de FeCl₃ (0.1M) dans HCl (0.1N) dans des tubes à essai stériles aux quel on ajoute 3ml de K₃Fe(CN)₆ à 0.008N.

Les mesures d'absorbance DO sont effectuées à 720 nm pendant 1 min à T°C ambiante.

La DO obtenue est corrigée en éliminant l'absorbance de l'extrait.

Remarque : le calibrage du spectrophotomètre se fait avec blanc contenant 1ml d'eau distillée, 3ml de FeCl₃ et 3ml de K₃Fe(CN)₆.

Extraction :

Le mode d'extraction consiste à peser 50mg de matériel végétal sec à mettre dans 50ml d'eau distillée et laisser agir pendant 24 heures à T°C ambiante pour être filtrer à son tour .

Expression des résultats :

Une courbe d'étalonnage a été tracée par différentes concentrations d'acide tannique.

A partir de cette courbe on détermine la concentration de notre échantillon en composés phénoliques par rapport à la matière sèche.

3.2.2. Sucre totaux

Principe

La méthode de Dubios et al (1956) permet de doser les oses en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré, en présence de ses deux réactifs, les oses donnent une couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée entre 450 à 550nm.

Dosage

Prendre 5 ml du filtrat, les faire diluer dans 50ml de l'eau distillée, et à partir de cette solution prendre 1ml et faire introduire dans un tube à essai, ajouter 1ml de solution de phénol à 5%, agiter énergiquement puis verser 5ml de l'acide sulfurique concentrée, agiter, laisser refroidir à l'obscurité pendant 30 minutes, lire la densité optique à 490 nm.

Expression des résultats :

Une courbe d'étalonnage a été tracée par différentes concentrations d'acide sulfurique.

A partir de cette courbe on détermine la concentration de notre échantillon en sucre totaux par rapport à la matière sèche.

4. L'étude de l'activité antimicrobienne d'huiles essentielle

4.1. Extraction et conservation d'HE

Pour faire l'extraction des huiles essentielles, un hydrodistillateur de type Clevenger a été utilisé.

Une quantité de 40g de la matière végétale sèche (graines) a été introduite dans un ballon de 1 litre puis elle a été immergée de l'eau distillée. Le ballon a été ensuite déposé sur une chauffe ballon. Par la suite, l'huile essentielle a été séparée de l'eau par décantation (différence de densités). Enfin, elle a été conditionnée dans des tubes en verre, opaque pour la préserver de la lumière et de l'oxygène et fermés hermétiquement pour éviter tout risque d'altération (Figure n°19). Les tubes ont été conservés à une température de 4°C jusqu'à utilisation dans l'activité antimicrobienne.

Le plastique est à proscrire car il existe des incompatibilités avec certaines huiles essentielles.

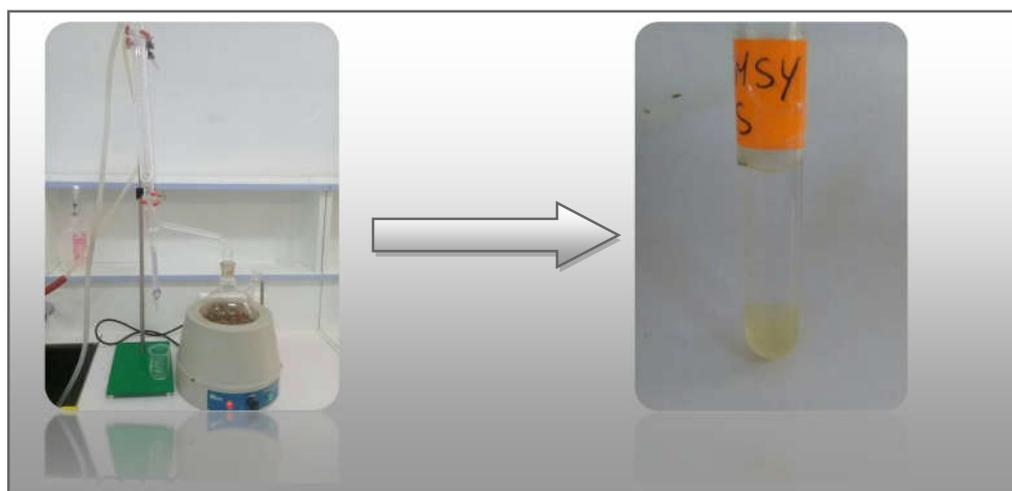


Figure n°19 : Montage de l'extraction d'huiles essentielles de M.S.

4.1.1. Détermination de rendement

Le rendement des huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre le volume d'essence obtenue et la masse de la matière végétale utilisée. Les quantités obtenues permettent le calcul des rendements à chaque intervalle de temps par la formule suivante (Imène, 2012).

$$\text{RHE (\%)} = M'/M \times 100$$

RHE : rendement en huile essentielle (%).

M' : masse d'huile essentielle en gramme.

M : masse de la matière végétale sèche.

4.1.2. Détermination de l'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Twidwell et al., 2002).

Dans un papier aluminium, introduire 100g de l'échantillon à analyser. Porter l'échantillon emballé dans le papier d'aluminium dans l'étuve à 105°C . Refroidir au dessiccateur, peser jusqu'à un poids constant.

Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{H (\%)} = (M1 - M2) / M1 \times 100$$

H % = taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M1 = Poids de l'échantillon en gramme après la récolte (plante fraîche).

M2 = poids de l'échantillon en gramme après le séchage (plante sèche).

Matériels et méthodes

4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne in vitro de l'HE du M.S, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques (aromatogramme) pour tester la sensibilité des souches et ensuite par la méthode de microdilution pour déterminer les valeurs de CMI.

Les microorganismes

Les souches utilisées sont quatre souches bactériennes et une levure (*Candida albicans*10231). Ont été choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité(Boukhatem et al., 2014).

Tableau n°03: Les souches bactériennes

Etat frais	Souches	Gram
Bacille	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	

Mise en culture des souches :

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4 °C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37 °C pour les bactéries et 30°C pour les levures pendant 24 h à 48 h, puis ensemencées sur boîtes contenant des milieux sélectifs pour vérifier leur pureté.

Après L'incubation, les souches sont ensemencées sur bouillon nutritif puis incubées à 37 °C pour les bactéries et 30 °C pour les levures pendant 18h. De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les met dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension microbienne est bien homogénéisée. La turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0,5 avec un spectrophotomètre, ce qui correspond à $1-2 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (DO = 0,08 à 0,1 / $\lambda = 625$ nm), et $1-5 \times 10^6$ UFC/ml pour les levures (DO = 0,12 à 0,15 / $\lambda = 530$ nm).

Préparation des dilutions d'huile essentielle :

L'HE est solubilisé dans des volumes variables de DMSO en vue d'obtenir un mélange homogène à différentes concentrations 25mg/ml, 50mg/ml, 100mg/ml, 150mg/ml (Figure n°20) et un témoin contenant de DMSO.



Figure n°20: Les différentes dilutions d'HE

4.2.1. Méthode en milieu solide

Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme

Il s'agit d'une méthode qualitative permettant de tester la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux HE par contact direct.

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien et antifongique des huiles essentielles. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les HE (Kaloustian *et al.*, 2008).

Principe

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien de l'HE et en déduire ainsi la résistance ou la sensibilité de ces micro-organismes vis-à-vis de cette huile essentielle. Elle consiste à déposer un disque stérile de papier filtre imbibé d'HE au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche bactérienne ou une souche fongique. Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37 °C pendant 24 pour les bactéries et 30°C pendant 72h à 5jours pour les levures). A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se

Matériels et méthodes

traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition est mesuré et exprimé en millimètres (**Boukhatem et al., 2014**).

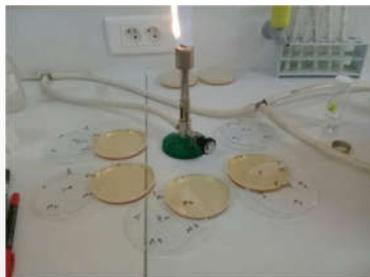
Préparation des disques

On a coupé le papier Wattman N°3 en disque de 6mm (0.28cm² de surface) par l'emporte-pièce, ces disques doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement. Les disques sont ensuite stérilisés dans un autoclave pendant 15 à 20min à 120°C, et stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

Ensemencement et dépôt des disques

Le milieu de culture utilisé est Muller-Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens et PDA pour *C.albicans*. Le milieu de culture gélosé en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri.

Après solidification du milieu tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne (évitée la contamination du manipulateur et de la paillasse), puis l'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum, ensuite frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées, et répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, puis on va finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie. Cinq disques pour aromatoigrammes sont déposés au centre de la boîte à l'aide d'une pince bactériologique. Quatre disques est ensuite imprégné (20 µl) de l'huile essentielle de chaque concentration, et pour le cinquième disque est imprégné de 20µl de DMSO sont utilisés comme (témoins) afin de vérifier la croissance des différentes souches. La boîte est ensuite fermée et laissée à la température ambiante pendant 20 min afin que les germes puissent bien adhérer à la surface de la gélose et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour *C.albicans*.



1-Coulé le milieu de culture dans des boites



2-L'ensemencement des boites



3-Déposer les disques



4-Imprégner les disques par HE ou DMSO



5-Laisser a la température ambiante pendant 20 min

Figure n°21 : Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

La lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres d'inhibition qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon les niveaux d'activité.

Matériels et méthodes

4.2.2. Méthode en milieu liquide

Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de microdilution en milieu liquide. L'étude est réalisée en microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) en bouillon.

100 μ l de bouillon Mueller-Hinton sont déposés dans chaque puits. Puis 100 μ l de la solution mère (100 mg/ml) d'huiles essentielles sont ajoutés dans le premier puits de chaque ligne à partir duquel on réalise une série de dilutions « la première concentration étant 50 mg/ml puis des dilutions en cascade jusqu'à la concentration 0,098 mg/ml ». Chaque puits est ensuiteensemencé par 20 μ l de la suspension bactérienne.

100 μ l de bouillon PDA sont déposés dans chaque puits. Puis 100 μ l de la solution mère (100 mg/ml) d'huiles essentielles sont ajoutés dans le premier puits de chaque ligne à partir duquel on réalise une série de dilutions « la première concentration étant 50 mg/ml puis des dilutions en cascade jusqu'à la concentration 0,098 mg/ml ». Chaque puits est ensuiteensemencé par 20 μ l de la suspension de la levure.

Les puits 11et12 sont des témoins « témoins négatifs contenant le milieu de culture seulement et témoins positives contenant le milieu de culture et les souches testées », mais sans addition d'HE de plante (annexe II).

Les microplaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et 30°C pendant 72°C pour la levure.

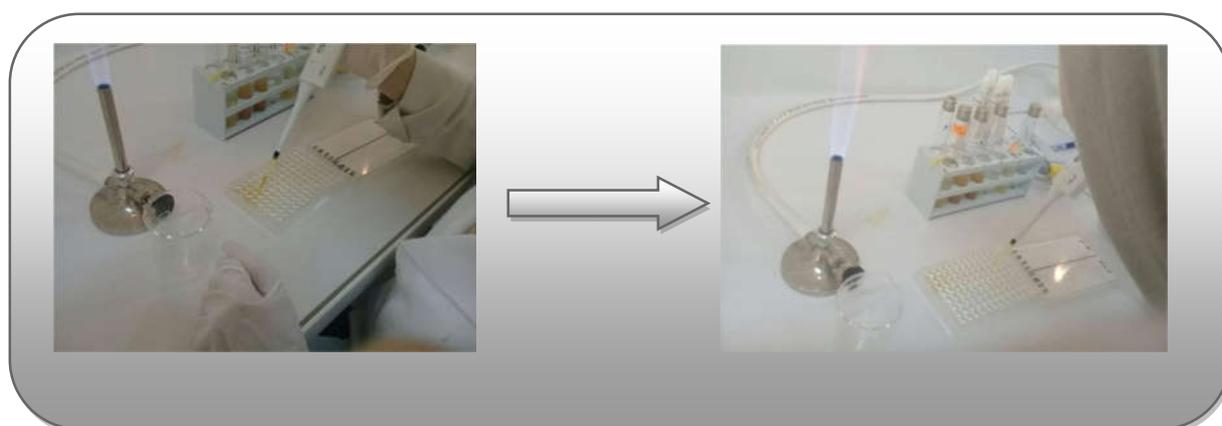


Figure n°22: Méthode des micro-dilutions

La CMI est la concentration minimale d'HE qui inhibe la croissance de 90 % de la population bactérienne et ne présentant aucune culture visible à l'œil nu après d'incubation (**Chebaibi, et al., 2011, Aouni et al., 2013**). La suspension de la cupule correspondant est inoculé sur gélose pour déterminé l'activité exercée par l'huile essentielle sur les souches testées, où leurs croissance correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation

4.2.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est la concentration minimale d'HE du MS qui produit une réduction de 99,9 % Des souches, il reste donc 0,1 % de germes survivants, après 24 heures d'incubation à 37 °C pour les bactéries et 30°C pour la levure(**Chebaibi et al., 2011**).

Les contenus des puits ne présentant aucune croissance sont repiqués sur de la gélose coulée dans des boîtes de Pétri. La lecture est faite après une incubation. La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01% des souches survivantes après un temps d'exposition à l'antibiotique de 12 à 18 heures correspond à la CMB.

4.2.4. Antibiogramme « méthode des disques »

Un antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action de molécules antibiotiques sur une souche bactérienne ou fongique.

Il donnera donc des indications sur l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques.

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme des germes utilisés et le comparer avec l'effet des huiles essentielles.

Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne estensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée, la gélose de Mueller-Hinton, éventuellement additionnée de sang. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

Matériels et méthodes

Le test de sensibilité ou de résistance du germe à étudier aux antibiotiques est réalisé selon les étapes suivantes :

- On a collé 12 boîtes pétries par le milieu gélose (Muller-Hinton) pour les souches bactériennes, et 3 boîtes par le milieu (PDA) pour la levure. Puis on vaensemencer ces boîtes à partir des suspensions microbiennes (chaque souche 3 boîtes).
- A l'aide d'une pince, déposer un disque d'antibiotique sur le milieu de chaque boîte (Erythromycine, Gentamicine, vancomycin).
- Les boîtes sont laissées diffuser à 4°C pendant 5 min puis incubées à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes et pour le *candidats albicans* incubées à 30°C pendant 72 h.

Lecture de résultat

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle graduée en millimètre de l'extérieur de la boîte fermée. Les résultats obtenus ont été interprétés en fonction des diamètres critiques recommandés pour chaque antibiotique pour distinguer ; sensible, intermédiaire ou résistante(Khribch et al., 2018).

4.2.5. L'interaction synergique de l'huile avec quelque antibiotique

L'association des huiles essentielles aux antibiotiques peut être employée pour augmenter le spectre antimicrobien, empêcher l'apparition des mutants résistants, réduire au minimum la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique. La méthode utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'association HE/Ab est celle de diffusion sur milieu solide préconisée.

- Tout d'abord On a collé 12 boîtes pétries par la gélose MH pour les souches bactériennes et 3 boîtes par la gélose PDA pour la souche fongique. Après on vaensemencée ces boîtes par les souches microbiennes à l'aide d'un écouvillon stérile (pour chaque souche on a trois boîtes).
- pour la souche E. coli, dans chaque boîte deux disques d'antibiotique de 6 mm de diamètre (gentamyoucine, vancomycin, anthyomycine) sont déposées au centre de la boîte, puis à l'aide d'une micropipette 20 µl d'HE sont déposées sur l'un de ces disques, mais l'autre disque reste comme témoin, et la même chose pour les autres souches.
- Les boîtes sont laissées diffuser à 4°C pendant 5 min puis incubées à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes et pour le *candidats albicans* incubées à 30°C pendant 72 h.

Matériels et méthodes

- Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm. Le résultat est plus important que celle de l'HE toute seule.

Résultats et Discussion



Résultats et discussion

1. Les tests phytochimiques

Dans le but de mettre en évidence la composition chimique existante dans les feuilles et les tiges de l'espèce *M.souaveolens* par une étude qualitative qui est basée sur des phénomènes de coloration ou de précipitation par des réactifs typique à chaque famille de composé.

Ces tests phytochimiques ont été effectués sur les trois extraits à polarité croissante : l'extrait éther-diéthylique EDE, acétonique EAc et l'extrait aqueux EA(Kahlouche, 2014).

Le tableau n° 04 regroupe l'ensemble de ces résultats.

Tableau n°04: Composition phytochimique des extraits de la partie aérienne de la plante *M.suaveolens*.

Famille Chimique	Extrait aqueux	Extrait acétone	Extrait éther-diéthyl
<i>Les tanins</i>	+	-	-
<i>Saponoside 1</i>	+	-	-
Saponoside 2	+	-	-
Flavonoïde	+	-	-
Glucosides Cardiotonique	-	+	-
Alcaloïde	+	-	-
Mucilage	+	/	/
Amidon	-	/	/
Emodols	-	/	/
les terpénoïdes	+	-	-
les stérols	-	-	-

Résultats et discussion

les coumarines	-	+	+
les quinones libres	+	-	-

+ : présence

- : absence

/ : non effectuer

D'après les résultats obtenus, dans l'extrait aqueux, la recherche des tanins, saponoside, des flavonoïdes, des alcaloïdes, mucilage, des terpénoïdes et des quinones libres, ont été positifs, par contre celle de glucoside cardiotonique, l'amidon, emodols, des stérols et des coumarines, ont été négatifs.

Dans l'extrait acétone nous notons la présence de glucoside cardiotonique et coumarine ainsi que l'absence des tanins, saponoside, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes les quinones libres et les stérols. Et pour l'extrait éther-diéthylique nous remarquons la présence coumarine et l'absence des tanins, saponoside (test 1et test 2), les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les quinones libres, les stérols et glucoside cardiotonique.

Ce screening nous a permis d'avoir une idée claire sur les différentes familles des composés existants dans les trois extraits de la plante *Mentha suaveolens*. Les résultats obtenus montrent la présence des tanins, saponoside, flavonoïde, glucosides cardiotonique, alcaloïde, mucilage, les terpénoïdes, les coumarines et les quinones libres.

La totalité des groupes chimiques de la plante a été caractérisée dans l'EA.

L'usage des solvants à polarité différente peut influencer sur la composition des extraits selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Ainsi, l'eau, le solvant le plus polaire, permet l'extraction de la plupart des métabolites secondaire présents dans la partie aérienne de la plante MS à l'exception de coumarines(Azzi, 2013).

Nos résultats de l'analyse phytochimique de MS sur la présence Des tanins, les saponosides, et les flavonoïdes concordent avec ceux de **Zekri 2017, Seladji 2015 et Lahbab 2013**. Et l'absence d'amidon concorde avec ceux de **Seladji 2015 et Lahbab 2013**. La présence de mucilage concorde à l'étude de **Zekri 2017**.

Par contre nos résultats sont déférents à ceux indiqués par **Seladji 2015 et Lahbab 2013**, qui ont montrée l'absence des alcaloïdes et les coumarines, et aussi déférents à ceux indiqués par **Zekri 2017**, qui à montré l'absence des quinones libres.

Résultats et discussion

La valeur médicinale des plantes est liée à leurs constituants phytochimiques bioactifs qui produisent des actions physiologiques précises sur le corps humain. Certains des plus importants de ces composants bioactifs sont les tannins, les alcaloïdes, les saponines, les flavonoïdes, les stéroïdes, les anthraquinones, les coumarines, les stérols et les terpènes (**Ulah et al., 2011**).

2. Teneurs en composés phénoliques

L'extrait préparé a été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible, pour leur contenu en polyphénols. La concentration totale est estimée à partir de courbes d'étalonnage établies avec l'acide gallique qui est le standard le plus souvent employé dans la méthode de bleu au prusse (annexe IV).

La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé.

D'après la courbe d'étalonnage la teneur en composé phénolique dans l'extrait aqueux est 1,8 g/l.

Nos résultat est inférieure à celui obtenue par **Zekri (2017)** qui ont trouvé que la concentration des composés phénolique dans l'extrait aqueux de l'espèce *M.suaveolens* de la région Maroc (5,81g/l) ainsi que notre résultat est faiblement inférieure a celui obtenue par **Benchilla et Lounis (2018)** qui ont trouvé une concentration de 1.91 g/l dans l'extrait aqueux de l'espèce *Spergularia rubra L.*

La teneur en composé phénolique diffère selon la région de récolte et selon espèce étudié. Cette différence résulte vraisemblablement du fait que le dosage par le réactif Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés organiques non phénoliques peuvent réagir avec ce réactif comme dioxyde de soufre, acide ascorbique, les sucres, les amines aromatique, les acides organiques (**Medina-Remón et al., 2009**). De même; le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que les facteurs climatiques, la maturité, les pratiques culturales et les conditions de stockage après la récolte (**Bourgou et al., 2008**).

3. Teneurs en sucres totaux

La méthode du phénol sulfurique, permet de doser les sucres totaux en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré, puis les extraits préparés sont analysés aussi par spectrophotomètre UV-visible, des résultats des densités optiques sont rapportés sur un courbe étalon des sucres solubles préparés avec des concentrations croissantes de glucose.

D'après la courbe d'étalonnage des sucres solubles la concentration des sucres totaux de l'extrait aqueux de la plante *M.suaveolens* est 0.1676 g/l.

Cette concentration est inférieure a celui obtenue par **Adepo et al., (2010)** sur les deux espèces étudiées *Euphorbia hirta* et *Secamone afzelii* (3.9 g/l et 4.43g/l) respectivement.

La teneur en ST varie en fonction du climat, la saison et le stade de développement des plantes, à titre d'exemple, les températures élevées et les faibles précipitations tendent à augmenter la fraction pariétale et à diminuer le contenu soluble des végétaux (**Arhab, 2007**).

4. Analyses d'huile essentielle extraite

Rendement d'huile essentielle

L'huile essentielle de couleur jaune claire, liquide à forte odeur de menthe caractéristique issue des graines de mentha suaveolens a été obtenue par distillation à l'eau avec un rendement de 2,75%.

Ce rendement a été comparé à d'autres travaux sur la même espèce. Notre résultat est supérieur à celui obtenu par Brada en 2007 qui de l'ordre de 0,8% pour l'espèce de la même origine Algérie et ainsi supérieur que celui obtenu par Amzouar dans les régions de Maroc loukkos 1,6% et Moyen atlas 0,7%. Alors que notre résultat est relativement plus faible que celui obtenu dans la région d'Oulmès Maroc par benayad 4,33% (**Brada et al., 2007; Amzouar et al., 2016**).

Ces variations dans les rendements sont dues aux conditions environnementales, climatiques, géographique, et aussi à la période de la cueillette de la matière végétale et la période de récolte. Ainsi que d'autre facteur influence sur le taux de rendement la technique d'extraction et le cycle végétatif de la plante (**Fellah et al., 2006**).

Des études montrent que les meilleures rendement sont obtenus durant la période de floraison (juin-juillet)(**Brada et al., 2007**).

Taux d'humidité de la matière végétale

Le test d'humidité a été effectué dans le but d'estimer la teneur en eau de la partie aérienne de mentha suaveolens. Le test révéla un taux d'humidité important égale à **80,47%** représenté dans la figure.

Ce résultat indique que plus de trois-quarts du poids de la plante est constituée d'eau.

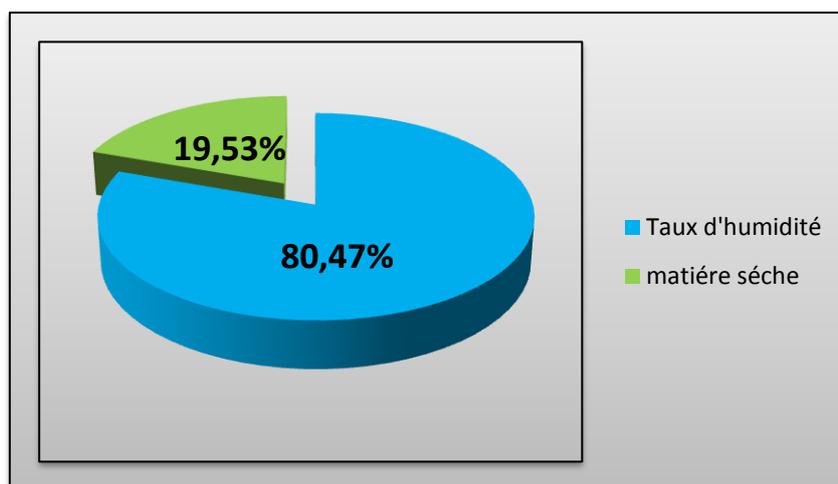


Figure n°23 : Représentation graphique de taux d'humidité de la plante *M.suaveolens*

Ce taux d'humidité a été comparé avec d'autres travaux sur la même espèce. Notre résultat est faiblement inférieure à celui obtenu par **Aichouni et Moderres** en 2018 qui sont à l'ordre de 88% pour l'espèce récolte de la région Mekhateria (le Nord) et 83% pour l'espèce récolte de la région de Bathia (le sud), Cette différence de valeur semblerait due à la région de récolte (**Aichouni et Moderres, 2018**).

Selon **Hamoudi, 2012**, les plantes cultivées dans les régions tempérées comme le sud algérien ont une teneur en eau plus faible par rapport aux plantes cultivées dans le nord.

Le contenu réel en eau dépend du tissu et du type cellulaire (**Hopkins, 2003**), dont chaque partie de la plante est caractérisée par une valeur du potentiel hydrique (**Lafon et al., 1996**). Elle est d'une certaine façon également dépendant des conditions physiologiques et environnementales (**Hopkins, 2003**).

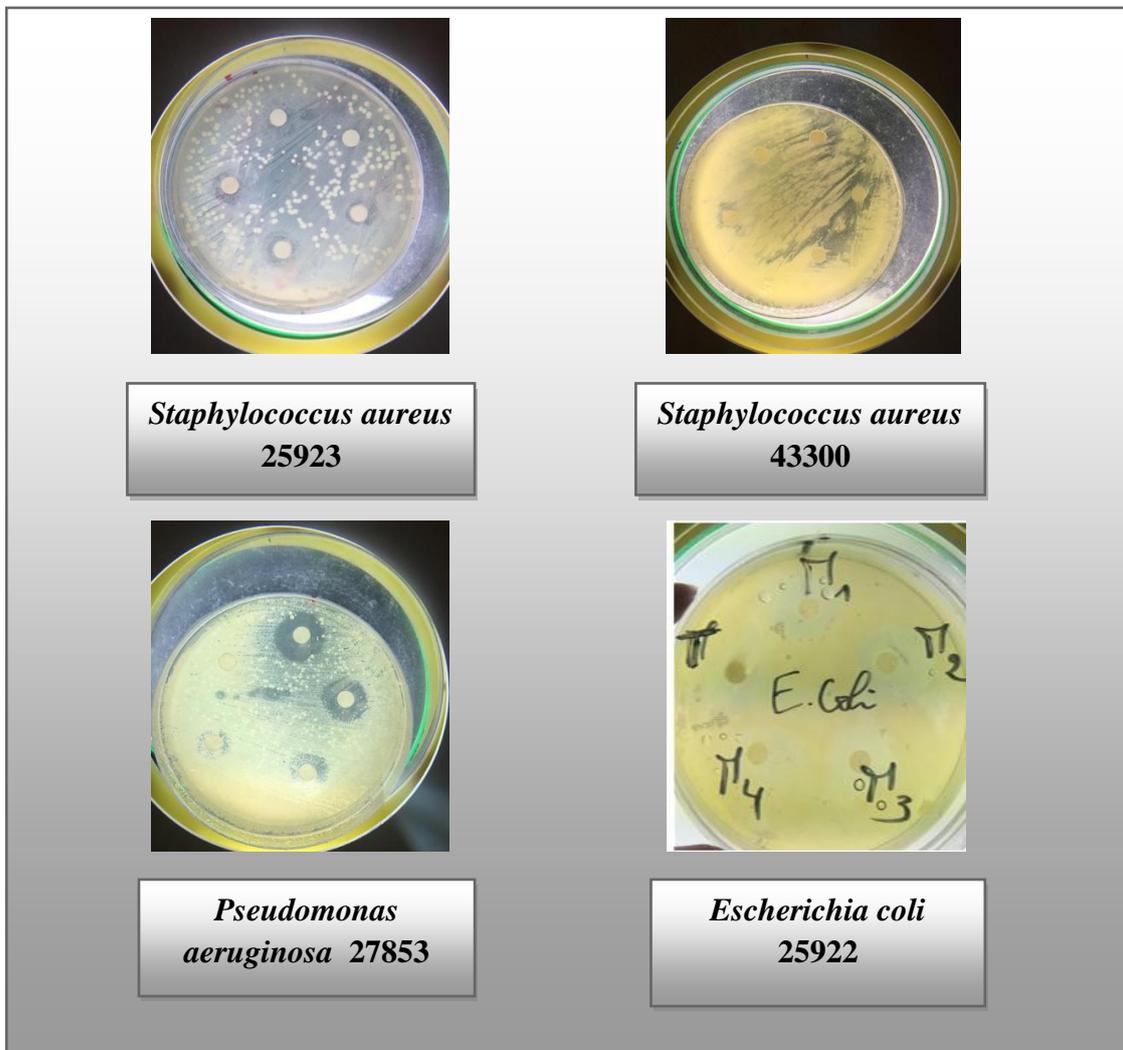
Résultats et discussion

5. Etude de l'activité anti microbienne

Depuis l'antiquité l'être humain s'est soigné avec des produits issus de la nature comme les plantes, aujourd'hui il est face aux problèmes de la résistance bactérienne et fongique aux antibiotiques synthétiques, dont l'efficacité semble décroître de jour en jour. L'homme essaie de trouver de nouvelles molécules naturelle et plus efficaces surtout à partir des plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action de différente concentration d'huile essentielle de l'espèce végétale mentha suaveolens vis-à-vis de quelque souches bactériennes et levure

Nous donnons ci-dessous quelques photos montrant les zones d'inhibition (figure n°24) :



Résultats et discussion



Figure n° 24 : Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne et mycélienne.

Les résultats des tests d'inhibition de l'activité microbienne sont illustrés dans le tableau n°05. Nous avons comparé l'effet microbien de différentes concentrations d'huile essentielle.

Tableau n°05 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) des différentes concentrations d'HE et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes et fongique.

Les souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)				
	M1 (150mg/ml)	M2 (100mg/ml)	M2 (50mg/ml)	M2 (25mg/ml)	DMSO
S. aureus 43300	20	21	17	15	0
S. aureus 25923	43	35	9	9	0
E. coli 25922	16	12	11	11	0
P. aeruginosa 27853	18	15	11	11	0
C. albicans 10231	27	20	0	0	0

Résultats et discussion

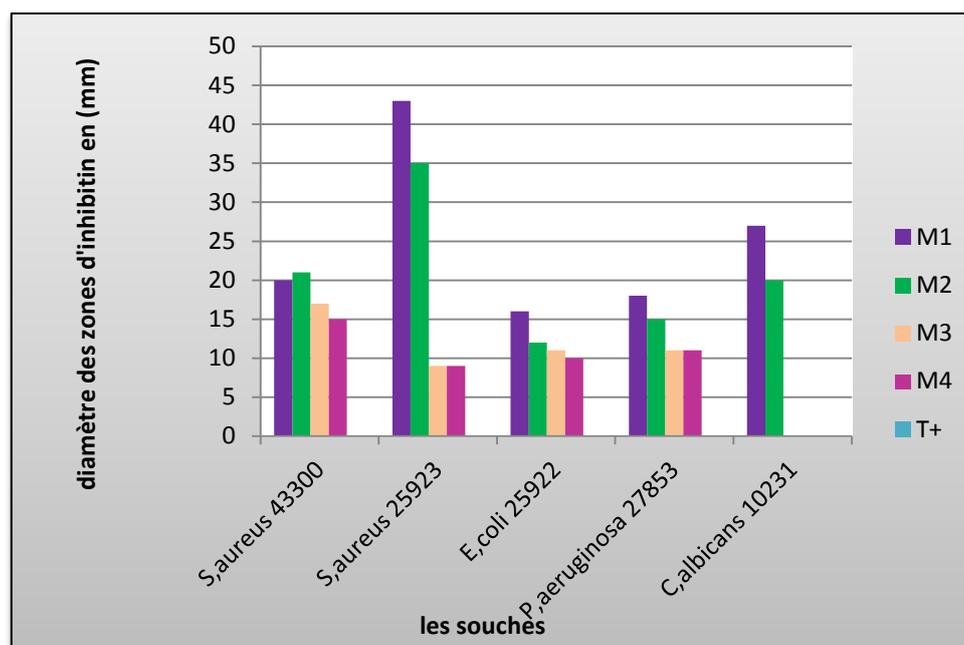


Figure n° 25: représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne.

5.1. L'activité antibactérienne

Le diamètre de la zone d'inhibition de l'huile essentielle de *M.suaveolens* variait de 9 à 43 mm, Les résultats obtenus indiquent que huiles essentielle de *M.souaveolens* possèdent un effet inhibiteur.

Le meilleur résultat obtenu est celui de l'huile essentielle avec une concentration de (M1)150mg/ml sur la souche bactérienne S.aureus 25923 avec un diamètre d'environ 43 mm.

Les différentes concentrations d'huiles essentielles ont montré de bonnes activités, inhibant la croissance des bactéries Gram négatif avec des DZI allant de 11 à 18 mm, mais avec plus d'activité contre les bactéries Gram positif avec des DZI allant de 9 à 43 mm. Les bactéries Gram positifs sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram négatifs. Les résultats présentés dans cette étude mettent en évidence le potentiel des huiles en tant que source de composés modifiants la résistance aux antibiotiques.

En outre, il a été observé que les bactéries (Gram négatif) étaient plus résistantes aux huiles essentielles testées que les bactéries (Gram positif). Cette résistance est étroitement liée à la composition de leur paroi cellulaire, car l'activité antibactérienne des huiles essentielles pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels de leurs composants avec la paroi des bactéries ; ce qui provoque de profondes lésions. Cependant, la résistance des Gram négatif est attribuée aux contraintes de diffusion à travers leur membrane externe causée par la présence d'une barrière hydrophile qui peut bloquer la pénétration de

Résultats et discussion

composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible(**Chraïbi et al., 2018; Bencheqroun et al., 2012**).

Des travaux antérieurs confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-. En fait, les Gram- possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne. Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace periplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace periplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques). La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe(**Boukhatem et al., 2014**).

Dans notre étude, l'activité inhibitrice de l'HE du *M.souaveolens* vis-à-vis des souches bactériennes peut être expliquée que par son profil chimique riche en pulegone (85%) Cependant on ne peut pas négliger l'existence des phénomènes de synergie entre composés majoritaires et minoritaires(**El Arch et al., 2003**).

Dorman et Deans, (2000) ont démontré que La plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés Inhibitrices les plus importantes, en particulier les phénols.

D'une manière générale, l'action des molécules terpéniques au niveau microbien se déroule en trois phases (**Burt, 2004**):

- Attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'ATP et la synthèse des composants de structure ;
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la cellule bactérienne.

On peut conclure donc que cette activité peut être le résultat d'un effet synergique entre plusieurs composés de HE de *M.souaveolens*(**Bencheqroun et al., 2012**). Ainsi que le pulegone est le composé principal qui inhibe la croissance bactérienne.

5.2. L'activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique par la méthode de diffusion sur gélose, nous a donnée des diamètres d'inhibition très variables selon l'HE sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition de croissance microbienne supérieurs ou égaux à 15 mm selon **Rossi et al., (2007)**

Nos résultats prouvent que l'huile essentielle de *M.suaveolens* montre un effet antifongique (tableau n°05) remarquable contre *C. albicans 10231* quelle que soit sa concentration. En outre on remarque que les diamètres d'inhibitions diminuent (27mm, 20mm) parallèlement avec la concentration d'huile essentielle (150mg/ml, 100mg/ml) respectivement (tableau), et pour les concentrations 50mg/ml, 25mg/ml C, a résistent (DZI=0mm). Ce qui prouve que la quantité d'huile essentielle a un effet très significatif sur les zones d'inhibitions. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Seladji (2015)**, et supérieure à celle de l'étude de **Riahi et al., (2013)** sur l'espèce *M. suaveolens* de Tunisie (21 mm).

L'action antifongique d'huile essentielle de *M.suaveolens* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Cox et al., 2000**). En effet, les composés terpéniques d'huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Knobloch et al., 1989**).

L'huile essentielle de la plante *M.souaveolens* a montré une cytotoxicité envers toutes les souches étudiées mais avec des degrés différents, les bactéries se sont révélées plus sensibles à cette huile que la levure « candidat albicans ». Cette différence dans la sensibilité des espèces microbiennes suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux effets de composants différents de l'huile essentielle. Ainsi que l'activité antimicrobienne est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles.

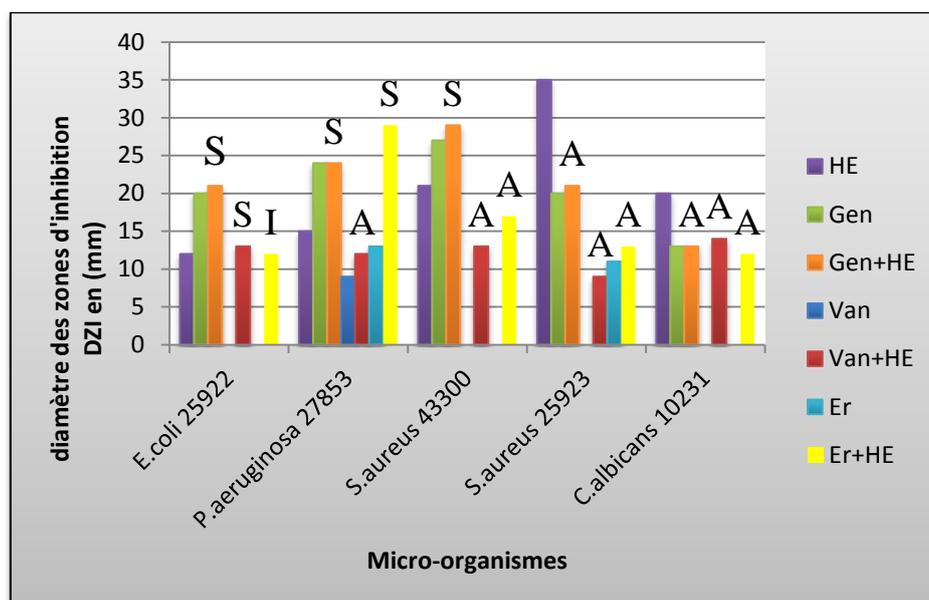
6. Etudes de l'effet des antibiotiques et l'association « huile essentielle/antibiotique »

L'association des huiles essentielles de *Mentha suaveolens* aux différents antibiotiques, et de l'antibiotique seulement présentent des effets qui sont statistiquement différents, nous avons réalisée ce test synergétique par la méthode classique de diffusion en disques sans oublier que l'huile essentielle est incorporée dans la gélose, vis-à-vis des souches microbiennes testées, Les résultats sont présentés dans la figure n°26 et le Tableau n°06.

Résultats et discussion

Tableau n° 06: Effets des différentes associations « HE /Antibiotiques », l'antibiotique et HE sur les cinq souches microbiennes.

Les antibiotiques	Les souches microbiennes				
	<i>E. coli</i> 25922	<i>P.aeruginosa</i> 27853	<i>S.aureus</i> 43300	<i>S.aureus</i> 25923	<i>C.albicans</i> 10231
	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)				
HE	12	15	21	35	20
Gen	20	24	27	20	13
Gen+HE	21	24	29	21	13
Van	0	9	0	0	0
Van+HE	13	12	13	9	14
Er	0	13	0	11	0
Er+HE	12	29	17	13	12



A : Antagoniste.

I : Indifférent.

S : Synergie.

Figure n°26: Représentation graphique des résultats de l'association d'huile *M.suaveolens* avec les antibiotiques testés.

Résultats et discussion

6.1. L'antibiogramme

A partir de ces résultats (tableau n°06) on note que tous les souches microbiennes sont sensibles aux antibiotiques Gen, puis qu'elles ont des zones d'inhibition supérieures à 8 mm, et pour l'antibiotique Er agit sur les deux souches *P.aeruginosa* 27853 et *S.aureus* 25923, par contre les souches *E. coli* 25922, *S.aureus* 43300, *C.albicans* 10231 sont résistantes (DZI=0mm), cependant l'antibiotique Van agit seulement sur *P.aeruginosa* 27853, et pour tous les autres souches sont résistantes (DZI=0mm).

6.2. Effet de l'association « huile essentielle/antibiotique »

Pour la bactérie *E. Coli* Les résultats montrent que l'association de l'HE de *M.souaveolens* avec Er a donné des interactions indifférentes par rapport à celle de l'HE seul, tandis qu'un effet synergique est obtenu lorsque on associe l'huile avec Vanc et Gen avec des diamètres des zones d'inhibition de 12 mm pour l'huile seule et 13 mm et 21 mm pour ces mêmes associations (figure n°26).

L'association d'huiles essentielles avec Gen et Er donne un effet synergique des diamètres des zones d'inhibition de 15 mm pour l'huile seule et 24 mm, 29mm respectivement. Alors que l'association d'huile avec Van donne une interaction antagoniste pour la bactérie *P.aeruginosa* 27853.

Pour *S.aureus* 43300 l'association d'huile avec Gen donne un effet synergique (29mm) en revanche l'association d'huile avec Van et Er donne une interaction antagoniste.

Pour les deux micro-organismes *S.aureus* 25923 et *C.albicans* 10231 l'association de l'huile avec les trois antibiotiques Gen, Van et Er donne des interactions antagonistes.

D'après la figure les résultats montrent que l'association d'huile avec les trois antibiotiques agit sur toutes les souches microbiennes avec des activités variables (synergie, antagonisme et indifférence), cette différence peut être expliquée par le mode d'action des composés d'HE, les différents composés d'HE ne réagissent pas de la même manière en les combinant avec les antibiotiques testés.

Résultats et discussion

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour l'huile essentielle de *M.suaveolens* avec une concentration de 100 mg/ml, nous avons présenté les résultats dans le tableau suivant :

Tableau n° 07 : Résultats de l'activité antimicrobienne de huile essentielle *M. suaveolens* réalisé par la méthode de CMI

	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	0,098	T-	T+
E. coli 25922	-	-	-	-	-	CMI	+	+	+	+	-	+
P.aeruginosa 27853	CMI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
S.aureus 43300	-	-	-	-	-	-	CMI	+	+	+	-	+
S.aureus 25923	-	-	-	-	CMI	+	+	+	+	+	-	+
C.a	CMI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

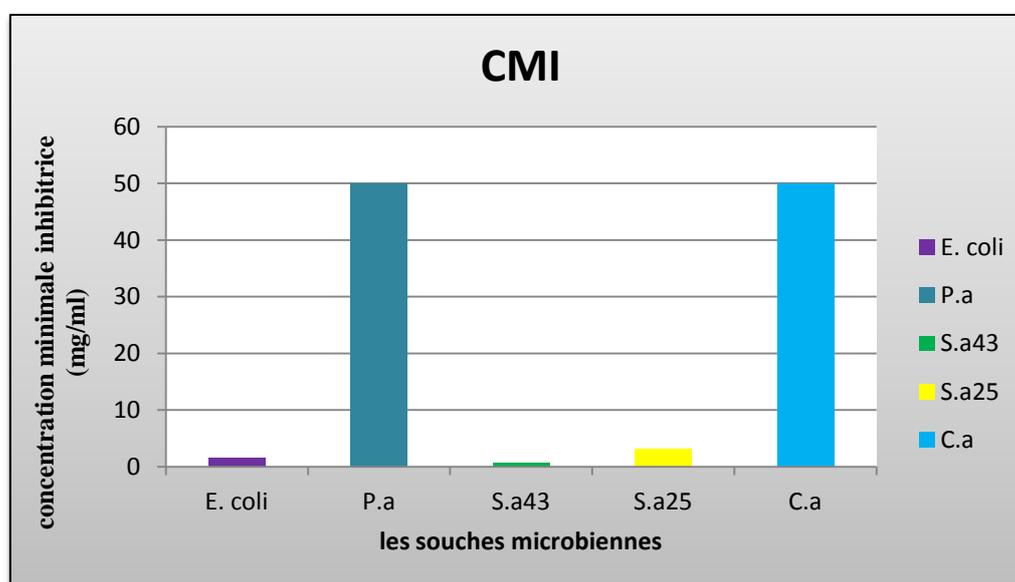


Figure n°27 : Représentation graphique des CMI d'huile essentielle *M.suaveolens* relative aux souches bactériennes et fongique.

Résultats et discussion

En général, Les germes pathogènes utilisés dans ce biotest ont été sensibles à l'huile essentielle de menthe suaveolens. Les seuils d'activité antibactérienne se situent entre 0,78 mg/ml et 50mg/ml. Alors que pour l'activité antifongique la CMI est 50mg/ml. Les bactéries étaient donc plus vulnérables à l'huile essentielle de M.S que les champignons.

L'HE du MS montre une activité fongitoxique contre *Candidat albicans* avec la concentration d'inhibition de 50mg/ml.

En contre partie, pour les bactéries, la concentration de 0,78 mg/ml a été suffisante pour arrêter la croissance de *Staphylococcus aureus* 43300 (Gram +) qui s'est montré le plus vulnérable à cette HE, suivi d'*Escherichia coli* (Gram -) qui ont été inhibé à partir de la concentration minimale de 1,56 mg/ml puis *Staphylococcus aureus* 25923(Gram+) qui ont été inhibé à partir de la concentration minimale de 3,125 mg/ml . Par contre, *P.aeruginosa* 27853 (Gram +) a été inhibé à la concentration en huile essentielle de 50 mg/ml.

Nos résultats sont déferents à ceux indiqués par **Seladji (2015)** et **Lahbab (2013)** qui ont trouvé que, la souche qui s'est montrée la moins sensible à l'HE de *M.suaveolens* est *Staphylococcus aureus* avec une CMI de (1.25 mg/ml ; 0.25 mg/ml), suivie de *E. coli* dont la croissance a été inhibée à la concentration de (5 mg/ml ; 0.5mg/ml). Par contre nos résultats concordent à l'étude de **Riahi et al., (2013)** qui a montré que *S.aureus* est la souche le plus sensible avec une CMI de (0.1 Mg/ml) ,suivie de *E. coli* avec une CMI de (0.05mg/ml).

D'après les résultats l'huiles essentielle de *M. suaveolens* possèdent un effet inhibitrice sur la souche *C.albicans* , Nos résultat est concordé à l'étude réalisé par **Seladji (2015)**, **Lahbab (2013)** et **Riahi et al., (2013)** qui ont montré des valeurs de CMI (5mg/ml, 0.25mg/ml et 0.8mg/ml) respectivement moins élevé par rapport à nos résultat.

Résultats et discussion

8. Détermination de la concentration minimale bactéricide en milieu solide

La détermination de CMB et CMF en milieu solide c'est le paramètre qui nous permet de déterminer l'effet bactéricide et fongicide de notre huile essentielle.

Les résultats des concentrations minimales bactéricides et fongicides d'HE vis-à-vis les souches bactériennes et fongiques sont présentées dans le tableau n°08.

Tableau 08 : Les résultats des CMB et CMF d'HE de *M.suaveolens*.

Les souches	CMB				CMF
	S. aureus 25923	S. aureus 43300	P.aeruginosa 27853	E. coli 25922	C. albicans 10231
	12.5	50	50	25	50

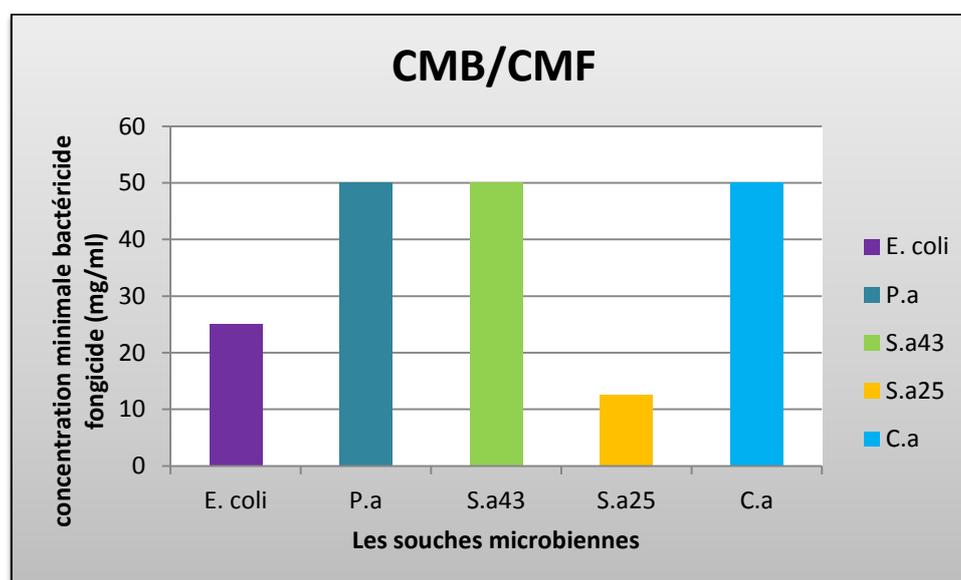


Figure n°28 : Représentation graphique des CMB d'huile essentielle *M.suaveolens* relative aux souches bactériennes et fongique.

On a remarqué que l'huile essentielle de *M.suaveolens* présente une activité bactéricide sur les 4 souches étudiées (figure n°28), avec des valeurs variables d'une souche bactérienne à une autre, notre huile essentielle a été tué la totalité des souches bactériennes en particulier *S.aureus* ATCC 25923 qui a été présenté une valeur de CMB (12.5 mg/ml) suivi par *E. coli* ATCC 25922 (25 mg/ml) donc ces deux espèces sont les plus sensibles vis-à-vis d'HE avec des valeurs de CMB moins élevées. En revanche, les valeurs de CMB les plus élevées sont obtenues par les bactéries *S.aureus* ATCC 43300 et *P.aeruginosa* ATCC 27853 (50 mg/ml).

Résultats et discussion

Alors que l'huile essentielle présente une activité fongicide sur *C.albicans* 10231 avec une valeur très élevée de CMF (50mg/ml).

Nos résultats sont concordent à ceux indiqués par **Riahi et al., (2013)** et **Seladji (2015)** et **Zekri (2017)** qui ont trouvé que, la souche le plus sensible à l'HE de *M.suaveolens* est *S.aureus* avec des CMB de (0.2 mg/ml ; 1.25 mg/ml et 38.4 mg/ml) respectivement suivie de *E. coli* avec des CMB de (0.1 mg/ml ;10mg/ml et 76.8mg/ml).

Notre résultat est concordé à l'étude réalisé par **Seladji (2015)** et **Riahi et al (2013)** qui ont montré des valeurs de CMF (10 mg/ml, 1.6mg/ml) respectivement moins élevé par rapport à notre résultat.

D'après cette comparaison on peut conclure que notre huile essentielle possède un effet bactéricide et fongicide.

9. Qualification de l'activité antimicrobienne de l'HE

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide et/ou fongicide d'une huile essentielle de mentha suaveolens. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile essentielle est considérée comme bactéricide, et lorsqu'il est supérieur à 4 l'HE est qualifié de pouvoir bactériostatique. Les résultats de rapport CMB/CMI sont présentés dans le tableau n°09.

Tableau n° 09 : Le rapport CMB/CMI et CMF/CMI relative aux cinq souches microbiennes.

CMB/CMI				CMF/CMI
Les Souches microbiennes				
S. aureus 25923	S. aureus 43300	P.aeruginosa 2783	E. coli 25922	C. albicans 10231
4	64.10	1	16.02	1
CMI : Concentration minimale inhibitrice				
CMB : Concentration minimale bactéricide				
CMF : Concentration minimale fongicide				

Résultats et discussion

D'après le tableau on a remarqué que le rapport CMB/CMI de l'huile essentielle de *M. suaveolens* est de valeur 1 chez les souches *P.aeruginosa* 2783 et *C. albicans* 10231, et de valeur 4 chez la souche *S. aureus* 25923. Cette huile essentielle semble donc exercer une action bactéricide et fongicide contre ces trois souches microbiennes, et pour les valeurs des bactéries *S. aureus* 43300 et *E. coli* 25922 sont de (64.10 et 16.02) respectivement, donc cette constatation nous a amené à dire que notre huile essentielle exercer une action bactériostatique contre ces deux souches.

Conclusion



Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés biologiques différentes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques.

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude phytochimique des extraits aqueux, acétonique et éther diéther obtenu par macération et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *M. suaveolens* récolté dans la région de l'Ain Témouchent.

L'extraction de l'huile essentielle des graines de *M. suaveolens* a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement a été voisin de 2,75%.

Les tests phytochimiques du matériel végétal de *M. suaveolens* par des réactions colorées et de précipitation ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires susceptibles d'avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes. L'épuisement des parties par des solvants de polarité différente a révélé la présence : des flavonoïdes, des tanins, les saponosides, les glucosides cardiotoniques, les alcaloïdes, mucilage, les terpénoïdes, les coumarines, et les quinones libres. L'amidon et emodols n'est pas présent, ainsi que la teneur en composée phénolique et en sucre totaux montrent des concentrations (1,8 g/l ; 0,1676 g/l) respectivement dans l'extrait aqueux.

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne des HE étudiées a montré un effet antimicrobien pour toutes les souches testées. Ces résultats mettant en évidence des zones d'inhibition avec des diamètres dépassant 8 mm des souches étudiée, montrant ainsi des degrés de sensibilité des bactéries étudiée différents vis-à-vis de la quantité de l'huile essentielle testée sauf que la souche fongique est résiste sur les concentrations (25 mg/ml ; 50 mg/ml) d'huiles essentielle. A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, on peut conclure que les huiles essentielles de *M. suaveolens* présentent un bon effet antibactérien sur les souches bactériennes dans laquelle on a remarqué que la plus grande surface d'inhibition est enregistrée sur les bactéries Gram positif que les bactéries Gram négatif. En ce qui concerne la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par la méthode de microdilution en milieu liquide, nos résultats de façon générale montrent que l'huile essentielle de *M. suaveolens* présente un effet inhibiteur avec des valeurs de CMI varie d'une souche à l'autre, et une activité bactéricide sur les souches bactériennes et une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne avec une valeur de CMB et CMF élevé.

Conclusion

D'après le calcul de rapport CMB/CMI et CMF/CMI on a conclu que HE de *M.suaveolens* exerce une action bactéricide contre *P.aeruginosa* 2783 et *S. aureus* 25923 et une action bactériostatique contre *E. coli* 25922 *S. aureus* 43300, et action fongicide sur *C.albicans* 10231.

Les résultats de l'association des huiles essentielles étudiées avec les différents antibiotiques ont donné des interactions variables synergétiques, antagonisme et indifférente par rapport à l'huile essentielle testée seule.

De même d'autres études de l'association « huiles essentielles/antibiotiques » sont recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine.

Nous recommandons également une étude de conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huiles essentielles présentant des effets synergiques en association et ce dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens.

Perspective

L'ensemble de ces résultats a permis d'avoir la caractérisation et l'isolement des différents constituants d'huile essentielle et d'évaluer l'activité antimicrobienne de nos plantes choisies et de sélectionner les familles chimiques d'intérêt biologique afin de mieux connaître, utiliser ces ressources dans le domaine thérapeutique et élargir le panel des tests des activités *in vitro*, évaluer et tester les différents extraits afin d'y trouver une application pharmaceutique de ces molécules actives, ou alors en conservation des produits destinés à la consommation.

Résumé : Les recherches actuelles sont focalisées sur les molécules douées d'activités biologiques d'origine naturelle. L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) obtenu par hydrodistillation des parties aériennes de la plante *Mentha suaveolens*, avec un rendement de 2.75%. Le screening phytochimiques a permis de mettre en évidence la présence des tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les glucosides cardiotoniques, les alcaloïdes, mucilage, les terpénoïdes, et les coumarines, les quinones libres. La teneur en composés phénoliques a été déterminée en utilisant la méthode de bleu au prusse dans l'extrait aqueux, avec une concentration de (1,8 g/l), et la teneur en sucres totaux a été déterminée par la méthode du phénol sulfurique dans les extraits aqueux et avec une concentration de (0.1676 g/l). L'effet antimicrobien a été évalué par la méthode de diffusion sur gélose vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300), et une souche fongique *Candida albicans* 10231, cet effet est relativement élevé, avec des zones d'inhibition variant entre 9 et 43 mm. La méthode de microdilution a confirmé ces résultats, les CMI obtenues des souches bactériennes sont comprises entre 0.78 et 50 mg/ml. et les valeurs de la CMB de l'huile essentielle de *Mentha suaveolens* sont élevées. Pour le *C. albicans* la valeur de CMI et CMF obtenues estimée à 50 mg/ml. L'association d'huile avec les trois antibiotiques agit sur toutes les souches microbiennes avec des activités variables (synergie, antagonisme et indifférente).

Mots clés : *Mentha suaveolens*, étude phytochimique, composés phénoliques, sucre totaux, huile essentielle, activité antimicrobienne, inhibition, synergétique, antagonisme, indifférente.

Abstract : Current research is focused on molecules with biological origin activities natural. The objective of this study is the evaluation of the activity antimicrobial essential oil (ET) obtained by steam distillation of the aerial parts of the plant *Mentha suaveolens*, with a yield of 2.75%. The phytochemical screening has helped to high light the presence of tannins, saponins, flavonoids, cardiac glycosides, alkaloids, mucilage, terpenoids, and coumarins, quinones free. The content of phenolic compounds was determined using the method of Prussian blue in the aqueous extract with a concentration of (1.8 g / l), and the total sugar content was determined by the phenol sulfuric method of the aqueous extracts with a concentration of (0.1676 g / l).The antimicrobial effect was evaluated by the diffusion method vis-à-vis agar four bacterial strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300) and a fungal strain albicans10231 candidate, this effect is relatively high, with zones of inhibition ranging between 9 and 43 mm. The method microdilution confirmed these results, CMI obtained bacterial strains are between 0.78 and 50 mg / ml.et values of the essential oil of *Mentha suaveolens* CMB are high. For *C.albicans* the value of MIC and MFC obtained estimated at 50 mg / ml. The oil association with the three antibiotics affects all microbial strains with varying activities (Synergy, antagonism and indifference).

Keywords : *Mentha suaveolens*, phytochemical study, phenolic compound, total sugar, essential oil, antimicrobial activity, inhibition, synergistic, antagonistic, indifferent.

Références bibliographiques



Référence bibliographique

A

Abdelnour, R. and N. Arnold (2004). "Contribution à l'étude ethnopharmacologique et pharmacognosique des drogues médicinales les plus utilisées et vendues par les herboristes du Liban et recherche de leurs falsifications." *Annales de Recherche Scientifique*.

Adepo, Y. P., Seka, A., Biego, H. G., Chatigre, K. O., & Kati, C. S. (2010). Étude de l'évolution des paramètres physico-chimiques de 2 plantes *euphorbia hirta* et *secamone afzelii* en fonction des quatre saisons de l'année, de l'extraction aqueuse et évaluation du pouvoir lactogène. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de liège*.

Adida, H., et al. (2016). "Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*." *Phytothérapie* 14(4): 207-212.

Amarti, F., et al. (2010). "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc." *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 14(1): 141-148.

Amel, B. (2018). "Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *Thymus fontanessii* Boiss et Reut."

Amiot, M. J., et al. (1989). "Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles." *Apidologie* 20(2): 115-125.

Angone, S. A., Samseny, R. A., & Mba, C. E. M. (2015). Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. *Phytothérapie*, 13(5), 283-287.

Aouni, M., et al. (2013). "Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application." *Phytothérapie* 11(4): 225-236.

Arab, K., et al. (2013). "Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé." *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* 9(3): 159-166.

Augustin, J. M., et al. (2011). "Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins." *Phytochemistry* 72(6): 435-457.

B

Baxter, H., et al. (1998). *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*, CRC press.

Baysal T. et Starmans D.A.J. (1999). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carvone and Lionene from Caraway Seeds; *Journal of Supercritical Fluids* 14; p: 225-234. Belaiche P. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I*, Edition Maloine 1979.

Référence bibliographique

- Benabdelkader, T. (2012).** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique, Université Jean Monnet-Saint-Etienne.
- Benchilla, L., Lounis, S., & Metrouh-Amir, H. E. (2018).** Etude de l'activité antioxydant des extraits phénoliques de *Spergularia rubra* L.
- Benjilali B. (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation.17-59.
- Benmehdi H. (2000).** Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire en chimie (Magistère) Tlemcen.
- Bohlmann, J. and C. I. Keeling (2008).** "Terpenoid biomaterials." *The plant journal* 54(4): 656-669.
- Boizot, N. and J.-P. Charpentier (2006).** "Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier." *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro spécial: 79-82.
- Boucher, M.-A. (2015).** Caractérisation chimique et évaluation du potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Tussilago farfara* (L.) et de *Tanacetum vulgare* (L.), Université du Québec à Chicoutimi.
- Boukezat, A. (2015).** La Composition chimique et l'activité antibactérienne d'une plante Algérienne (*Bunium Inkrassatum*).
- Boukhatem, M. N., et al. (2014).** "Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]." *International Journal of Innovation and Applied Studies* 8(4): 1418.
- Bourgou S., Ksouri' R., Skandranf I., Chekir-Ghedira L. and Marzouk B. (2008).** Antioxydant and antimutagenic activities of the essential oil and méthanol extract from tunisien *nigella sativa* l. (ranunculaceae). *Italian Journal of Food Science* 20: 191-201.
- Bouzig, A., et al. (2017).** "Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale." *Phytothérapie* 15(6): 373-378.
- Brada, M., et al. (2007).** "Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie." *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 11(1): 3-7.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème Edition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
-

Référence bibliographique

Burt, S. (2004). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223-253.

C

Castaneda-Ovando, A., et al. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food chemistry* 113(4): 859-871.

Chebaibi, A., et al. (2011). "Effet bactéricide (in vitro) des extraits aqueux des feuilles du grenadier marocain (*Punica granatum L.*) sur des bactéries multirésistantes aux antibiotiques." *Phytothérapie* 9(3): 158.

Chiasson, H. and N. Beloin (2007). "Les huiles essentielles, des biopesticides" *Nouveau genre.* *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec* 14(1): 3-6.

Chibani, S. (2013). "Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algerien."

Chira, K., et al. (2008). "Les polyphénols du raisin." *Phytothérapie* 6(2): 75-82.

Christianson, D. W. (2007). "Roots of biosynthetic diversity." *Science* 316(5821): 60-61.

Christianson, D. W. (2008). "Unearthing the roots of the terpenome." *Current opinion in chemical biology* 12(2): 141-150.

Couic-Marinier, F. and A. Lobstein (2013). "Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine." *Actualités pharmaceutiques* 52(525): 18-21.

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

D

Daira, N. E.-H., et al. (2016). "Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Ammoides verticillata* (Desf.) Briq. de l'Est Algérien." *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 85: 276-290.

De Billerbeck, V.-G. (2007). "Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques." *Phytothérapie* 5(5): 249-253.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, John Wiley & Sons.

Diarra, N., et al. (2016). "Etude ethnobotanique des plantes alimentaires utilisées en période de soudure dans les régions Sud du Mali." *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 10(1): 184-197.

Dohou, R., et al. (2003). "Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*." *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux* 142(1/4): 61-78.

Référence bibliographique

Dudareva, N., et al. (2004). "Biochemistry of plant volatiles." *Plant physiology* 135(4): 1893-1902.

Dykes, L. and L. W. Rooney (2006). "Sorghum and millet phenols and antioxidants." *Journal of cereal science* 44(3): 236-251.

E

Eddouks, M., et al. (2007). "L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc." *Phytothérapie* 5(4): 194-203.

Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4(7): 685-688.

Egan, D., et al. (1990). "The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds." *Drug metabolism reviews* 22(5): 503-529.

El Arch, M., et al. (2003). "Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc." *Acta botanica gallica* 150(3): 267-274.

El Azzouzi, F. and L. Zidane (2015). "La flore médicinale traditionnelle de la région de Béni-Mellal (Maroc)." *Journal of Applied Biosciences* 91(1): 8493–8502.

EL Meskaoui, A., et al. (2008). "Plantes médicinales et aromatiques marocaines: opportunités et défis." *Revue AFN Maroc* N 2: 3.

F

Fertout-Mouri, N., et al. (2017). "Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale)." *Phytothérapie* 15(6): 346-353.

Francis, G., et al. (2002). "The biological action of saponins in animal systems: a review." *British journal of Nutrition* 88(6): 587-605.

G

Gabriel, I., et al. (2013). "Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés." *INRA Prod. Anim* 26(1): 13-24.

Garnero J(1991). *Phytothérapie-aromathérapie*. Encycl. Méd. Nat, p : 20.

Gauriat, E. (2015). *Accompagnement d'une rééducation physique post-traumatique par l'aromathérapie* (Doctoral dissertation, éditeur inconnu).

Ghedira, K. (2005). "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique." *Phytothérapie* 3(4): 162-169.

Référence bibliographique

Goetz, P. and K. Ghedira (2012). "Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles." *Phytothérapie anti-infectieuse*: 193-208.

Güçlü-Üstündağ, Ö. and G. Mazza (2007). "Saponins: properties, applications and processing." *Critical reviews in food science and nutrition* 47(3): 231-258.

Guillaume, D. and Z. Charrouf (2005). "Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*)." *Cahiers Agricultures* 14(6): 509-516 (501).

H

H. J. D. Dorman and S. G. Deans (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, no. 2, pp. 308-316.

Hamoudi N. (2012). « Caractéristiques des huiles essentielles et son application antimicrobienne de la plante *Ocimum basilicum* ; mémoire DEUA ; Univ. Khemis Miliana ».

Hesse, M. (2002). *Alkaloids: nature's curse or blessing*, John Wiley & Sons.

Hollman, P. and M. Katan (1997). "Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 51(8): 305-310.

Hussain J. and Khan M. A. (2011). Estimation of phytochemical and antimicrobial activities of *Mentha spicata* from southern districts of KPK. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(07): 81-84.

I

Imène, L. (2012). "Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs." *Nature & Technology*(7): 44.

J

Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.), Lavoisier.

K

Kaloustian, J., et al. (2008). "Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne." *Phytothérapie* 6(3): 160-164.

Karumi y., Onyeyili P.A et Oyugbuaja V.O.(2004). Identification of active principals of *M.Balsamia*(Balsam Apple) leaf extract.*J.Med.Sci*,4(3) :179-182.

Kempf, M., et al. (2011). "Étude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies." *Pathologie Biologie* 59(1): 39-43.

Keville K. et Green M. (1995). *Aromatherapy: A complete guide to healing art*, Ed 1: The crossing press; p: 120-140.

Référence bibliographique

Khanbabaee, K. and T. van Ree (2001). "Tannins: classification and definition." *Natural product reports* 18(6): 641-649.

KHRIBCH, J., et al. (2018). "Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire." *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires* 6(3): 300-307.

Kpatinvoh, B., et al. (2017). "Efficacité des huiles essentielles de trois plantes aromatiques contre la mycoflore d'altération du niébé (*Vigna unguiculata* L., Walp) collecté dans les magasins de vente du Sud-Bénin." *Journal of Applied Biosciences* 109(1): 10680-10687.

L

La, C., et al. (1963). "L'antibiogramme."

Lacy, A. and R. O'kenedy (2004). "Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer." *Current pharmaceutical design* 10(30): 3797-3811.

Lagunez Rivera L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p: 31-42.

Lahlou, M. (2004). Method to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.

Landoulsi, A., et al. (2018). "Composition chimique et activités pharmacologiques des espèces tunisiennes du genre *Eryngium* L.(Apiaceae)."

Lardry, J.-M. and V. Haberkorn (2007). "L'aromathérapie et les huiles essentielles." *Kinésithérapie, la revue* 7(61): 14-17.

Lawrence, B. M. (2006). *Mint: the genus Mentha*, CRC Press.

Lee, J., et al. (2005). "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study." *Journal of AOAC international* 88(5): 1269-1278.

Leonard, E., et al. (2010). "Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(31): 13654-13659.

M

Macheix, J.-J., et al. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*, PPUR presses polytechniques.

Référence bibliographique

Manase, M. J. (2013). Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae, Université de Bourgogne.

Martini MC., Seiller M. (1999). Actifs et additifs en cosmétologie. Procédés d'extraction des huiles essentielles. Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales. p 563.

Marrouf, A, G. (2009). Tremblin, Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.

Medina-Remón A., Barrionuevo-González A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martínez-González M. A., Diez-Espino J. and Lamuela-Raventos R. M. (2009). Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta* 634: 54-60.

Middleton, E., et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." *Pharmacological reviews* 52(4): 673-751.

Mifsud, S. (2002). "Mentha suaveolens (Round-leaved Mint): MaltaWildPlants. com-the online Flora of the Maltese Islands."

MOHAMMEDI, Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie.

Mompon, B., et al. (1998). "Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle." *COLLOQUES-INRA*: 31-44.

N

N'zebo Jean-Michel, N. Z., et al. (2018). "État des connaissances et usages traditionnels des fruits de *Tetrapleura tetraptera* ((Schumach. & Thonn.) Taub., 1891), plante spontanée aromatique alimentaire du sud-est de la Côte d'Ivoire." *Journal of Animal & Plant Sciences* 38(1): 6190-6205.

Najjaa, H., et al. (2011). "Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L." *Acta botanica gallica* 158(1): 111-123.

O

Oloyede O.I. (2005). Chemical Profile of Unripe Pulp of *Carica Papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4: 379-381.

Ottai, M.E.S ; Sayeda, S.A. (2012). *Mona, MED. Aust. J. Basic. Appl. Sci.* 6 (3). 185-192.

Référence bibliographique

Ouali, T., et al. (2017). "Evaluation in vitro des activités antioxydante et anti inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de Citrus limon."

P

Pegoraro, R. L. (2007). "Avaliação do crescimento e produção de óleos essenciais em plantas de Mentha x piperita L. var. piperita (Lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição."

Peyron L., Richard Hubert. (1992). L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.

Pietta, P.-G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." Journal of natural products 63(7): 1035-1042.

R

Ranjeva, R., et al. (1977). "Metabolisme des composés phenoliques chez le Petunia V. Utilisation de la phenylalanine par des chloroplastes isolés." Plant Science Letters 10(3): 225-234.

Refat, A. A., et al. (2008). "Tannin contents of selected plants used in Jordan." Jordan Journal of Agricultural Sciences 4(3): 265-274.

Riahi, L., et al. (2013). "Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of Mentha rotundifolia L. in Tunisia." Industrial Crops and Products 49: 883-889.

S

Saito, K., et al. (2013). "The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity." Plant Physiology and Biochemistry 72: 21-34.

Salhi, S., et al. (2010). "Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc)." Lazaroa 31: 133.

Schofield, P., et al. (2001). "Analysis of condensed tannins: a review." Animal feed science and technology 91(1-2): 21-40.

Schwab, W., et al. (2008). "Biosynthesis of plant-derived flavor compounds." The plant journal 54(4): 712-732.

Seki, H., et al. (2015). "P450s and UGTs: key players in the structural diversity of triterpenoid saponins." Plant and Cell Physiology 56(8): 1463-1471.

SELADJI, M.(2015). Etude phytochimique, activités antioxydanteset antimicrobiennes des extraits de cinq plantes médicinale et analyses de leur huilles essentielles.

Référence bibliographique

Sofowora, A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, KARTHALA Editions.

Soualeh, N. and R. Soulimani (2016). "Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts." *Phytothérapie* 14(1): 44-57.

Stojković, D. L., et al. (2018). "Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium (II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives." *Journal of Molecular Structure* 1157: 425-433.

Sutour, S. (2010). Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthe de Corse et de Kumquats, Université de Corse.

T

Tholl, D. (2006). "Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism." *Current opinion in plant biology* 9(3): 297-304.

Tsuda, T. (2012). "Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies." *Molecular nutrition & food research* 56(1): 159-170.

Turek, C. and F. C. Stintzing (2013). "Stability of essential oils: a review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12(1): 40-53.

Twidwell, E. K., et al. (2002). "Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages."

Ullah N., Khurram M., Ali Khan F., Umar Khayyam S., Amin M. U., Ullah S., Najeeb U., Muhammad S.(2011).

V

Venugopala, K. N. (2013). "Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity." *BioMed research international*.

Vermerris, W. and R. Nicholson (2008). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic compound biochemistry*, Springer: 1-34.

Vigan, M. (2010). "Essential oils: renewal of interest and toxicity." *European Journal of Dermatology* 20(6): 685.

White, T. (1957). "Tannins—their occurrence and significance." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 8(7): 377-385.

W

Wollgast, J. and E. Anklam (2000). "Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification." *Food Research International* 33(6): 423-447.

Référence bibliographique

Y

Yang, C.-R., et al. (2006). "Antifungal activity of C-27 steroidal saponins." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(5): 1710-1714.

Z

Zbalah, H. and Y. Belarbi (2018). "Effet de séchage des plantes médicinales de la famille des Lamiacées (Romarin) sur l'activité antibactérienne."

Zekri, N. (2017). "Étude Phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium* (L.), *M. suaveolens* (Ehrh.), et *M. spicata* (L.) du Moyen-Atlas Marocain."

Zekri, N., et al. (2013). "Phytochemical study and fumigant toxicity of *Mentha suaveolens* Ehrh essential oil from Morocco against adults of *S. oryzae* (L.)." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 7(14): 599-606.

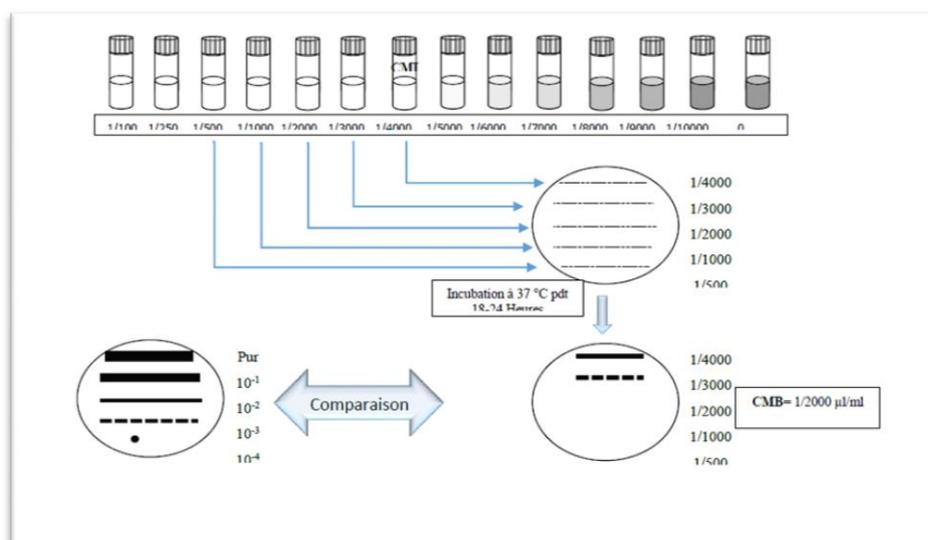
Zhang, E.-F., et al. (2018). "Identification and structural characterisation of triterpene saponins from the root of *Ardisia mamillata* Hance by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS." *Natural product research* 32(8): 918-923.

Annexes

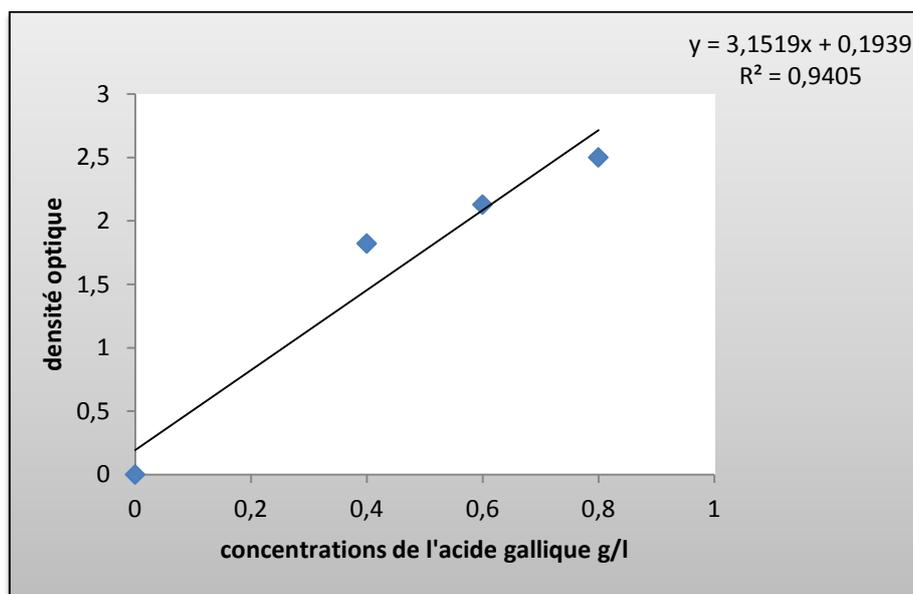


Annexes

Annexe III : schéma de la détermination de la CMB.

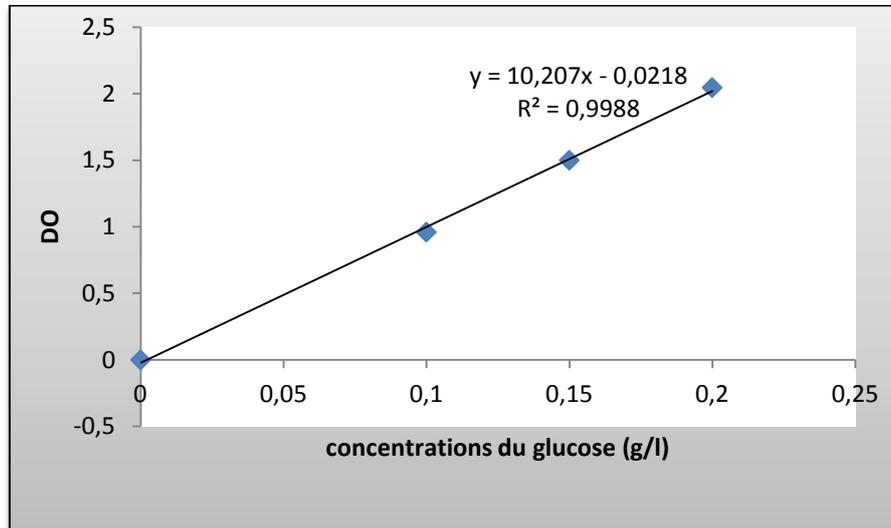


Annexe IV : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénolique.

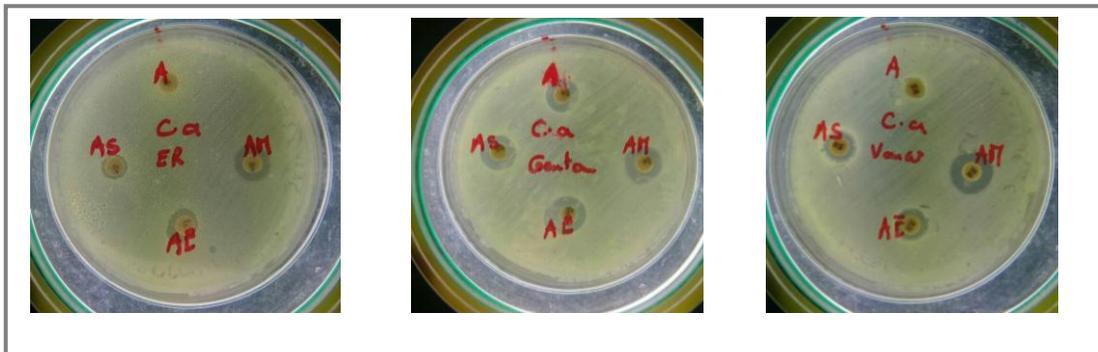


Annexes

Annexe V : Courbe d'étalonnage des sucres solubles pour le dosage des sucres totaux.



Annexe VI : les zones d'inhibition des différentes associations « HE/Antibiotiques » et l'antibiotique seuls sur quelques souches microbiennes.



Annexes

Composition de La gélose Mueller-Hinton :

- + infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- + peptone de caséine : 17,5 g
- + amidon de maïs : 1,5 g
- + agar : 17,0 g
- + pH = 7,4

Composition de la gélose dextrosée à la pomme de terre :

- + Infusion de pomme de terre : 4,0 g.
 - + Dextrose : 20,0 g,
 - + Gélose : 15,0 g
-