

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

Université - Saad Dahleb - Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Option : Biochimie

THEME

Composition Chimique et Activités Pharmacologiques de l'Huile Essentielle de la Menthe Poivrée (*Mentha piperita* L.)

Présenté par
OUKHENNICHE Yasmine
ZOUAKOU Soumia

Date de Soutenance
Mardi 26/06/2018 à 13h30 bloque 2 salle 13

Devant le jury composé de :

Mme TOUAIBIA M.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Présidente
Mme SAIDI F.	Professeur	Univ. Blida 1	Examinatrice
M. BOUKHATEM M.N.	Maître de Conférences	Univ. Blida 1	Promoteur
Mme AZINE K.	Directrice Laboratoire Pharmaco-Toxicologie	CRD Saidal Alger	co-Promotrice

🌀 Promotion: 2017-2018 🌀

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide d'ALLAH source de toute connaissance qui nous a donné la force afin de l'accomplir.

Nous remercions vivement les membres de ce respectable jury :

- Madame Touaibia (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): nous sommes très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.
- Madame Saidi (Professeur à l'Université Blida 1): Vous nous avez honoré d'avoir examiné notre mémoire de fin d'études ; nous vous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos sincères remerciements et soyez assuré de notre profonde gratitude.
- Monsieur Boukhatem (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): Nous tenons à exprimer notre vive reconnaissance à notre promoteur, pour ses conseils précieux, sa disponibilité et sa patience tout au long de ce mémoire.
- Madame Azine (Directrice du laboratoire Pharmaco-toxicologie, CRD Saidal d'Alger) : Nous tenons à vous remercier chaleureusement et vivement pour nous avoir accepté dans votre laboratoire et guider, en tant que copromotrice, tous au long de notre stage avec toute l'équipe du laboratoire.

Un immense remerciement s'adresse aussi à Mme Kellou (Directrice du laboratoire Mycologie de l'institut pasteur d'Alger) ainsi que Mme Benelmouffouk qui nous ont été d'une aide très précieuse pour la réalisation de la partie « activité antifongique ».

Nous remercions également M. Teffahi ainsi que tout le personnel du Laboratoire d'Hygiène de Blida pour leur soutien moral et matériel.

Nos vifs remerciements aussi pour tout le personnel de l'Etablissement Public Hospitalier de Koléa qui nous a tendu la main et pour son aide et sa contribution à la réalisation de l'analyse histopathologique.

Nous adressons nos vifs remerciement et reconnaissance à tous le corps enseignant de la Faculté SNV et particulièrement toutes celle et tous ceux qui nous ont enseigné durant notre cursus universitaire.

Nous ne manquons pas l'occasion de remercier particulièrement nos chers amis : Talbi Imèn, Kubaili Khadidja, Boudjebir Abir, Benhmida Asma de nous avoir procuré l'aide que nous en avons besoin.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à la mémoire de mon PERE qui m'a quitté récemment. Ta présence dans mon cœur me donne du courage et de la force à aller de l'avant, tu aurais été fière de me voir soutenir et atteindre notre rêve le plus précieux. Avec tant de chagrin je pris dieu t'accueillir en son vaste paradis.

A ma MERE, pour son soutien infaillible tout au long de ces années, avec toute ma reconnaissance et mon amour.

A mon frère RIAD qui ma soutenu et qui a été toujours là pour moi.

A mes chères sœurs, FARIDA, KENZA, ASSIA et belle sœur SORAYA.

A mon mari YOUCEF, pour tous ses conseils et sa présence dans les bons que dans les mauvais moments. Que notre complicité dure éternellement.

A ma belle famille ; ma belle mère et mes belles sœurs pour leur soutien moral.

A toi AMALA Imen, ma chère amie toujours présente dans mon cœur malgré l'éloignement.

Sans votre soutien ce mémoire n'aurais jamais vu le jour

Mercie à vous

OUKHENNICHE YASMINE

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie ce
mémoire du master à :

A Ma tendre **Mère** : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A Mon très cher **Père** : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A mon très cher mari **AOUAK Ishak** : Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mes sœurs : **Nadja et ma jumel Nesrin**

A mon cher frère : **Abdelhakim**

A mes chers beaux parents : **Mami et papitou**

Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une
longue vie.

mes chers beaux frères : Yakoub, Salah, Abdelfeteh et Aziz

A tous les membres de ma promotion surtout mon binôme

OUKHENNICHE Yasmine merci beaucoup.

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer

Merci d'être toujours là pour moi.

ZOUAKOU SOUMIA

RESUME

L'objectif assigné à ce travail consiste à valoriser l'essence aromatique d'une plante à parfum, la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), en aromathérapie anti-infectieuse et/ou comme ingrédient actif dans le traitement-prévention des pathologies inflammatoires topiques.

La composition chimique de l'huile essentielle (HE), déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse, a révélé la présence de 19 constituants. Le composé majoritaire est un monoterpène alcoolique (menthol) avec un taux de 51.2%, suivi par son cétone (menthone) avec 20.4% et l'acétate de menthyle (6.8%).

Les activités antibactérien et antifongique de l'HE a été réalisé *in vitro* sur différentes souches isolées cliniquement. Par la technique de diffusion en milieu gélosé, l'HE est douée d'une activité inhibitrice remarquable sur la croissance des isolats de *Staphylococcus aureus*, *Proteus penneri* et *Pantoea* sp. avec des Diamètres de Zones d'Inhibition (DZI) de 37.5, 16 et 14.5 mm, respectivement (10 µl/disque). Concernant les souches fongiques, l'activité inhibitrice est plus marquée pour les levures avec des DZI qui varient entre 13 et 85 mm. En outre, une inhibition totale (>85 mm) a été constatée pour la souche *Rhodotorula* sp. En microatmosphère, c'est *Candida tropicalis* et *C. glabrata* qui ont été fortement inhibées mais uniquement à forte dose avec des DZI qui oscillent entre 63 et 71 mm.

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) a révélé que la souche *Rhodotorula* sp. est le germe le plus sensible avec une valeur de CMI la plus faible (0.0078%).

Le potentiel anti-inflammatoire topique de l'HE a été exploré *in vivo*. Par la méthode de l'inflammation locale induite par le xylène, le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité avec l'HE a présenté un taux élevé (61.68%), statistiquement similaire ($p>0.05$) au contrôle positif (Bétasone®). Cette activité a été aussi confirmée, à l'échelle cellulaire, par une étude histopathologique. De plus, le lot traité avec la menthe poivrée est celui qui a présenté le nombre de contractions abdominales le plus faible (19 spasmes), statistiquement non significative ($p>0.05$) en comparaison avec le contrôle positif (Débridat®) avec un nombre égal à 26.2.

En définitive, les résultats obtenus laissent entrevoir de possibles perspectives d'application pharmaceutique de l'essence de menthe poivrée dans la prévention-traitement des infections fongiques et/ou des pathologies inflammatoires douloureuses locales.

Mots-clés: Menthe poivrée ; Huile essentielle ; Antifongique Naturel ; Anti-inflammatoire Topique ; Menthol.

ABSTRACT

The aim of our study was to promote the essential oil of the medicinal and aromatic plant of peppermint (*Mentha piperita* L.) as a bioactive compound in the treatment of human infections and/or in the management-prevention of topical inflammatory diseases.

The chemical composition of the *Mentha piperita* essential oil (MPEO) was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and revealed the presence of 19 constituents. The major compound is menthol (alcohol monoterpene) with a rate of 51.2%, followed by menthone (ketone) with 20.4% and menthyl acetate (6.8%).

The antibacterial and antifungal screening of MPEO was performed *in vitro* against various micro-organism strains isolated from clinical samples. By agar diffusion method, MPEO showed a high inhibitory activity on the growth of different species such as *Staphylococcus aureus*, *Proteus penneri* and *Pantoea* sp. with Inhibitory Zone Diameters (IZD) of 37.5, 16 and 14.5 mm, respectively (10 µl / disc). Regarding the fungal strains, MPEO demonstrated a powerful inhibitory effect, in particular against yeasts with IZD varying between 13 and 85 mm. In addition, a total inhibition (> 85 mm) was observed for the *Rhodotorula* sp. By using vapour phase assay, *Candida tropicalis* and *C. glabrata* were strongly inhibited but only in high doses with IZDs ranging from 63 to 71 mm. further, the determination of Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) revealed that *Rhodotorula* sp. is the most sensitive strain with the lowest MIC value (0.0078%).

In the other hand, the topical anti-inflammatory potential of MPEO has been assessed *in vivo* by using the xylene-induced ear edema method. Our results revealed that the animals treated with MPEO presented a high (61.68%) degree of edema reduction, which is statistically similar ($p>0.05$) to the positive control (Betasone®). This activity has also been confirmed by using a histopathological study. Further, animal treated orally by MPEO showed the lowest number of abdominal contractions (19 spasms), statistically non significant ($p>0.05$) in comparison with positive control (Debridat®).

In conclusion, our findings suggest the possible use of MPEO as a bioactive ingredient in the prevention-treatment of fungal infections and/or local inflammatory pathologies.

Keywords: Peppermint; Essential oil ; Natural antifungal; Topical anti-inflammatory; Menthol.

الهدف المخصص لهذا العمل هو تعزيز جوهر العطور للنبته العطرية، النعناع الفلفلي؛ للروائح المضادة للعدوى أو كمكون نشط لتلقي العلاج والوقاية من الأمراض الالتهابية الموضعية.

كشفت التركيب الكيميائي للزيت العطري ، الذي حدده الطيف الكروماتوغرافي-للطيف الكتلي ، عن وجود 19 مكوناً. المركب الرئيسي هو monoterpene الكحول (المنثول) مع مستوى 51.2 % ، تليها منتون (menthone) مع 20.4 % وأسينات المنثيل 6.8 %.

تم إجراء فحص مضاد للبكتيريا ومضاد للفطريات للزيت العطري الخاص بالنعناع الفلفلي في المختبر على سلالات مختلفة معزولة سريريا. من خلال تقنية الانتشار في وسط أجار ، يتمتع الزيت العطري للنعناع الفلفلي بنشاط تثبيطي ملحوظ على نمو عزلات المكورات العنقودية الذهبية ، و *Proteus penneri* و *Pantoea sp.* مع أقطار منطقة التثبيط (DZI) من 16 و 37.5 و 14.5 مم على التوالي (10 ميكرو لتر / قرص). فيما يتعلق بالسلالات الفطرية، يكون النشاط المثبط أكثر وضوحا بالنسبة للخمائر والتي تتراوح أقطار منطقة التثبيط فيها بين 13 و 85 ملم. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ تثبيط كلي (< 85 مم) لـ *Rhodotorula sp.* في الغلاف الجوي المكروي ، تم منع المبيضات الاستوائية و *glabrata C* بشدة ولكن فقط في الجرعات العالية مع أقطار منطقة التثبيط تتراوح من 63 إلى 71 ملم.

نتائج تحديد الحد الأدنى من تركيزات المثبطة (CMI) كشفت أن *Rhodotorula SP* هي الجرثومة الأكثر حساسية بأقل قيمة ل CMI و التي قدرت بـ 0.0078%.

تم استكشاف إمكانات مضادة للالتهاب الموضعي في زيت النعناع الفلفلي في الجسم الحي. باستخدام طريقة الالتهاب الناجم عن الزيلين المحلي ، كشف حساب انخفاض النسبة المئوية في الأدمة أن الدفعة المعالجة بزيت النعناع الفلفلي كانت عالية (61.68%) ، متشابهة إحصائياً للسيطرة الإيجابية (Betasone®) ($p > 0.05$) كما تم تأكيد هذا النشاط على المستوى الخلوي من خلال دراسة نسيجية. بالإضافة إلى ذلك ، كانت الدفعة المعالجة بالنعناع هي التي تحتوي على أقل عدد من تشنجات البطن (19 تشنجات) دون دلالة إحصائية ($p > 0.05$) مقارنة بالتحكم الإيجابي (Debridat®) مع عدد مساوٍ لـ 26.2.

في النهاية، تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى احتمالية التطبيق الصيدلاني لزيت النعناع الفلفلي في الوقاية من العدوى الفطرية و / أو الأمراض الالتهابية المحلية.

الكلمات المفتاحية : الزيت الأساسي للنعناع الفلفلي . ؛ مضادات الفطريات الطبيعية ؛ مضاد للالتهاب الموضعي ؛ المنثول

TABLE DES MATIERE

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

<u>A . La menthe poivrée</u>	3
A.1 Description botanique	3
A .1.1- Famille des Lamiacées	3
A.1.2- Espèce <i>Mentha piperita</i>	3
A.2 Origine et distribution de la Plante	
A.3 Classification botanique	3
A.4 Utilisation thérapeutique et traditionnelles	4
A.5 Composition chimique	5
A.6 Effet antimicrobien	5
<u>B. Inflammation</u>	6
B.1 Définitions de la réponse inflammatoire	6
B.2 Inflammation aiguë	6
B.2.1 Phase vasculo-exudative	6
B.2.2 Phase cellulaire	6
B.2.3 Phase de résolution	7
B.3 Inflammation chronique	7
B.4 Thérapeutiques de l'inflammation	8
B.4.1 Anti-inflammatoires non stéroïdiens	8
B.4.2 Anti-inflammatoire stéroïdiens	8
<u>C. Les infections microbiennes</u>	9
C.1 Définition de l'infection	9
C.2 Infections fongique	9
C.2.1 Définition des champignons	9
C.2.2 Champignons opportunistes et émergents en mycologie médicale	9
C.2.3 Infections à levures	9
C.2.4 Infections à <i>Aspergillus</i>	10
C.3 Infections bactériennes	10

C.3.1 Définition des bactéries	11
C.3.2 Etapes de l'infection bactérienne	11
C.3.3 Bactéries à Gram positif	12
C.3.4 Bactéries à Gram négatif	12

Chapitre II: Etude expérimentale

II.1. Matériel	15
II.1.1 Huiles essentielle de la menthe poivrée	15
II.1.2 Animaux de laboratoire	15
II.1.3 Souche bactériennes et fongiques	16
II.1.4 Milieux de culture	16
II.2 Méthodes	17
II.2.1. Analyse chromatographique d'HE	17
II.2.2. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique d'HE	17
II.2.2.1 Aromatogrammes	17
II.2.2.2 Microatmosphère	18
II.2.2.3 Détermination de la concentration minimal inhibitrice	19
II.2.3 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique <i>in vivo</i>	20
II.2.3.1. Principe	20
II.2.3.2. Déroulement de l'essai	20
II.2.3.3 Etude statistique	21
II.2.3.4. Etude anatomopathologique au niveau des oreilles	21
II.2.4 Evaluation du pouvoir analgésique périphérique	22
II.2.4.1 Principe	22
II.2.4.2. Etude statistique	22

Chapitre III : Résultat et discussion

III.1 Détermination de la composition chimique d'HE	23
III.2 Pouvoir antimicrobien d'HE <i>in vitro</i>	26
III.2.1 Activité antimicrobienne en aromatogramme	26
III.2.2 Activité antimicrobienne en microatmosphère	29
III.2.3 Détermination de la concentration minimal inhibitrice	30
III.3 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique	31
III.3.1 Etude histopathologique	33
III.4 Activité analgésique périphérique <i>in vivo</i>	36

Conclusion **40**

Référence bibliographique

Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification botanique de <i>Mentha piperita</i>	3
Tableau 2. Souches bactériennes utilisées dans le screening antibactérien <i>in vitro</i>	16
Tableau 3. Souches fongique utilisées dans le screening antifongique <i>in vitro</i>	16
Tableau 4. Composition chimique de l'HE de <i>Mentha piperita</i>	24
Tableau 5. Etudes comparatives des constituants de l'essence de la menthe poivrée provenant d'écosystèmes différents	25
Tableau 6. Screening antibactérien de l'essence de menthe poivrée <i>in vitro</i>	26
Tableau 7. Screening antifongique de l'essence de menthe poivrée <i>in vitro</i>	28
Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour différentes souches microbiennes	30

Liste des Figures

Figure 1. La morphologie de la menthe poivrée	4
Figure 2 . Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins	7
Figure 3. Différentes étapes de l'aromatogramme	18
Figure 4. Illustration de la méthode de Microatmosphère	19
Figure 5. Illustration de la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrice par dilution en milieu gélosé.	20
Figure 6. Profil chromatographique de l'essence aromatique de <i>Mentha piperita</i>	22
Figure 7. Diamètres des Zones d'Inhibition liés au pouvoir antibactérien de l'HE de menthe poivrée sur quelques espèces bactériennes	27
Figure 8. Résultats de détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (%) des levures pour quelques dilutions gélosées	31
Figure 9. Pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence de menthe poivrée, en comparaison avec les médicaments de synthèse	32
Figure 10. Aspects histopathologiques (coloration Hématoxyline-Eosine) des pièces cutanées auriculaires des souris soumis au test d'œdème topique induit par le xylène.	34
Figure 11. Pouvoir analgésique périphérique de l'essence aromatique de menthe poivrée <i>in vivo</i> , en comparaison avec deux médicaments anti-inflammatoires	37

Liste des Abréviations

® : Marque enregistrée.

AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien.

AIS : Anti-inflammatoire Stéroïdien.

ANOVA : Analyse des Variances.

ATB : Antibiotique.

CG/MS : Chromatographie en Phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

COX : Cyclo-Oxygénase.

CRD : Centre de Recherche et de Développement

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde.

DPO : Différence de Poids des Oreilles.

DZI : Diamètre de Zone d'Inhibition.

HD : Hydrodistillation.

HE : Huile Essentielle.

HEX : Héxoméline.

IK : Indice de Kovats.

IL8 : Interleukine 8.

IR : Indices de Rétention.

ISO : International Organization for Standardization

LSD : Least Significant Differences.

LTB4 : Leucotriène B₄.

MH : Gélose Mueller-Hinton.

MW : Microwave (micro-ondes).

MWHD: Microwave Hydrodistillation (Hydrodistillation assistée aux micro-ondes).

NF : Norme Française.

NIST : National Institute of Standards and Technology.

NMRI : Naval Medical Research Institute.

PAM : Plantes Aromatique et Médicinale.

POD : Poids Oreille Droite.

OD : Oreille Droite.

OG : Oreille Gauche.

ONAB : Office National des Aliments du Bétail.

SAB : Sabouraud Chloramphénicol.

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline.

SFME: Solvent Free Microwave Extraction (Extraction aux micro-ondes sans solvants).

TR : Temps de Rétention.

ECBU : Examen Cyto-Bactériologique Urinaire.

UPD : Ulcères du Pied Diabétique.

Glossaire

- Angiospermes** Les plantes à fleurs.
- Ascomycète** Des champignons caractérisés par des spores (ascospores) formées à l'intérieur d'asque
- Gamopétales** Une plante ses pétales sont soudés entre eux.
- Invasion** Pénétrer par force dans l'organisme.
- La détersion** Nettoyage d'une cicatrisation.
- Le rhizome** C'est la tige souterraine remplie de réserve alimentaire.
- Les basidiom** Sont des champignons caractérisés par des spores formées à l'extrémité de cellules.
- Morbidité** Pourcentage des individus malades dans une population dans un temps donné.
- Névrалgie** Est une affection douloureuse causée par un nerf.
- Pyogène** Un micro organisme qui produit du pus.
- Spermaphytes** Plantes à ovules .
- Ubiquitaire** Qui peut se développer n'importe où.
- vasodilatation** Est l'augmentation du calibre des vaisseaux sanguins.
- Vivace** Résistante, robuste , plante qui vie plus de deux années ,qui se maintient sans défaillance .

INTRODUCTION

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se chauffer, se parfumer... mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé.

Par ailleurs, les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans les secteurs des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques,... et de la pharmacie (**bruneton, J.,1999**).

De nos jours, les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes,... et médecin en raison de leurs utilisations dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins actifs ou dans la préservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimiques de synthèse (**Farnsworth et al., 2007**).

Le continent africain est doté d'une grande biodiversité, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques variés. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elle sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies (**Hubert, 2005**).

Le secteur de production des huiles essentielles connaît ces dernières années, un essor rapide. Cette évolution est due essentiellement à la forte demande mondiale pour les produits naturels, au nombre croissant d'utilisateurs et enfin à la diversité des domaines de valorisation (**Bessah, R., Benyoussef E,H., 2015**).

Ce sujet nous assemblé d'autant plus intéressant que la flore Algérienne est extrêmement riche en plante aromatique.

A cet effet on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : *Mentha piperita* qui est caractérisé par un large spectre de vertus étant un stimulant général, antispasmodique, antiseptique et légèrement aphrodisiaque, digestif, bactéricide puissant, parasiticide cholagogue (facilite l'évacuation de bile vers l'intestin) (**Hammami et Abdesselem, 2004**).

L'objectif assigné à notre travail consiste à asseoir, *in vitro*, le pouvoir antifongique de la fraction aromatique de la menthe poivrée en utilisant plusieurs méthodes qualitative (aromatogramme et microatmosphère) et quantitative (détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)). De plus et pour valider les propriétés curatives de cette fraction aromatique, l'activité anti-inflammatoire a été mener, *in vivo*, via le teste d'induction d'œdème des oreilles par le xylène. En outre, la composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par la Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM), afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cette plante à parfum.

Chapitre I

Synthèse Bibliographique

A : La menthe poivrée

A.1- Description Botanique

A .1.1- Famille des Lamiacées

La famille des *Lamiaceae* ou *Labiaceae* est une famille de plantes herbacées à buissonnantes (rarement arbustives : Hyptis). Elle contient plus de 252 genres et près de 6700 espèces qui se répartissent sur tout le globe, mais principalement du bassin méditerranéen à l'Asie Centrale. Cette famille est connue depuis longtemps à cause des propriétés médicinales, aromatiques des plantes qu'elle renferme. La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles distinguent cette famille (Pedersen, 2000).

A.1.2- Espèce *Mentha piperita*

Il s'agit d'une plante vivace à rhizome long, rampant, traçant, chevelu. La tige, de 50 à 80 centimètres, dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un très beau vert et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorante (II Edrissi, 1982 ; Benayad, 2008). Les fleurs, violacées, forment des épis très courts, ovoïdes, à l'extrémité des rameaux. Le fruit, divisé en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquante et rafraîchissante (Benayad, 2008).

A .2-Origine et distribution de la Plante

La menthe poivrée est originaire de l'Inde. Elle est cultivée en Europe centrale et du Sud, Amérique du Nord et du Sud, Asie, Afrique du Nord, presque dans le monde entier. Elle se trouve à l'état sauvage dans toute l'Australie, l'Amérique du Nord et en Europe (Charles, 2013).

A .3-Classification botanique

La systématique de la plante est donnée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Classification botanique de *Mentha piperita* (Kouame et al., 2016)..

Embranchment	Spermaphytes
Sous embranchment	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopetales
Ordre	Sympétales
Famille	Lamiacées (labiacées)
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha piperita</i>

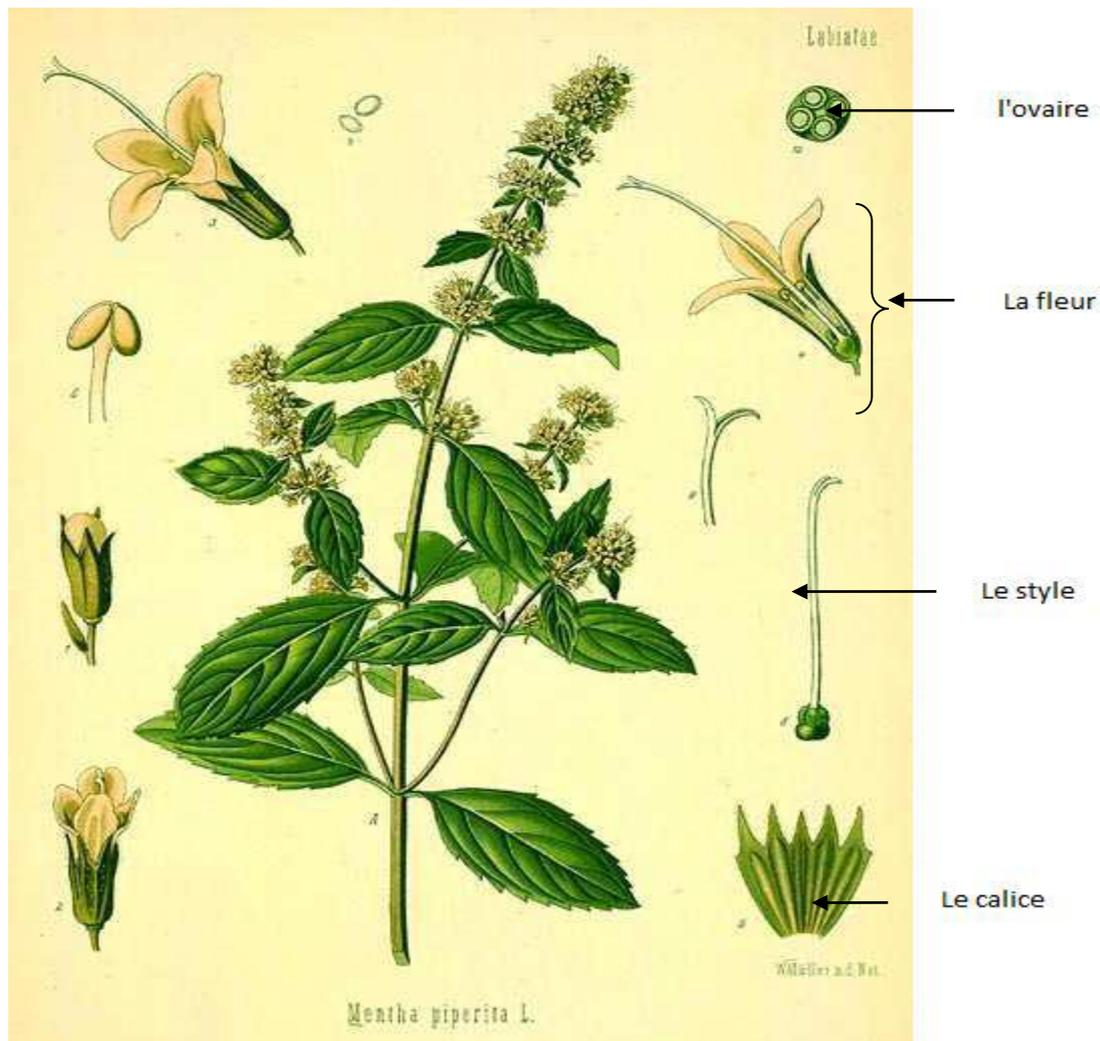


Figure 1 : la morphologie de la menthe poivrée (Eberhard, 2005).

A .4-Utilisation thérapeutique et traditionnelles

a- Trouble digestif

La menthe poivrée est excellente pour le système digestif, elle stimule la sécrétion des sucs digestifs et de la bile, et décontracte les muscles intestinaux. Elle atténue nausées, ballonnements et colites .son action antispasmodique sur le colon est efficace en cas de diarrhée, comme en cas de constipation (Youcef ,1990 ; Iserin, 2001).

b- Douleur

Elle est utilise pour soulager les maux de tête, traite les parasites de la peau (démangeaisons cutanées). Elle traite l'inflammation des voies respiratoires et de la muqueuse buccale, soulage les symptômes, du rhume et de la toux, les douleurs rhumatismales musculaires, et névralgiques (Hammami et Abdesselem, 2005).

C- Infection

L'utilisation de l'huile essentielle diluée en inhalation ou message légers sur la poitrine, en cas d'identifications bronchique .la plante entière est efficace en cas de gastro-entérites (Iserin ,2001). La menthe poivrée ne doit pas être administrée aux jeunes enfants, en usage médicinal. Elle est excitante et à la longue irritante (Baba aissa ,1999).

A.5 - Composition chimique

La réalisation des extraits avec différentes parties de la menthe poivrée ont montré la diversité et la richesse en plusieurs constituants tel que : flavonoïdes (lutéolme, menthoside), tocophérols, azulènes, l'acide rosmarinique, des terpènes, des caroténoïdes, des tanins et huile essentielle (**Iserin, 2001 ; Charles, 2013**).

Les huiles essentielles représentent de 1 à 3 % de la masse de la matière sèche de la partie aérienne de la plante, Leurs principaux constituants sont le menthol (29-50%), le menthone (16-25%), de l'acétate de menthyle (pas plus de 5%), l'isomenthone (de 10 à 15%), menthofurane, et pipéritone. Elle contient également de 1 à 5% limonène, de 3,5-14% de 1.8 cinéole (**Bruneton, 1999 ; Charles, 2013**).

A.6-Effets antimicrobiens

L'huile essentielle de la menthe poivrée a été testée pour ses propriétés antimicrobiennes sur 21 micro-organismes pathogènes pour l'Homme, elle s'est avérée une fortement inhibitrice face aux micro-organismes pathogènes pour les plantes, tandis que les agents pathogènes humains ont été que modérément inhibés. Le menthol, le principal constituant de l'huile essentielle de menthe poivrée, a été jugé responsable de la propriété antimicrobienne des huiles (**Iscan et al., 2002**).

Selon **Mimica-Dukic, (2003)** et ses collaborateurs, l'huile essentielle de menthe poivrée expose une très forte activité antibactérienne en particulier contre les souches d' *E.coli*. Elle a également montré une activité fongistatique et fongicide avec des valeurs de concentration minimale significative, qui étaient considérablement plus faibles que celles de la bifonazole fongicide du commerce.

En outre, **Yadegarinia et al., (2006)** ont trouvé que l'huile essentielle de menthe poivrée a possédé d'excellentes activités antimicrobiennes contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec des diamètres des inhibitions de 31,11 11,67 et 90 mm respectivement.

L'activité antibactérienne de 15 échantillons des huiles essentielles des plantes d'origine Slovaque dont *Mentha piperita* L. ont été testés par la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre les genres de *Clostridium* (*Clostridium butyricum*, *Clostridium hystoliticum*, *Clostridium intestinale*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium ramosum*). Les résultats ont montré que *M.piperita* possède un pouvoir modéré contre les souches testées. La plus sensible de cette HE est *Clostridium butyricum* (**Kačániová et al., 2014**).

B : Inflammation

B.1 Définitions de la réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est une réponse adaptative engendrée en réponse à des stimuli nocifs telle qu'une infection ou une agression tissulaire. Elle nécessite une régulation fine, généralement bénéfique, elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (**Nathan, 2002 ; Barton, 2008**). La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus. L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique. Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient une inflammation chronique (**Weill et al., 2003**).

B.2 Inflammation aigue

Elle comporte trois phases et est illustrée dans **la figure I.2**

B.2.1- Phase vasculo-exsudative

Cette phase est déclenchée par l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, entraînant une augmentation de l'apport sanguin. Survient ensuite un œdème inflammatoire permettant l'apport des moyens de défenses jusqu'à la lésion et l'initiation du foyer inflammatoire. La phase de la réaction vasculo-exsudative se clôture par la diapédèse des leucocytes de la circulation sanguine jusqu'au foyer de l'inflammation (**Hotamisligil, 2006**).

B.2.2. Phase cellulaire

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires. Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la détersion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immunitaire spécifique de l'antigène (**Nathan, 2002**).

L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression environ 30 minutes. C'est à ce moment qu'on pourra constater « in situ » la présence de polynucléaires neutrophiles, lesquelles sont plaquées le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8 (cytokines), et LTB4 (rôle chimiotactique pour les leucocytes sur le site inflammatoire). Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple. Elle repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule. Ceci conduit à la sécrétion des protéases et la libération des radicaux libres. Les neutrophiles vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la

réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir (**Charles *et al.*, 2010**).

B.2.3. Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaire sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire (**Weill et Batteux, 2003**).

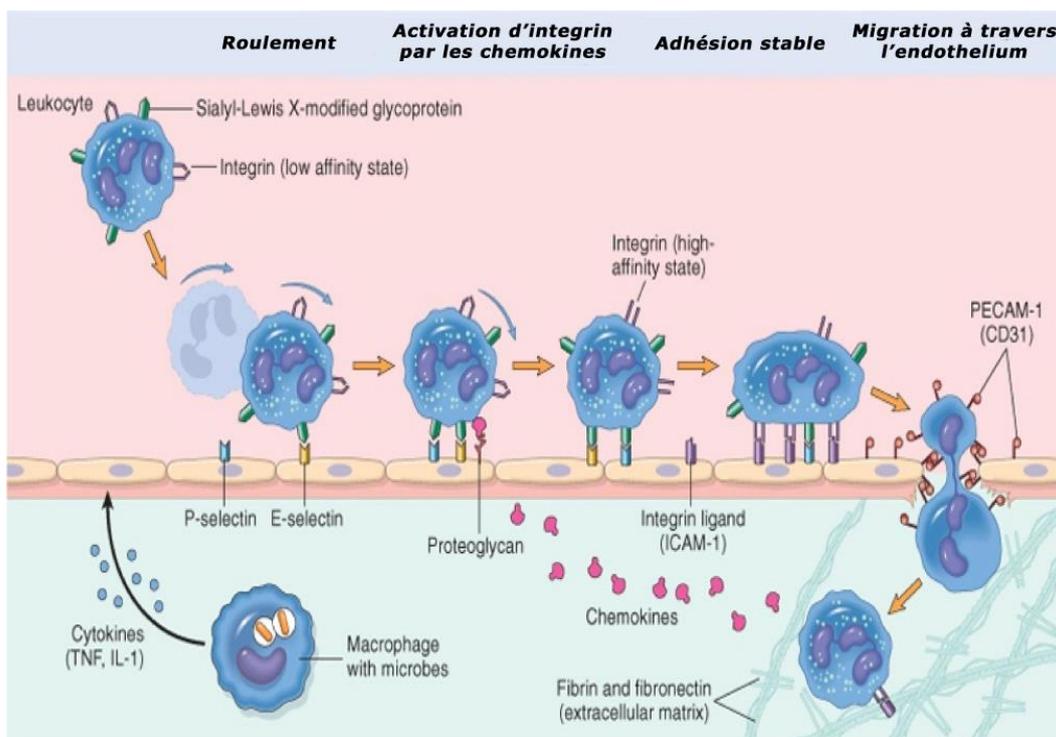


Figure 2 : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins (in Lambrecht et Hammad, 2010).

B.3. Inflammation chronique

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causé par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise. L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entrainer l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire ; Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorisent

l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire (**Charles *et al.*, 2010**).

B.4. Thérapeutiques de l'inflammation

La thérapie anti-inflammatoire est destinée à contrôler l'excès de réaction spécifique des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique (**Muster, 2005**).

B.4.1 Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont les produits les plus fréquemment utilisés pour traiter l'inflammation. Ils sont définis comme étant la classe de médicaments qui possède les mêmes propriétés pharmacologiques (anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques) de l'acide acétylsalicylique (Aspirine). Le traitement par les AINS provoque l'inhibition de la voie du COX (Une cyclo-oxygénase, enzyme permet la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique) ; et par conséquent la réduction de la production des prostaglandines et la diminution de la perméabilité vasculaire (**Lüllman *et al.*, 2001**).

B.4.2 Anti-inflammatoire stéroïdiens (AIS)

Les AIS constituent une vaste famille de médicaments dérivés de cortisol, principal les glucocorticoïdes. Ils sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire, qui résulte de leur capacité d'action sur la majeure partie des cellules impliqués dans la réaction inflammatoire et sur la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation (**Russo-Marie *et al.*, 1998**).

C: Infections microbiennes

C.1. Définition de l'infection

L'infection est un phénomène microbien caractérisé par une réponse inflammatoire liée à la présence ou à l'invasion des tissus normalement stériles par des microorganismes (**Ben chabaane, 2003**).

Pour qu'un agent pathogène puisse induire une maladie infectieuse il faut qu'il soit capable de:

- ✓ Se transmettre de l'origine vers l'hôte.
- ✓ S'adhérer et de coloniser l'hôte.
- ✓ Se multiplier et se développer dans l'hôte.
- ✓ Echapper aux mécanismes de défense de l'hôte.
- ✓ Avoir des capacités de nuire à l'hôte (**Prescottm et al., 2003**).

C.2. Infections fongiques

C.2.1 Définition des champignons

Les champignons sont des organismes pluricellulaires se nourrissant de matière organique trouvée à proximité d'eux. On distingue, selon leur morphologie, les champignons inférieurs (levures, moisissures...) et les champignons supérieurs (**Chaumeton, 1985**).

C.2.2 Champignons opportunistes et émergents en mycologie médicale

On définit le champignon opportuniste comme un micromycète qui profite d'un état de faiblesse, de vulnérabilité temporaire ou prolongée de l'hôte, pour s'implanter et exprimer son pouvoir pathogène, c'est-à-dire une agression vis-à-vis de l'organisme hôte. A noter que l'état d'immunodépression n'est pas une condition absolue (**Chabasse et Bouchara, 1997**).

C.2.3. Infections à levures

Les levures correspondent à un stade unicellulaire de champignons ascomycètes ou basidiomycètes avec un thalle unicellulaire qui donne naissance à une cellule fille par bourgeonnement à partir d'une cellule mère (le blastopore). L'examen direct des colonies montre un aspect le plus souvent crémeux, et de coloration caractéristique de chaque espèce (**Blot., 2003**).

C.2.3.1. *Candida*

Les *Candida* sont des micro-organismes commensaux, endogènes ou exogènes, diversement adaptés au parasitisme et dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants. Les candidoses sont donc dans leur grande majorité des infections opportunistes. (**Koenig, 2001**).

- ✓ *Candida albicans*

Candida albicans est l'espèce la plus fréquemment incriminée en pathologie humaine. C'est une levure ovoïde à bourgeonnement multilatéral. Cette levure vit à l'état saprophyte dans le tube

digestif de l'homme, des mammifères et des oiseaux. Elle devient pathogène sous l'influence de divers facteurs. Elle est responsable de 50 % de mycoses profondes. Sa dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif. (Koenig, 2001).

✓ *Candida tropicalis*

Candida tropicalis est retrouvé dans les voies digestives et urinaires. On peut également la trouver dans le milieu extérieur : le sol, l'eau, les céréales. Levure ovoïde ou globuleuse de taille variable, mesurant (4,5-7) x (6-10) µm. (Odile, 2001).

✓ *Candida glabrata*

C'est une levure saprophyte de la flore normale de l'Homme. Malgré qu'elle soit incapable de produire des formes filamenteuses, elle est considérée comme agent opportuniste responsable de candidémies, d'infections de l'appareil urinaire et de candidoses profondes (Vandeputte *et al.*, 2008 ; Ahmed *et al.*, 2014).

C.2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, communément appelée « levure de bière » est largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, La contamination s'était faite lors de l'ouverture des sachets contenant la préparation de *Saccharomyces cerevisiae*. Les levures disséminant directement ou par l'intermédiaire des mains du personnel soignant (Koenig, 2001).

C.2.3.3 *Rhodotorula*

Les levures du genre *Rhodotorula* sont ubiquitaires dans la nature. Leur caractéristique est la production d'un pigment orangé sur milieu de Sabouraud. Chez l'Homme, elles sont commensales de la peau, des ongles, du tube digestif et des muqueuses génitales. Elles se présentent sous forme de levures ovoïdes ou allongées (Braun et Kauffman, 1992).

C.2.4 Infections à *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes : on les trouve en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques en décomposition), ainsi qu'en milieu urbain ; Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines (Blot ;2003).

L'aspergillose invasive est une infection fongique la plus fréquente en hématologie, et une cause de mortalité et de morbidité importante chez les patients en hématologie pédiatrique (Blot ; 2003).

C.3. Infections bactériennes

C.3.1 Définition des bactéries.

Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou simples. Les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (**Tony et Paul, 1999**).

Sur les infections bactériennes en général, il faut savoir que :

- Il ya deux catégories distinctes de maladies : l'infection (ou invasion) : Une maladie infectieuse résulte partiellement de la multiplication bactérienne qui provoque souvent des altérations tissulaires. Et l'intoxication : Résulte de l'entrée d'une toxine spécifique dans le corps de l'hôte. La toxine peut être une exotoxine ou une endotoxine.
- Le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection.
- La virulence est une notion quantitative alors que le pouvoir pathogène est une notion qualitative. Ainsi pour un même pouvoir pathogène, on peut avoir des souches plus ou moins virulentes.
- Un agent pathogène primaire est un agent causant une maladie chez un hôte sain par interaction directe. Au contraire un agent opportuniste est un organisme soit normalement libre, soit faisant partie de la microflore normale de l'hôte mais qui peut devenir pathogène dans certaines circonstances.
- Le terme virulence fait référence à l'intensité du pouvoir pathogène qui est déterminé par 3 caractéristiques : les pouvoirs invasifs, infectieux et toxinogènes. Le pouvoir invasif est la capacité de l'organisme à se répandre dans les tissus adjacents. Le pouvoir infectieux est la capacité qu'a l'organisme d'établir un foyer d'infection. Le pouvoir toxinogène est la capacité du germe à produire des toxines.
- La maladie peut résulter parfois des réactions immunitaires exagérées de l'hôte vis-à-vis un agent pathogène et non à cause des toxines (**Prescott, 2003**).

C.3.2 Etapes de l'infection bactérienne

Dans une maladie bactérienne, les étapes obligatoires d'une infection sont :

- 1- Le maintien d'un réservoir (Un endroit de vie avant et après l'infection).
- 2- La transmission de la bactérie à l'hôte convenable.
- 3- La fixation à et /ou la colonisation de l'hôte.
- 4- La multiplication dans ou sur l'hôte.
- 5- La résistance aux mécanismes de défense de l'hôte
- 6- L'interférence avec les activités physiologiques de l'hôte pour les altérer et provoquer par la suite la maladie.
- 7- quitter l'hôte et retourner au réservoir pour atteindre un nouvel hôte.

Les 5 premiers facteurs influencent les pouvoirs infectieux et invasif. Le pouvoir toxinogène joue un rôle majeur dans le sixième facteur (**Prescott, 2003**).

C.3.3 Bactéries à Gram positifs

✓ *Staphylocoques*

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des photogènes humains anciens, fréquents, polyvalents et importants, ont été décrits par Robert Koch en 1878 et cultivés par Louis Pasteur en 1880 (**John, 2002**).

Ce sont des cocci à Gram positif, généralement groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés.

Staphylococcus aureus, qui produit l'enzyme coagulase et dont les colonies sont généralement jaunes dorées, est le principal agent pathogène humain.

C'est un pyogène qui possède 4 caractéristiques spécifiques :

- Diversité.
- Persistance.
- Résistance (**Osman, 2011**).

C.3.4 Bactéries à Gram négatifs

✓ *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif, aérobic stricte, dépourvue de capsule. L'espèce *P. aeruginosa* est ubiquitaire dans l'environnement et peut être commensale du tube digestif. Dans l'environnement, elle est trouvée dans le sol, dans l'eau, à la surface des plantes et des animaux. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois retrouvée dans les solutions aseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les canalisations, les lavabos (**Wolfgang et al., 2003**).

✓ *Proteus*

Les *Proteus* sp. sont des bacilles à Gram négatif, généralement très mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 1,0 µm à 80 µm de longueur. Les espèces du genre *Proteus* sont largement répandues dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de nombreuses espèces animales (**Lamnaouer, 2002**).

✓ *Pantoea* sp

Le genre *Pantoea* est un groupe diversifié de pigments jaunes, en forme de baguette Bactéries à Gram négatif dans les Enterobacteriaceae, les souches *Pantoea* ont été souvent isolé de nombreux environnements aquatiques et terrestres, ainsi qu'en association avec des insectes, des animaux et des humains (**Muraschi et al., 1965**).

Certains isolats de *Pantoea* produisent des antimicrobiens et ont été développé en produits commerciaux de biocontrôle pour aider à contrôler la brûlure des pommiers et des poiriers (**Johnson et al., 1993 ; Johnson et al., 2000**) tandis que d'autres ont un potentiel de biorestauration, avec la capacité de dégrader les herbicides (**Pileggi et al., 2012**).

Chapitre II

Etude Expérimentale

Chapitre II

MATERIEL et METHODES

L'objectif de notre étude était de tester, *in vitro*, le pouvoir antibactérien et antifongique de l'HE de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) sur plusieurs souches isolées cliniquement, à travers l'application de plusieurs méthodes microbiologiques (aromatogramme, microatmosphère et dilution en milieu gélosé). Par la suite, les activités anti-inflammatoire et antalgique ont été explorées *in vivo* avec une confirmation histo-pathologique. En outre, la composition chimique de l'essence de la plante a été déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse (CG-SM).

L'étude expérimentale de notre travail a duré 4 mois, (Février-Mai 2018). Nous avons effectué les différentes analyses dans les structures ci-après :

- Laboratoire de Mycologie de l'Institut Pasteur d'Algérie, Dély-Brahim (Alger).
- Laboratoire d'Hygiène et Contrôle de Qualité relevant de l'Etablissement de Proximité de la Santé Publique (EPSP) de Blida.
- Laboratoire de Pharmaco-Toxicologie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) de Sidal, Gué de Constantine, Alger.
- Laboratoire d'Anatomie-Pathologique de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH), Tipaza.

II.1. Matériel

II.1.1. Huile essentielle de menthe poivrée

Nous avons acheté l'huile essentielle de menthe poivrée de la société « Ziphee-Bio » spécialisée dans la distillation des huiles et production des engrais biologiques et de pulpes d'agrumes (Bouira). L'essence aromatique a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail et ceci dans le but de réduire au maximum d'éventuelles altérations d'oxydation.

II.1.2. Animaux de laboratoire

En ce qui concerne l'évaluation des propriétés anti-inflammatoire et antalgique *in vivo*, nous avons utilisé un total de 35 Souris (NMRI) de sexe mâle et femelle avec un poids qui varie entre 20-25 g. Tous ces animaux de laboratoire ont été stabulés dans des cages en plastique, à une température ambiante, un taux d'humidité et photopériode avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB, de l'eau de manière *ad-libitum*. L'expérimentation a porté sur des souris saines et adultes et misent à jeun 18 heures avant les expériences.

II.1.3. Souches bactériennes et fongiques

Les activités antibactérienne et antifongique ont été évaluées sur 6 souches bactériennes isolées cliniquement (**Tableau 2**) ainsi que sur plusieurs isolats fongiques (2 champignons filamenteux et 5 souches de levures) (**Tableau 3**).

Tableau 2. Souches bactériennes utilisées dans le screening antibactérien *in vitro*.

Souches bactériennes	Origine	Famille
Bactéries à Gram -		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Prélèvement purulent (UPD)	Pseudomonadaceae
<i>Pantoea</i> sp.	Prélèvement purulent (UPD)	Enterobacteriaceae
<i>Proteus penneri</i>	Prélèvement purulent (UPD)	Enterobacteriaceae
Bactéries à Gram +		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Prélèvement purulent (UPD)	Micrococcaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	ECBU	Micrococcaceae
<i>Staphylococcus aureus</i>	Alimentaire (Lait de chèvre)	Micrococcaceae

ECBU: Examen Cytobactériologique des urines ; UPD : Ulcère du pied diabétique

Tableau 3. Souches fongique utilisées dans le screening antifongique *in vitro*.

Souches Fongiques	Origine	Famille
Levures		
<i>Candida albicans</i>	Prélèvement vaginal	Saccharomycetaceae
<i>Candida glabrata</i>	Prélèvement vaginal	Saccharomycetaceae
<i>Candida tropicalis</i>	Prélèvement vaginal	Saccharomycetaceae
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ongles	Saccharomycetaceae
<i>Rhodotorula</i> sp.	Onyxis	Sporidiobolaceae
Moisissures		
<i>Aspergillus niger</i>	Ambiance	Trichocomaceae
<i>Aspergillus flavus</i>	Prélèvement auriculaire	Trichocomaceae

Toutes les souches bactériennes ont été isolées et identifiées au niveau du Laboratoire d'Hygiène de Blida. Pour les champignons, Ils proviennent de la Mycothèque de l'Institut Pasteur d'Alger.

II.1.4. Milieux de cultures

Au cours de notre étude microbiologique, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la Gélose Nutritive (GN) ou Muller-Hinton (MH) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Tous ces milieux de culture proviennent de la société Idéal-Labo (Beni Mered, Blida). Concernant les souches fongiques, nous avons utilisés une solution antiseptique d'Hexomédine à 0.1% (Isopharm, Algérie) comme contrôle positif en raison de non disponibilité des disques antifongiques.

Le solvant DMSO a été utilisé pour la dilution de l'HE dans un milieu gélosé afin de déterminer la CMI. Ce solvant est pur chimiquement et provient de l'Institut Pasteur d'Alger.

II.2 Méthodes

II.2.1. Analyse chromatographique d'HE

La détermination de la composition chimique de l'HE de menthe poivrée a été faite par Chromatographe en Phase Gazeuse couplée à une Spectrométrie de Masse (CG-SM). Les caractéristiques de la CPG utilisée sont les suivantes : Shimadzu, série GC-17A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) à régulation électronique de pression, équipé d'une colonne capillaire 5-DB (Tracsil Meta.X5, 95% diméthyl-polysiloxane et 5% diphenyl-polysiloxane, Teknokroma Coop. C. Ltd. (Barcelone, Espagne).

En plus le spectromètre de masse utilisé est de série Shimadzu QP-5050A. La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire DB-5 (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 µm. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL/min. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/200). L'appareil est piloté par un système informatique de type « *GCMS Postrun Analysis* », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des composés terpéniques se fait sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des bibliothèques informatisées et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Kovats (IK) (Indice de Rétention : IR). Les IK sont calculés avec le logiciel « *GCMS Postrun Analysis* ».

II.2.2. Evaluation du pouvoir antibactérien et antifongique d'HE

II.2.2.1. Aromatogrammes

Dans cette méthode (Figure II.1), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Dassel, Allemagne) imprégnés d'une quantité d'HE (10, 20 et 30 µL). Le disque sera déposé au centre d'une boîte contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé. L'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique est identique à celui de l'antibiogramme.

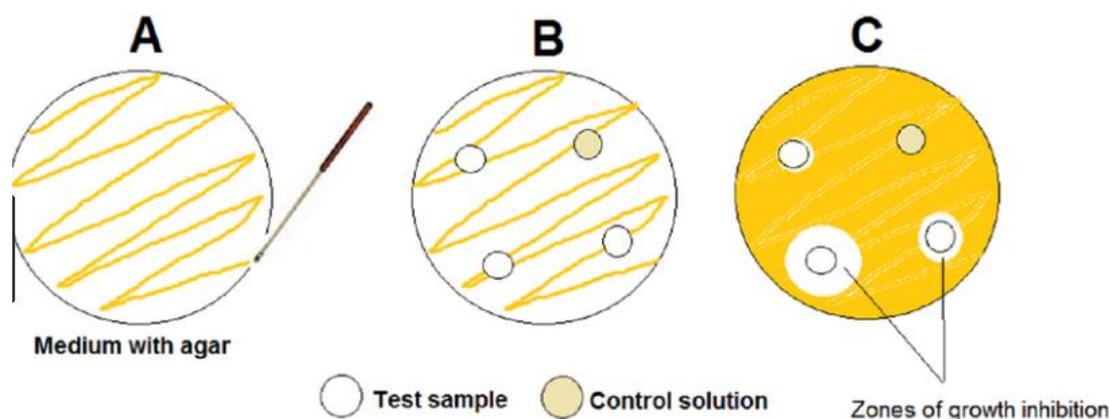
Plusieurs volumes en HE ont été utilisés dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'essence sur la croissance des germes microbiens. La boîte Pétri est fermée par la suite, puis incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 30°C pendant 3 ou 5 jours respectivement pour les levures et les moisissures,).

L'huile aromatique de la menthe poivrée diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries et les champignons croissent sur toute la surface gélosée sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence suffisante qui inhibe leur croissance.

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en millimètres (mm).

Pour chaque souche fongique, des contrôles positifs (solution antiseptique d'Héxoméline) ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques imbibés de

solution qui vont servir de référence pour pouvoir comparer leur pouvoir antifongique avec notre échantillon de l'HE.



A) Ensemencement de la souche microbienne sur milieu gélosé ; B) Dépôt des disques imprégnés par l'huile essentielle ; C) Lecture des zones d'inhibition après incubation à température adéquate.

Figure 3. Différentes étapes de l'aromatogramme (images.google.com en 21.05.2018).

II.2.2.2. Microatmosphère

Cette méthode (diffusion en phase vapeur) a été utilisée dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'huile aromatique (Tyagi *et al.*, 2011).

La différence entre cette technique et la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme) réside l'emplacement du disque imprégné en huile essentielle (Figure II.2). Cette méthode permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Le disque imprégné en HE sera déposé sur couvercle de la boîte de Pétri et donc il n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Aussi, nous avons appliqué 3 quantités croissantes d'HE aux disques. En premier lieu, 10 μL d'huile a été déposée sur un disque de papier filtre de 2 cm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, aussi un disque de 2 cm mais a été imprégné par 20 μL d'HE alors que pour le 3^{ème}, un disque de 3,5 cm a été chargé par 30 μL d'HE.

La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72h et 5 jours respectivement pour les levures et les moisissures,.

Par la suite, l'évaporation des substances volatiles qui, en contact avec les bactéries et champignons ensemencés sur le milieu de culture gélose, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire.

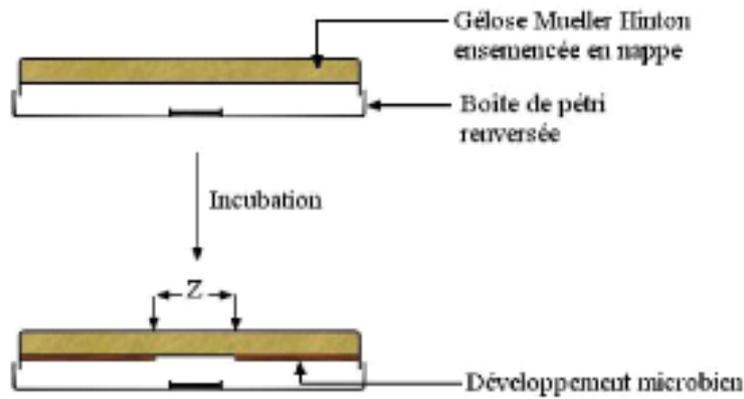


Figure 4. Illustration de la méthode de microatmosphère (images.google.com 21.05.2018).

II.2.2.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (Tyadi *et al.*, 2011) pour évaluer la sensibilité des micro-organismes aux agents antimicrobiens. Elle consiste à ensemencer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE dispersée de façon homogène et stable dans le milieu de culture. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance fongique (Figure II.3).

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'un agent dispersant et solubilisant inerte, en l'occurrence le DMSO.

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

Une série de dilution de l'HE est préparée avec un intervalle de concentrations qui varie entre 1% à 0,0078% pour les levures. L'ensemencement de chaque milieu sera fait par touche à l'aide d'un écouvillon stérile. Les boîtes Pétri seront incubées à 25°C pendant 72h pour les levures.

La lecture des résultats se fait visuellement en observant s'il y a l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne. La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu. Le résultat sera exprimé en % (v/v).

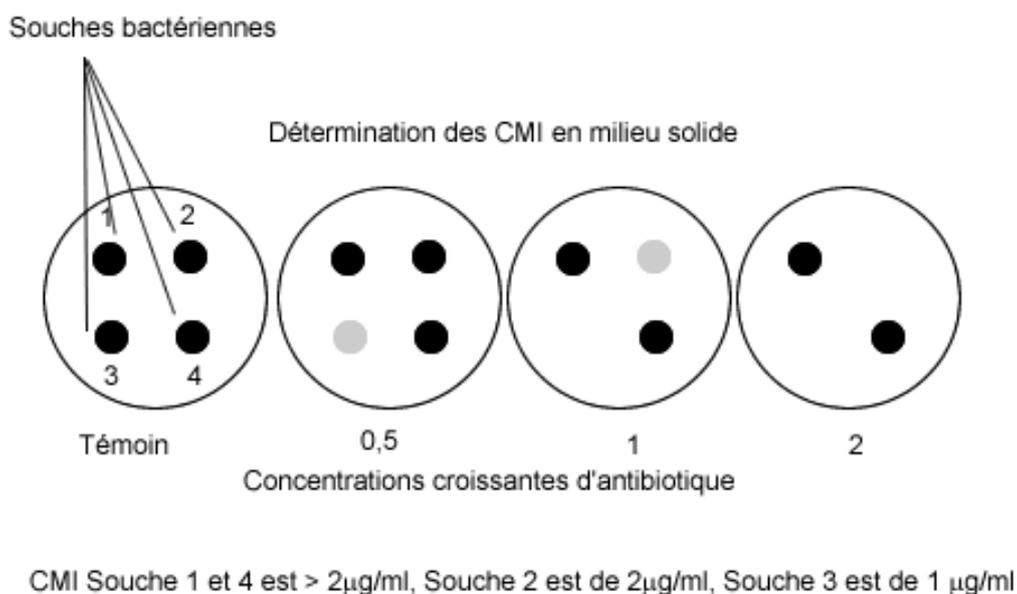


Figure 5. Illustration de la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrice par dilution en milieu gélosé (images.google.com).

II.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique *in vivo*

II.2.3.1. Principe

Le pouvoir anti-inflammatoire locale de l'HE de menthe poivrée a été évalué *in vivo* sur des souris de souche NMRI. L'œdème a été provoqué au niveau de l'oreille droite de chaque souris, par application d'une solution de xylène à 10% comme agent irritant. L'oreille gauche servait de témoin négatif. La méthodologie suivie est celle décrite par **Hosseinzadeh et Younesi (2002)**.

II.2.3.2. Déroulement de l'essai

Nous avons constitué 4 lots contenant chacun 5 souris. Les différents traitements ont été administrés aux souris par voie locale (application cutanée au niveau de l'oreille droite). Ces lots sont répartis de la façon suivante :

- Lot Contrôle + recevra une quantité d'une pommade dermique anti-inflammatoire stéroïdienne de Betasone® 0.05% (Betamethasone, Sidal, Médéa, Algérie) ;
- Lot du Contrôle + recevra une quantité d'un gel dermique anti-inflammatoire non stéroïdien Voltarène Emulgel® 1% (Diclofénac de diéthylamine, Novartis, France) ;
- Lot Essai recevra une application de l'HE qui est diluée à dans l'huile d'amande douce (10%) ;
- Lot du Contrôle - recevra une quantité de 20 mg d'huile d'amande douce.

Ces différents traitements ont été administrés par voie topique aux souris. Après 30 minutes, l'inflammation sera provoquée par application locale du xylène à 10% (solution irritante) sur l'oreille droite de toutes les souris. Les oreilles gauches serviront de témoin. Après l'écoulement d'une période estimé à 4 heures, tous les animaux ont été sacrifiés par une forte dose de l'éther et

des pièces circulaires, de 5 mm de diamètre, ont été coupées et retirées des oreilles traitées (droites) et non traitées (gauches). Ces pièces ont été pesées et conservées immédiatement dans du formol à 10% pour l'étude histopathologique.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au contrôle négatif, selon la formule suivante :

% de réduction de l'œdème

$$= \left[\frac{(\Delta T -) - \Delta E}{(\Delta T -)} \right] \times 100$$

$\Delta T -$: Différence entre les moyennes du poids des oreilles (D-G) pour le lot Contrôle – (huile d'amande douce) ;

ΔE : Différence entre les moyenne du poids des oreilles (D-G) pour le lot essai (HE ou Contrôles +).

II.2.3.3 Etude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne du Poids de l'Oreille Droite (POD) \pm Ecart-Moyen. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivi par le test *post-hoc* de Fisher LSD pour comparaison par paires. Une $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2014 (Addinsoft, Paris, France).

II.2.3.4. Etude anatomopathologique au niveau des oreilles

Afin de confirmer l'activité anti-inflammatoire topique de menthe poivrée à l'échelle cellulaire, des coupes histopathologiques ont été réalisées sur des pièces circulaires des oreilles droites et gauches coupées précédemment. La coloration effectuée était celle de Hématoxyline-Eosine (H-E) selon la procédure de **Martoja et Martoja-Pierson (1967)**. Le protocole est détaillé en **Annexe 1**.

Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de (0.4 μ m). L'observation a été accomplie par microscopie photonique aux grossissements x4, x10 et x40.

II.2.4 Evaluation du pouvoir analgésique périphérique

II.2.4.1 Principe

Le test de torsion a été utilisé dans le but de confirmer le pouvoir analgésique périphérique de l'HE de menthe poivrée et à travers son efficacité dans la réduction des contractions abdominales chez les souris (**Soro et al., 2009**). Ce test consiste à réduire, par des substances antalgiques, la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion.

Mode opératoire :

La méthodologie adoptée consiste à répartir les animaux de laboratoire d'une façon aléatoire en 3 lots de cinq souris chacun à savoir :

- Un lot Contrôle - qui recevra par voie orale de l'eau physiologique (NaCl, 0.9%) à raison de 0.5 mL;
- Un lot Contrôle +, recevra par la même voie une quantité de 57.5 mg/kg d'une solution d'un médicament antispasmodique: Debridat® (Trémebutine; comprimé pelliculé, Pfizer, France).
- Un lot Essai où les souris reçoivent une quantité de 0.5 ml d'HE (dilution à 0,1%).

Après un temps de 30 minutes de l'administration des différents traitements cités précédemment, une injection par voie intra-péritonéale de 0.2 ml d'une solution à 3% d'acide acétique a été réalisée pour chaque souris ce qui est à l'origine de spasmes abdominaux. La douleur se caractérise par des mouvements de torsion de la musculature dorso-abdominale. Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons comptés, pour chaque souris, le nombre de torsions pour les dix minutes suivantes. L'activité antispasmodique est exprimée par le pourcentage de réduction des spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de la douleur} = \frac{(T-) - E}{(T-)} \times 100$$

T- : Moyenne des spasmes dans le Contrôle - ; E : Moyenne des spasmes dans les autres lots.

II.2.4.2. Etude statistique

La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'ANOVA suivie par le test de Fisher pour comparaison par paires. Une $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2014 (Addinsoft, Paris, France) (**Annexe 2**).

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Détermination de la composition chimique d'HE

L'huile essentielle de *Mentha piperita*, obtenue à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau sous pression, a été analysée par CG-SM sur une colonne capillaire apolaire DB-5 (**Figure V.1**) pour une identification plus exhaustive des composés aromatiques. Les conditions opératoires sont détaillées dans la partie méthode. Le **Tableau 4** donne, dans l'ordre d'élution, les compositions, qualitative et quantitative, de l'essence de menthe poivrée distillée et regroupées selon leur ordre d'élution. Au total, dix neuf (19) composés ont été détectés. Pour l'identification, nous avons d'abord calculé leurs IR ; ensuite nous les avons comparés à ceux de la littérature. Nous avons, par la suite, procédé au dépouillement de leurs spectres de masse en se référant à ceux donnés dans les librairies.

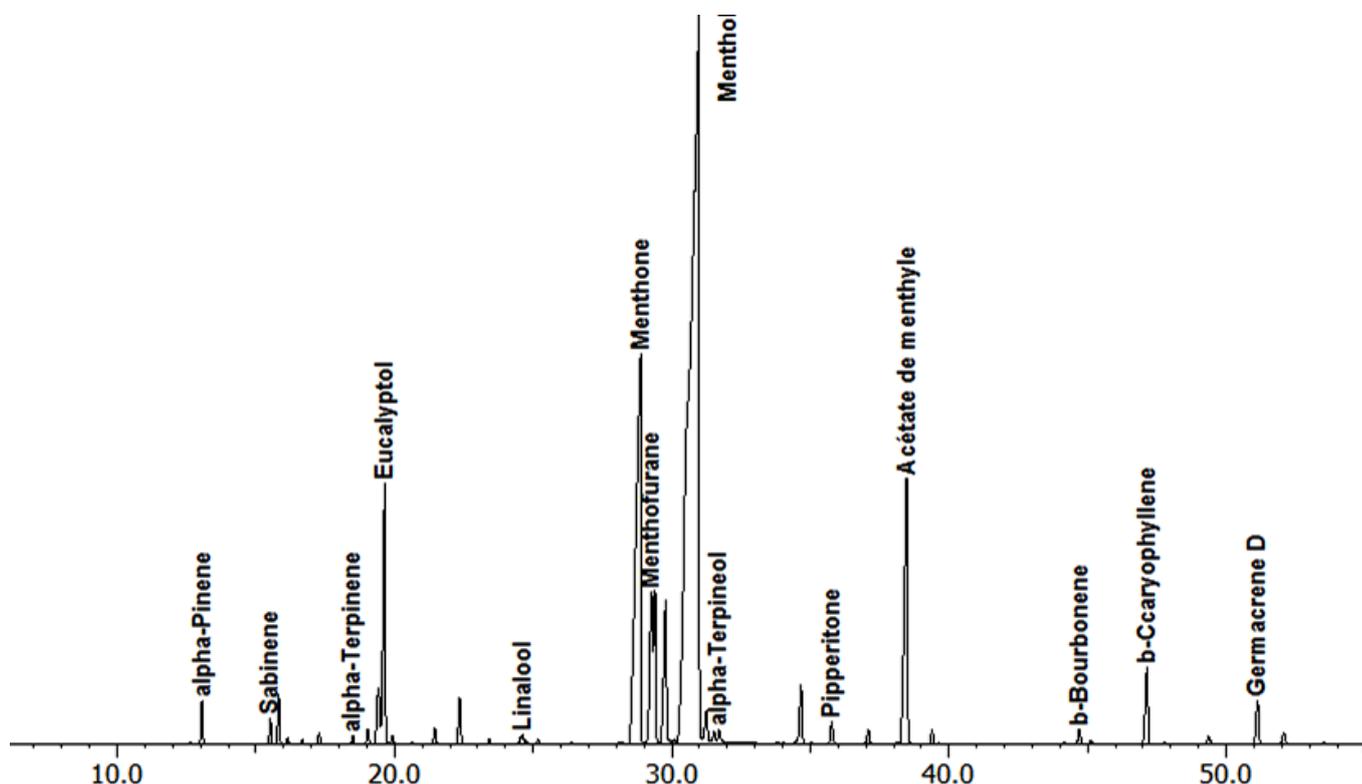


Figure 6. Profil chromatographique de l'essence aromatique de *Mentha piperita*.

A la lecture des résultats consignés dans le **tableau 4**, il apparaît clairement que le menthol apparaît comme le composé majoritaire de l'essence de la menthe poivrée avec un taux de 51.2%, suivi par une cétone monoterpénique (menthone) avec 20.4%, l'acétate de méthyle (6.8%), isomenthone (5.5%) et le 1.8 cinéol (encore appelé eucalyptol) (4.7%) (voir la structure chimique dans l'annexe 2). Les autres composés ont été listés avec un taux inférieur à 4%. D'un point de vue biochimique,

la famille des monoterpènes oxygénés, représentée par les alcools et leurs cétones et esters, est la plus abondante avec un taux supérieur à 90%.

Tableau 4. Composition chimique de l'HE de *Mentha piperita*.

n°	Nom	Quantité (%)
1	α -pinène	0.3
2	Sabinène	0.5
3	β -Pinène	0.5
4	α -Terpinène	0.3
5	<i>p</i> -Cymène	0.5
6	Limonène	1.1
7	Eucalyptol	4.7
8	γ -Terpinène	0.3
9	Linalool	0.2
10	Menthone	20.4
11	Menthofurane	1.8
12	Isomenthone	5.5
13	Menthol	51.2
14	α -Terpinéol	1.3
15	Pipéritone	0.4
16	Acétate de menthyle	6.8
17	β -Bourbonène	0.6
18	β -Caryophyllène	1.2
19	Germacrène D	1.4
Composés oxygénés		92.3
Composés hydrocarbonés		6.7

A la lecture des résultats comparatifs rapportés dans la littérature, il apparaît que *Mentha piperita* a été étudiée dans différents pays (Inde, Brésil, Algérie, Egypte, Arabie Saoudite, Iran et Chine) avec des résultats variables (Sun *et al.*, 2014 ; Samber *et al.*, 2015 ; De Sousa Barros *et al.*, 2015 ; De Oliveira Hashimoto *et al.*, 2016 ; Abdel-Hameed *et al.*, 2018 ; Peigi *et al.*, 2018 ; Hendawy *et al.*, 2018 ; Benabdallah *et al.*, 2018).

Tableau 5. Etudes comparatives des constituants de l'essence de la menthe poivrée provenant d'écosystèmes différents.

Equipes	Notre étude	Samber	de Sousa Barros	De Oliveira Hashimoto	Abdel-Hameed			Beigi			Hendawy		Benabdallah
Année	2018	2015	2015	2016	2018			2018			2018		2018
Pays	Algérie	Inde	Brésil	brésil	Arabie Saoudite			Iran			Egypte		Algérie
Composés	%				HD	SFME	MWHD	Fraiche	Séché air	Séché MW	El-Sharkia	Ismailia	El-Tarf
α -pinène	0.59	0.2		0.8	0.98	0.96	0.66	0.4	1.2	0.1	0.4	0.5	2.1
Sabinène	0.39			0.4	0.90	0.94	0.69	0.4	0.9	0.1	0.1	0.3	
β -Pinène	0.76	0.1		1.3				0.7	1.6	0.3	1.1	0.9	1.6
α -Terpinène	0.14				0.00	0.06	0.07	0.1	0.4	0.2	0.2	0.2	
p -Cymène	0.26			0.1				0.1	0.3		0.3	0.1	
Limonène	1.48	3.3		3.5	9.92	10.4	8.08	1.9	2.6	0.8	1	0.8	3
Eucalyptol	4.74	5.2		2.1	5.03	5.33	4.02	5.8	8.2	2.1	4.4	5.4	6.7
γ -Terpinène	0.26			0.1				0.2	0.6	0.3	0.5	0.4	
Terpinolène	0.08			0.1				0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	
Linalool	0.28	0.1	25.4	0.1				0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	
Menthone	16.41	9.1	3.7	11	0.01	0.04	0.01	15.4	13	9.2	9.5	46	20.4
Menthofurane	3.85		4.0	22.5				10.3	11.9	1.1	7.7	9	
Isomenthone	2.17	5.3		0.2	0.08	0.13	0.16						7.3
neo-isomenthol	3.39	5.4						2.4	3.7	8.1	0.5	0.2	
Menthol	53.29	34.8	2.7	27.5				44.4	35	46.2	22.2	20.1	49.9
α -Terpinéol	0.19	0.2	0.9		0.48	0.52	0.39				0.5	0.3	
cis-Isopulégone	1.16	0.9		12.8	0.16	0.16	0.14						0.4
Pipéritone	0.45	0.2		0.6				0.4	0.4	0.7	0.2		
Acétate menthyle	6.82	1.7	1.2	12.5				4.8	8.7	9.8	11.7	2.5	
β -Bourbonène	0.31							0.1	0.2	0.3	0.8	0.2	
β -Caryophyllène	1.73		1.0	0.5	0.73	0.90	0.96	0.8	1.5	2.2	5.4	1.9	
Germacrène D	0.99		1.5		0.69	0.75	0.95	1	1.7	2.5	1.7	1.3	
γ -Elemène	0.26												
Carvone		19.5			70.26	67.9	72.6				7.8	0.1	
Acétate de linalyle			51.3										

(MW : Microwave ; HD : Hydrodistillation ; SFME : Solvent Free Microwave Extraction; MWHD :Microwave Hydrodistillation)

L'influence des facteurs climatiques semble plus grande chez les espèces dont les structures de stockage se trouvent à la surface du végétal, comme par exemple les poils sécréteurs des Lamiaceae. La qualité de l'essence sera plus constante si elle se trouve dans des tissus plus profonds (Bruneton, 2009). L'origine géographique de l'espèce joue aussi sur sa sensibilité aux facteurs climatiques. Les plantes tropicales sont surtout soumises à l'alternance des saisons sèches et humides, les plantes de régions tempérées seront plus sensibles à la longueur des jours (Baser et Buchbauer, 2009).

Ainsi, il existe de nombreux exemples de plantes dont la sensibilité à la lumière du jour a été étudiée. Chez la menthe poivrée, Les jours longs et les nuits tempérées augmentent le rendement en HE, celle-ci étant alors plus riche en menthofurane. Dans des conditions inverses, l'essence s'enrichie en menthol (Bruneton, 2009).

L'effet des agressions extérieures sur le développement des plantes et leur production d'essence a été identifié depuis longtemps. En effet, Charabot et Gatin ont décrit en 1908 dans le parfum chez la plante les conséquences du parasitisme par un acarien dans les champs de menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) des environs de Grasse (Alpes-Maritimes, France). Ils y détaillent les transformations morphologiques des plants touchés mais également les conséquences sur l'essence. Celle-ci y est plus abondante mais décrite comme de moindre qualité. Chez les plantes touchées, l'essence est enrichie en éther mais les cétones (menthone) n'y sont plus qu'à l'état de traces, lorsqu'elles sont détectables.

III.2. Pouvoir antimicrobien d'HE *in vitro*

III.2.1. Activité antimicrobienne en aromatoigramme

Le screening antibactérien et antifongique de l'essence aromatique de *Mentha piperita* a été réalisé, *in vitro*, sur plusieurs souches microbiennes isolées cliniquement.

Les résultats de cette étude antimicrobienne sont rapportés dans les Tableaux 6 et 7.

A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul du diamètre de la zone d'inhibition.

Tableau 6. Screening antibactérien de l'essence de menthe poivrée *in vitro*.

Souches	Origine	Aromatoigramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)		
		Quantité Huile Essentielle (µL/disque)					
		10	20	30	10	20	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	UPD	37.5	46	nd	35	70.5	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	ECBU	13	17	15	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Alimentaire	-	18	42	-	-	-
<i>Pantoea</i> sp.	UPD	14.5	19.5	nd	-	-	nd
<i>Proteus penneri</i>	UPD	16	17	nd	29	48	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UPD	-	-	nd	-	-	nd

ECBU: Examen Cytobactériologique des Urines ; UPD : Ulcères du Pied Diabétique ;

nd: non déterminé ; (-) : Aucune zone d'inhibition.

A la lecture des résultats obtenus, il apparaît clairement que les souches à Gram+ sont les plus sensibles à l'action inhibitrice de la phase liquide de l'HE (**Figure III.3**) avec des Diamètres de Zone d'Inhibition (DZI) variant entre 13 et 37.5 mm pour les espèces pathogènes du genre *Staphylococcus* à la dose de 10µl/disque. Cette inhibition est « dose-dépendante » pour certains isolats (bactéries Gram -) avec des DZI oscillant entre 14.5 et 16 mm pour une quantité en HE de 10 µL/ disque et entre 17 et 19.5 mm pour 20 µL/disque. Par ailleurs, la souche *Pseudomonas aeruginosa* demeure l'espèce la plus résistante et ce pour toutes les quantités utilisées en HE.



Figure 7. Diamètres des Zones d'Inhibition liés au pouvoir antibactérien de l'HE de menthe poivrée sur quelques espèces bactériennes.

Dans le même sillage, nous avons remarqué qu'il existe une certaine différence de sensibilité entre les bactéries Gram+ et Gram-. Ceci est en totale adéquation avec les travaux de **Gilles et al., 2010**.

Ces derniers 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. L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (ATB, métaux lourds, HE). La résistance des bactéries Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules à franchir la membrane externe (**Burt, 2004**).

Les résultats d'essais *in vitro* tendent à confirmer ces usages traditionnels. L'HE de menthe aurait en effet une action antibactérienne marquée sur plusieurs souches de micro-organismes infectieux, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (**Mimica-Dukic et al., 2003 ; Betoni et al., 2006**).

D'autres études scientifiques ont confirmé que l'huile de menthe poivrée est douée de nombreux effets antiviraux, antibactériens et antimycosiques, c'est pourquoi elle est utilisée dans tant de traitements alternatifs, donc il semble apparaître que nos résultats correspondent aux résultats de ces dernières. et qu'elle est composée de camphre, de menthol et de carvacrol, qui sont doués d'un effet inhibiteur sur

la croissance de certaines souches bactériennes dangereuses comme *E. coli*, salmonelles et infections liées aux staphylocoques. Cependant, le mécanisme d'action demeure non élucidé (**Mohsenzadeh, 2007**).

Une équipe de recherche en médecine complémentaire et traditionnelle a enquêté sur les effets cliniques des HE aromatiques chez les patients atteints d'affections des voies respiratoires supérieures. L'étude a porté sur une cohorte de 60 patients. Une solution en spray comportant de l'essence de menthe poivrée leur a été administrée. Il a été conclu que l'application du spray a apporté une amélioration immédiate et significative des symptômes d'affections des voies respiratoires supérieures (**Ben-Arye et al., 2011**).

Concernant les souches fongiques, l'activité antimicrobienne est plus marquée pour les espèces levuriformes avec des DZI qui s'échelonnent entre 13 et 85 mm en appliquant une quantité de 10 µL/disque d'HE. En outre, une inhibition totale (>85 mm) a été constatée pour la souche *Rhodotorula* sp. et ce qu'elle que soit la dose utilisée. Le germe *Candida albicans*, un pathogène opportuniste incriminé dans les mycoses superficielles, a aussi manifesté une grande sensibilité au pouvoir inhibiteur de l'HE avec un DZI de l'ordre de 81 mm à forte concentration en HE qui égale à 30 µL/disque.

Tableau 7. Screening antifongique de l'essence de menthe poivrée *in vitro*.

	Huile essentielle de menthe poivrée						Contrôle positif		
	Quantité d'huile essentielle (µL/disque)								
	Aromatogramme (DZI, mm)			Microatmosphère (DZI, mm)			Quantité d'Héxoméline (µL/disque)		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30
Souches levuriformes									
<i>Candida albicans</i>	13	19.5	81	16	31	11	14	15	18
<i>Candida tropicalis</i>	17	32	42	3.5	13	71	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	13.5	19	21.5	-	17	63	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25	30	40	11	19	39	12	-	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	85	85	85	85	85	85	33	38	40
Souches mycéliennes									
<i>Aspergillus niger</i>	-	12.5	16	-	-	-	13	17	21
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	14.5	-	-	-	-	-	-

(-) Aucune zone d'inhibition ; DZI : Diamètre des Zones d'Inhibition en mm.

Dans la majorité des espèces, une inhibition « dose-dépendante » a été constatée pour tous les isolats fongiques levuriformes. En outre, l'étude comparative menée avec le contrôle positif (antiseptique

local transcutané utilisé comme traitement d'appoint pour les infections de la peau et des ongles) a permis de confirmer l'efficacité de cette HE dans l'inhibition de la croissance fongique, en comparaison avec l'Hexomedine où les DZI notés étaient inférieurs et ne dépassant pas, dans les meilleurs des cas, 12 mm pour *Saccharomyces cerevisiae* et 18 mm pour *Candida albicans*. De plus, il a été remarqué que l'antiseptique serait sans effet fongistatique sur les levures *Candida tropicalis* et *Candida glabrata*.

Par contre et concernant les champignons filamenteux, des résultats moins importantes ont été obtenus, en comparaison avec les espèces levuriformes. Les DZI enregistrés en aromagramme varient entre 12.5 et 16 mm pour *Aspergillus niger*, et de l'ordre de 14.5 mm pour *A. flavus*.

Nos résultats, très encourageants, laissent entrevoir des possibilités d'une éventuelle utilisation de la fraction aromatique de cette menthe comme alternative aux antifongiques de synthèse, non dénués de nombreux effets indésirables.

Les propriétés antimycosiques de l'huile de menthe poivrée sont bien étudiées et il existe des recherches significatives qui montrent que cette essence, lorsqu'elle est topiquement appliquée, peut réduire les risques d'infections des ongles fongiques (Shin, 2004), qui touchent beaucoup de personnes dans le monde entier.

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique des métabolites terpéniques des menthes poivrées. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs. Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances terpéniques 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 (Tyagi et Malik, 2010).

III.2.2. Activité antimicrobienne en microatmosphère

En microatmosphère et en utilisant une quantité de 10 µL/disque, uniquement le *Staphylococcus aureus* isolé d'un prélèvement purulent (ulcère du pied diabétique) et *Proteus penneri* qui ont manifesté une certaine sensibilité à l'action bactériostatique de la phase vapeur de l'HE de menthe poivrée. Les DZI obtenus varient entre 29 et 35 mm pour la dose 10 µL/disque, et entre 48 et 70.5 mm pour la dose de 20 µL/disque. Toujours dans le même sillage qu'en aromagramme, *P. aeruginosa* a manifesté une résistance totale pour toutes les doses utilisées.

En phase vapeur et en conformité avec les résultats obtenus en aromagramme, c'est toujours la levure *Rhodotorula* sp. qui a manifesté une plus grande sensibilité au pouvoir inhibiteur des vapeurs avec une inhibition totale (>85 mm) et ce pour toutes les doses utilisées. Les isolats *Candida tropicalis* et *C. glabrata* ont aussi été fortement inhibés mais uniquement à forte dose avec des DZI qui oscillent entre 63 et 71 mm. Au contraire et pour ce qui est des espèces filamenteuses (*Aspergillus niger* et *A. flavus*), aucune inhibition n'a été constatée.

Il semble que les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour l'utilisation de l'essence de la menthe poivrée comme principe actif dans des préparations galéniques à visée thérapeutique, ou pour lutter contre les candidoses. Ces résultats obtenus *in vitro* sont très encourageants pour une éventuelle application *in vivo*.

III.2.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

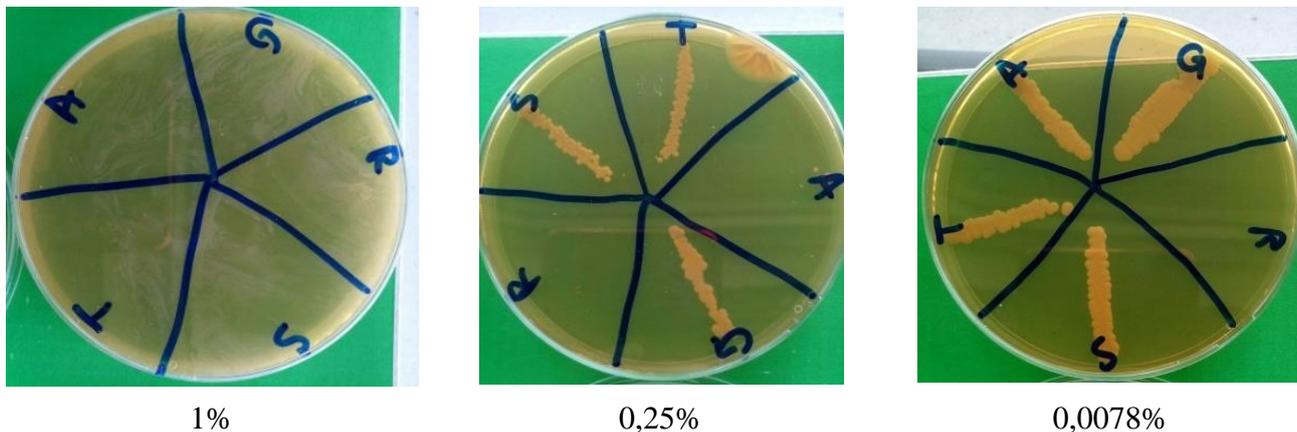
La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les germes levuriformes ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action antimicrobienne de l'HE. La gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varie entre 1% à 0.0078%. Les résultats de cette analyse sont rapportés dans le **Tableau V.5**. En revanche, les moisissures, bien qu'elles soient sensibles n'ont pas été étudiées car nécessitant une approche méthodologique totalement différente du fait de leur croissance lente et de la nature de la colonie mycélienne (tapis fortement fixé au milieu gélosé) d'où l'impossibilité de le retirer en bonne forme. *Rhodotorula* sp. demeure le germe le plus sensible avec une CMI la plus faible (0.0078%) (**Figure V.4**), suivi par d'autres levures, à l'exemple de *C. albicans* (0.25%). La sensibilité de *S. cerevisiae*, une levure impliquée dans les contaminations et l'altération de la qualité marchande des denrées alimentaires, en particulier les produits sucrés, laisse entrevoir une possibilité d'utilisation de cette fraction aromatique dans la préservation naturelle des aliments et des boissons sucrées.

Tableau 8. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) pour différentes souches microbiennes.

CMI (%) Levures	
<i>Candida albicans</i>	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	0.5
<i>Candida glabrata</i>	0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.5
<i>Rhodotorula</i> sp.	0.0078

La comparaison de l'efficacité des extraits aromatiques à travers les différentes publications, reste difficile à établir. Cette difficulté réside dans le fait que les paramètres expérimentaux (méthodes employées, conditions physiologiques des germes, dose utilisée) diffèrent entre les études.

Certaines critiques ont été soulevées concernant l'interaction entre les agents émulsifiants et les constituants des HE. L'utilisation de ces agents tensio-actifs n'a pas résolu le problème : on sait en effet qu'ils interfèrent avec l'activité antimicrobienne des dérivés terpéniques, au point d'être communément cités comme neutralisants dans les essais biocides (**Delespaul et al., 2000**).



1%

0,25%

0,0078%

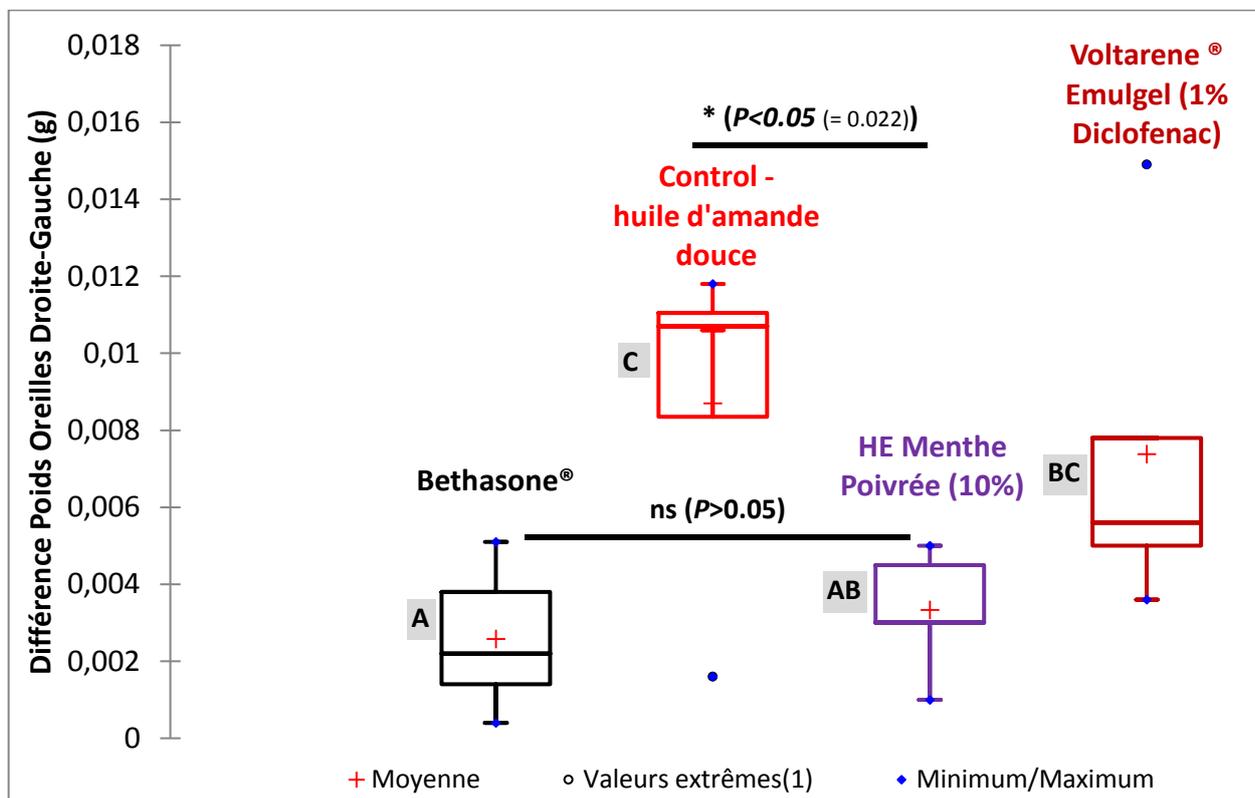
A) *C. albicans* ; G) *C. glabrata* ; T) *C. tropicalis* ; R) *Rhodotorula* sp. ; S) *S. cerevisiae*

Figure 8. Résultats de détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (%) des levures pour quelques dilutions gélosées .

La plupart des méthodes microbiologiques utilisées ont été critiquées par plusieurs auteurs. Ces critiques ont été basées sur la discordance observée dans les résultats obtenus concernant l'étude de la zone d'inhibition et l'étude de l'inhibition de la croissance à différentes concentrations d'HE. Les notions de CMI et CMB ne sont pas définies de façon précise et universelle et plusieurs auteurs ont exprimé les résultats avec différentes unités. Ces concentrations peuvent être exprimées en $\mu\text{g/mL}$ (Oussou *et al.*, 2008), en $\mu\text{L/mL}$ (De Billerbeck *et al.*, 2002) ou en % (v/v) (Hammer *et al.*, 1999), ce qui rend la comparaison des résultats entre eux difficile.

III.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique

En premier temps, l'activité anti-inflammatoire de l'essence de la menthe poivrée a été effectuée, *in vivo*, par la méthode de l'œdème des oreilles induit par le xylène. Les résultats de ce screening anti-inflammatoire, à travers la mesure de la Différence du Poids des Oreilles (DPO) (droite-gauche), sont présentés dans la **Figure III.5**.



HE : Huile essentielle ; AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien (Voltarène Emulgel® 1%) ; Contrôle – (huile d’amande douce) ; ns : différence non significative ($P>0.05$) au test ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Fisher ; * Différence significative ($P<0.05$).
 Les lettres **alphabétiques identiques signifient qu’il n’y a pas de différence significative au risque de 5% avec le test ANOVA à sens unique suivie par un test de Fisher LSD *post-hoc* multi-comparaison.**

Figure 9. Pouvoir anti-inflammatoire topique de l’essence de menthe poivrée, en comparaison avec les médicaments de synthèse.

Les résultats de l’activité anti-inflammatoire montrent les variations des poids des oreilles des différents essais (AIS, AINS et HE), en comparaison avec le contrôle négatif. Le lot traité avec l’AIS (Bétasone®) est celui qui a présenté un pourcentage de réduction de l’œdème le plus important avec un taux de 70.34%, suivi par celui qui a reçu l’HE où la réduction était de 61.68%. De plus, aucune différence ($P>0.05$) sur le plan statistique, au test de Fisher de comparaison par paires, n’a été enregistrée entre ces deux traitements ce qui suggère l’efficacité de l’HE dans la réduction de l’œdème, en comparaison avec un traitement conventionnel. En dernier, c’est le lot traité par AINS (Voltarène Emulgel® 1%) qui a donné un faible taux de réduction d’œdème (15.17%).

En outre et concernant la différence du poids des oreilles, c’est toujours les lots traités avec AIS et HE qui ont présenté une DPO la plus faible, de l’ordre de 2.58 mg et 3.33 mg, respectivement. De plus, aucune différence significative ($P<0.05$) sur le plan statistique n’a été signalée entre ces deux traitements.

La Commission Européenne, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) approuvent l'usage de la Menthe poivrée par voie externe pour soulager non seulement les maux de tête et le rhume, mais également certaines irritations cutanées et les douleurs musculaires, névralgiques ou rhumatismales. Le menthol présent en fortes concentrations dans l'HE de menthe poivrée excite les récepteurs du froid et simule un refroidissement par une action au niveau des canaux calciques ("effet glaçon" par baisse de 2 à 4 °C de la température cutanée), d'où un effet antalgique en usage topique pour réduire les douleurs soulagées par le froid, qu'elles soient aiguës ou inflammatoires (**Liu et al., 2013**).

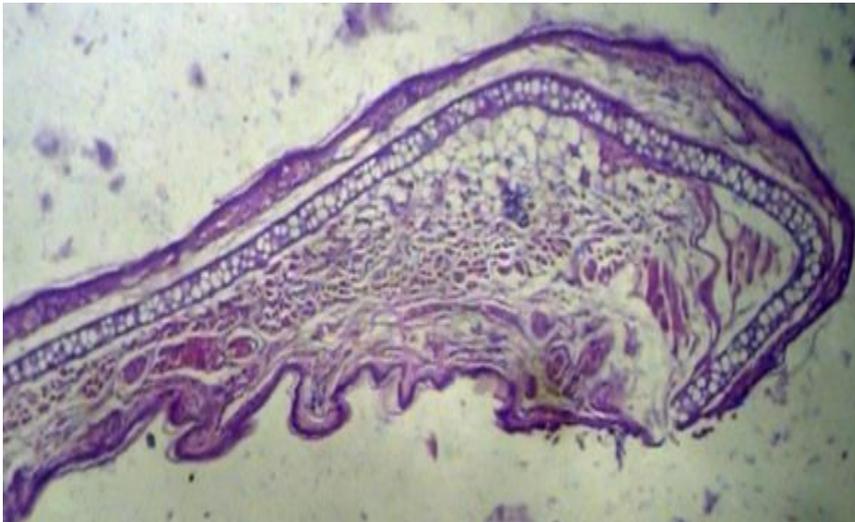
Les propriétés thérapeutiques des HE s'expliquent par la présence de composés actifs à l'origine présents dans les plantes fleuries de *Mentha piperita*. La présence de menthol, de menthone et de pipéritone fait de l'huile de menthe poivrée un anti-inflammatoire vaso-constricteur nasal puissant, intéressant les rhinites productives ou les sinusites (**Kamatou et al., 2013 ; de Cássia da Silveira et al., 2013**).

III .3.1 Etude histopathologique

A fin de confirmer, à l'échelle cellulaire, l'activité anti-inflammatoire topique de l'essence aromatique de menthe poivrée, des coupes histologiques ont été réalisées au niveau des oreilles droites de toutes les souris par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine, en comparaison avec le contrôle négatif non traité. Les observations faites par microscope photonique sont rapportées dans la **Figure III.6**.

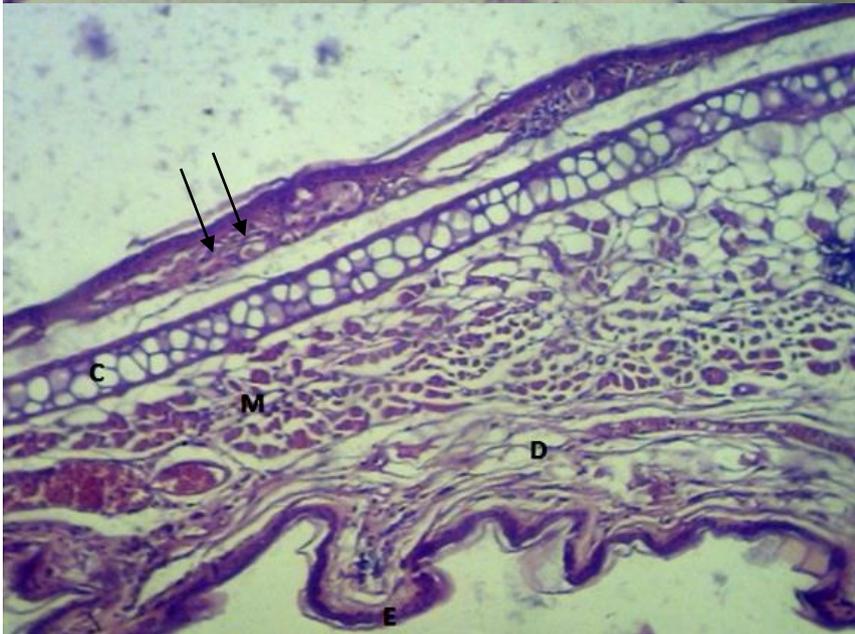
Dans une étude (**De Sousa et al., 2010**), l'huile de menthe poivrée s'est avérée être antispasmodique et anti-inflammatoire naturel et son utilisation calme considérablement l'inflammation de la trachée et la toux chez les rats. Évidemment, plus d'études sur des sujets humains doivent être faites, mais l'huile de menthe a été une part utilisée fréquemment dans la médecine non-conventionnelle depuis des générations et est très respectée pour son utilisation dans le soulagement des troubles respiratoires.

En usage local, en application topique ou cutanée, mais également en inhalation, l'HE de menthe poivrée ou les médicaments à base de cette plante sont utilisés en cas de prurit, comme adoucissant et comme protecteur, mais aussi en cas de nez bouché et de rhume. Ils sont également utilisés pour améliorer l'hygiène buccale. En outre, antalgique, la menthe poivrée aide beaucoup à alléger les affections buccales ou pharyngées, comme l'aphte et soulager les maux de tête, les migraines et la sinusite. On l'utilise également pour réduire les démangeaisons cutanées (**Shah et Mello, 2004**).



Oreille droite n° 3 (x4)

Absence d'inflammation dans l'oreille OD4 et un infiltrat minime qui veut dire une très légère inflammation pour l'oreille OD3



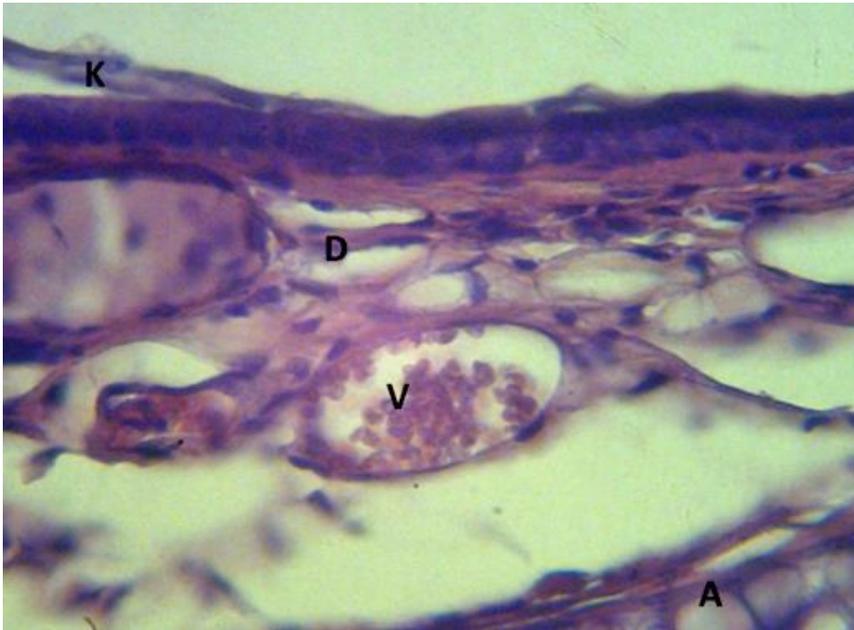
Oreille droite n° 3 (x10)

Eléments inflammatoires ±



Oreille droite n° 3 (x40)

Siège d'un discret infiltrat inflammatoire lympho-plasmocytaire



Oreille droite n° 4 (x40)



Oreille gauche (x10)



Oreille gauche (x40)

Tissu conjonctif + quelques éléments inflammatoires au niveau du derme



Oreille gauche (x40)

Epiderme (épithélium malpighien pluristratifié) avec présence, au niveau du derme, d'un tissu conjonctif richement vascularisé et quelques éléments inflammatoires.

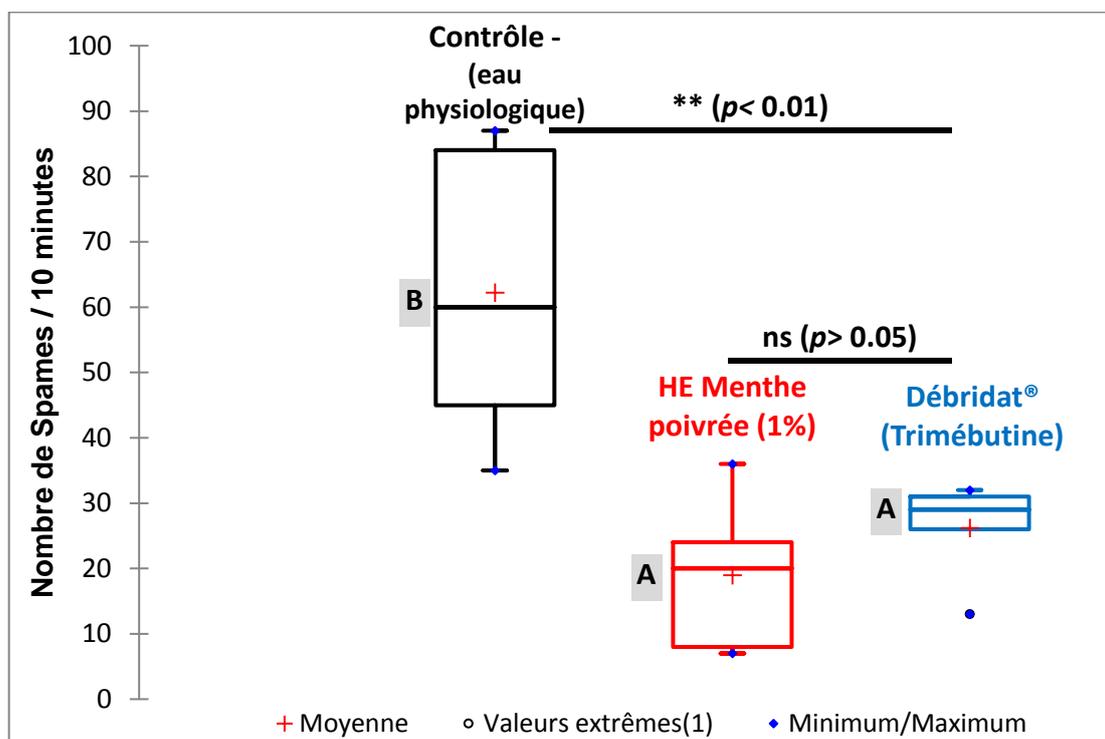
K) Kératine ; E) Epiderme ; D) Derme ; C) Cartilage ; V) Vaisseau ; M) muscle ; In) Inflammation
 →) La migration des neutrophiles.

Figure 10. Aspects histopathologiques (coloration Hématoxyline-Eosine) des pièces cutanées auriculaires des souris soumises au test d'œdème topique induit par le xylène.

III.4 Activité analgésique périphérique *in vivo*

L'activité analgésique périphérique de l'HE de menthe poivrée a été évaluée par le dénombrement des spasmes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intra-péritonéale de l'acide acétique (3%). Les résultats de cette étude sont illustrés dans la **Figure III.7**.

L'étude de l'activité antispasmodique de l'HE de menthe poivrée, appelée encore activité analgésique périphérique, a été évaluée *in vivo* sur des souris albinos. L'HE a été administrée par gavage, en comparaison avec un antispasmodique musculotrope de référence : Débridat® (Trimébutine, 100 mg). L'activité antispasmodique a été exprimée par le nombre de contractions en dix minutes. Le pourcentage de diminution des contractions pour chaque lot a été calculé par la formule citée précédemment (section Matériel et Méthodes).



HE : Huile essentielle ; Contrôle – (Eau physiologique); ns : différence non significative ($p > 0.05$) au test ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Fisher ; ** Différence Hautement Significative ($p < 0.01$). Les lettres alphabétiques identiques signifient qu'il n'y a pas de différence significative au risque de 5% avec le test ANOVA à sens unique suivie par un test de Fisher LSD *post-hoc* multi-comparaison.

Figure 11. Pouvoir analgésique périphérique de l'essence aromatique de menthe poivrée *in vivo*, en comparaison avec un médicaments antispasmodique .

D'après les résultats obtenus, il apparaît que le lot traité avec la menthe poivrée est celui qui a présenté le nombre de contractions le plus faible (19 spasmes en moyenne pendant 10 minutes), statistiquement non significative ($p > 0.05$) en comparaison avec le contrôle positif où le nombre moyen de spasme était égal à 26.2. En revanche, la moyenne des spasmes, enregistrée pour les souris appartenant au lot contrôle négatif, était la plus élevée (62.2) avec une différence statistiquement significative ($p < 0.01$) en comparaison avec ceux des autres lots (HE et Contrôle +).

Par ailleurs, le calcul du taux de réduction de la douleur était plus élevé pour le lot traité avec l'HE (69.45%) en comparaison avec le médicament antispasmodique (57.87%).

L'huile de menthe poivrée peut être utilisée par voie externe pour offrir un soulagement aux douleurs. On estime que la présence d'antagonisme de calcium dans huile de menthe poivrée aide à éliminer la douleur sur les parties où elle est appliquée.

Le menthol confère à l'huile de menthe poivrée un fort pouvoir antalgique. Ce pouvoir émane d'une vasoconstriction sous-cutanée intense, rapidement perceptible par la sensation rafraîchissante, astringente et anesthésiante de la peau qu'elle induit, en cas d'application locale (McKay et Blumberg, 2006).

Un certain nombre d'études ont aussi montré l'efficacité de la menthe poivrée pour être un remède important du syndrome du côlon irritable (**Pittler et Ernst, 1998**) qui affecte des millions de personnes chaque année. Il se caractérise par une douleur ou un inconfort abdominal sans qu'une autre maladie n'ait été diagnostiquée. Des recherches plus approfondies doivent toujours être faites pour savoir comment l'huile agit, mais plusieurs études ont bien validé ses effets.

Une méta-analyse analysant 16 études dont 11 randomisées et six *versus* placebo conclut qu'administrée sous forme gastro-résistante, l'HE de menthe poivrée permet de manière sûre et efficace de réduire les douleurs des patients atteints du syndrome du côlon irritable (**May et Kuntz, 1996**).

Les chercheurs ont mené 5 essais cliniques auprès de 484 patients souffrant de dyspepsie fonctionnelle (non ulcéreuse) afin de tester l'efficacité de l'essence aromatique de menthe poivrée associée à celle du carvi. Dans l'ensemble, les résultats indiquent qu'une telle préparation peut soulager les douleurs abdominales chez environ 95 % des patients traités et qu'elle procure des effets comparables à la Cisapride, un médicament classique utilisé pour traiter ces troubles digestifs (**Barnick et Cardozo, 1990 ; May et Kuntz, 1996 ; Madisch et Heydenreich, 1999 ; Freise et Kohler, 1999 ; May et al., 2000**).

En 2005, un premier bilan des essais cliniques a conclu que l'HE de menthe poivrée (180 mg à 200 mg par jour) donnait des résultats probants. Il s'agissait d'une méta-analyse répertoriant neuf études cliniques et démontrant sa capacité de réduire les spasmes intestinaux (**Grigoleit et Grigolei, 2005**), d'où l'intérêt d'une prémédication avec de l'HE de menthe poivrée avant une coloscopie par exemple (**Shavakhi et al., 2012**). Il a ensuite été confirmé par une méta-analyse, publiée en 2008, dans laquelle les auteurs soulignaient que l'HE était efficace pour soulager les symptômes du syndrome de l'intestin irritable et moins chère que les médicaments antispasmodiques (**Ford et Talley, 2008**).

Au cours des années 1980, des cliniciens ont pensé mettre à profit les propriétés antispasmodiques de la menthe poivrée pour soigner les douleurs des patients atteints du syndrome de l'intestin irritable (SII). Afin de s'assurer que l'essence aromatique de menthe poivrée puisse atteindre l'intestin, ils ont utilisé des comprimés ou des capsules dotés d'un enrobage résistant aux acides de l'estomac (entéro-soluble) (**Liu et Chen, 1997**).

Plusieurs essais effectués, en majorité au Japon, démontrent que l'huile aromatique de menthe poivrée réduit les spasmes des intestins causés par des interventions comme le coloscopie ou fibroscopie abdominale (**Hiki et al., 2003 ; Mizuno et al., 2006 ; Yamamoto et al., 2006**). Certains de ces essais indiquent qu'elle peut être aussi ou même plus efficace qu'un antispasmodique classique administré par injection (**Asao et al., 2003 ; Yamamoto et al., 2006**).

L'Agence Européenne du Médicament (**EMA, 2015**) et la Coopération Scientifique Européenne (**ANSM, 2015**) considère comme « médicalement bien établi » l'usage de l'HE de menthe

poivrée pour « soulager les flatulences et les douleurs abdominales notamment lors d'intestin irritable ». Elle recommande d'en réserver l'usage aux adultes et aux enfants de plus de huit ans.

L'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS, 2015**) reconnaît que l'utilisation de l'HE de menthe poivrée est « scientifiquement établie dans le traitement du syndrome du côlon irritable, et dans les affections digestives comme les flatulences et les gastrites ; par voie externe, l'huile essentielle est efficace contre les douleurs musculaires et les maux de tête ». Les feuilles de menthe poivrée sont « traditionnellement utilisées dans le traitement symptomatique des troubles digestifs, des flatulences et des coliques intestinales ».

La menthe poivrée est un antidouleur et un anti-inflammatoire efficace contre toutes douleurs notamment articulaires comme l'arthrite, l'arthrose, l'entorse, la sciatique, la hernie discale ou la tendinite. Elle est aussi efficace contre les douleurs rhumatismales, les douleurs musculaires type déchirure musculaire et courbature mais également contre la céphalée ou la névralgie qui se déclarent après ou pendant un effort ou alors en fin de journée (**Shah et Mello, 2004**).

La riche composition de l'huile de menthe poivrée (menthol, menthone, acétate de menthyle, pipéritone) procure un effet parasympatholytique léger avec une diminution notable des spasmes et une stimulation des sécrétions digestives (**Galeotti et al., 2002 ; Shah et Mello, 2004**).

Le menthol présent dans l'huile de menthe poivrée est responsable de son action de soulagement de la douleur. Il empêche l'activation ou l'excitation des neurones (cellules nerveuses cérébrales) en réponse à la douleur. Les canaux ioniques sont ces passerelles chimiques qui s'ouvrent ou se ferment en réponse aux ions chimiques qui y circulent. Ces passerelles présentes dans les cellules nerveuses régulent la transmission de la douleur. Le menthol procure une sensation de refroidissement et une action analgésique en activant le canal ionique, en régulant le système opioïde endogène (notre système naturel de soulagement de la douleur) et en soulageant la douleur nerveuse (modèle animal) (**Galeotti et al., 2002**).

CONCLUSION

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

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes en parfumeries, en industrie cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine alternative. En aromathérapie scientifique, il s'agit de mettre en valeur les propriétés pharmacologiques des PAM en s'appuyant sur leurs profils chromatographiques.

Eu égard de l'importance des huiles aromatiques de la menthe poivrée en phytothérapie, il nous a semblé nécessaire de leur consacrer cette étude pour vérifier les activités antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et analgésique, pour éventuelle intégration dans l'arsenal thérapeutique.

Le premier objectif de notre étude était de déterminer la composition chimique de l'huile par analyse chromatographique. Cet examen a permis d'identifier et de quantifier une vingtaine de constituants où le menthol et son cétone et ester (menthone et acétate de menthyle) étaient décelés comme les composés majoritaires.

L'autre objectif assigné à ce travail était l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'essence *in vitro* sur une large gamme de souches bactérienne et mycéliennes isolées cliniquement. En aromatogramme, l'huile a démontré un pouvoir fongistatique intéressant sur la totalité des isolats fongiques. Le même constat a été rapporté en utilisant la technique de microatmosphère où la phase vapeur est aussi douée d'un pouvoir inhibiteur, parfois plus élevé que la phase liquide, notamment sur les souches levuriformes. Cette activité inhibitrice est « dose-dépendante » et paraît plus supérieure à celle de l'Hexomedine (antiseptique). Ces résultats obtenus sont très encourageants pour une éventuelle utilisation dans un projet visant à assainir les ambiances en milieu hospitalier. En outre, Les propriétés antimycosiques de l'huile ont été aussi confirmées par une méthode qualitative de dilution en milieu gélosé.

L'autre volet abordé, lors de cette étude, était la détermination du pouvoir anti-inflammatoire topique de l'essence *in vivo*. Les résultats ont établi l'efficacité de l'huile dans la réduction de l'inflammation topique et la résorption de l'œdème, en comparaison avec les médicaments de synthèse. Cette activité a été corroborée par une étude histopathologique qui a confirmé les bienfaits thérapeutiques de l'essence dans la réduction de l'inflammation locale. En outre, cette huile est douée d'un pouvoir spasmolytique *in vivo*, largement supérieur au contrôle positif.

Comme perspectives, il serait intéressant de combiner l'utilisation des métabolites terpéniques avec des antifongiques de synthèse. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires inhérents aux médicaments synthétiques.

En outre, il nous paraît utile de tester l'action antimicrobienne des huiles sur un large spectre de germes, en particulier des bactéries multi-résistantes (entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu, staphylocoques résistants à la méticilline ou à la vancomycine), des bactéries responsables d'altération de la qualité des denrées alimentaires et des germes phytopathogènes.

Pour améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives des HE devra être entrepris. L'observation des effets produits sur l'ultra structure microbienne devra être réalisée en microscopie électronique à transmission.

La cytotoxicité des molécules terpéniques de la menthe poivrée devra être également explorée *in vivo* et dans des cultures cellulaires. Après ces nombreux tests toxicologiques, les molécules à activité thérapeutiques pourront servir de base au développement de nouveaux médicaments.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique de la menthe poivrée en aromathérapie anti-infectieuse ou comme ingrédient actif dans la réduction de l'inflammation locale et des douleurs abdominales. L'essence de cette plante à parfum peut constituer les prémisses d'une nouvelle ère d'industrialisation pour un intérêt thérapeutique futur. En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable puis qu'il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et l'exploitation industrielle des plantes à parfum. Seul l'avenir nous dira l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

Références Bibliographiques

- [1] Abdel-Hameed, E. S. S., Salman, M. S., Fadl, M. A., Elkhateeb, A., & El-Awady, M. A. (2018). Chemical composition of hydrodistillation and solvent free microwave extraction of essential oils from *Mentha Piperita* L. growing in Taif, Kingdom of Saudi Arabia, and Their anticancer and antimicrobial activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 34(1), 222-233.
- [2] Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, 4^{ème} édition, Pennsylvanie, USA.
- [3] Agence Européenne du Médicament (EMA). Community herbal monograph on *Mentha x piperita* L.
- [4] Agence Nationale du Médicament (ANSM). Menthe poivrée. Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement. [Consulté le 20/04/2015]. <http://bit.ly/liste-a-plantes-ansm>
- [5] Ahmad, K. M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O. P., & Piškur, J. (2014). Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 529-535.
- [6] Asao, T., Kuwano, H., Ide, M., Hirayama, I., Nakamura, J. I., Fujita, K. I., & Horiuti, R. (2003). Spasmolytic effect of peppermint oil in barium during double-contrast barium enema compared with Buscopan. *Clinical Radiology*, 58(4), 301-305.
- [7] Baba aissa. F.(1999).encyclopédie des plantes utiles (flore d'algerie et du maghreb). Ed librairie moderne. Rouiba. P 172.
- [8] Barlier, L. (2014). Etat des lieux de l'utilisation des huiles essentielles au CHU d'Angers (de 2000 à 2013). Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université d'Angers, France.
- [9] Barnick, C. G. W., & Cardozo, L. D. (1990). The treatment of abdominal distension and dyspepsia with enteric coated peppermint oil following routine gynaecological intraperitoneal surgery. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 10(5), 423-424.
- [10] Barton, G. M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(2), 413-420.
- [11] Bessah, R., & Benyoussef, E. H. (2015). La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, 18(3), 513-528.
- [12] Beigi, M., Toriki-Harchegani, M., & Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 267-276.
- [13] Benabdallah, A., Boumendjel, M., Aissi, O., Rahmoune, C., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2018). Chemical composition, antioxidant activity and

- acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. South African Journal of Botany, 116, 131-139.
- [14] Ben-Arye, E., Dudai, N., Eini, A., Torem, M., Schiff, E., & Rakover, Y. (2011). Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011.
- [15] Benayad, N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Research Project. University of Sciences, Rabat (Maroc).
- [16] Betoni, J. E. C., Mantovani, R. P., Barbosa, L. N., Di Stasi, L. C., & Fernandes Junior, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(4), 387-390.
- [17] Blot, F. (2003). Pronostic des infections en oncohématologie. Réanimation, 12(3), 235-247.
- [18] Braun, D. K., & Kauffman, C. A. (1992). *Rhodotorula fungaemia*: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. Mycoses, 35(11-12), 305-308.
- [19] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (2009). Edition Tec & Doc. 4 ème édition. 1269 p.
- [20] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Edition Tec et Doc.
- [21] Chabasse, D., & Bouchara, J. P. (1997). Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine: Revue de la littérature. Revue Française des Laboratoires, 1997(291), 129-143.
- [22] Charabot, E., Gatin C. L. (1908). Le parfum chez la plante. Gaston Doin, 404 p.
- [23] Charles, D. J. (2013). Saffron. In antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science & Business Media.
- [24] De Billerbeck, V. G., Roques, C., Vanière, P., & Marquier, P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Hygiènes, 10(3), 248-251.
- [25] De Cássia da Silveira, R., Andrade, L. N., & de Sousa, D. P. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. Molecules, 18(1), 1227-1254.
- [26] De Oliveira Hashimoto, G. S., Neto, F. M., Ruiz, M. L., Acchile, M., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Martins, M. L. (2016). Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. Aquaculture, 450, 182-186.
- [27] De Sousa Barros, A., de Moraes, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., & de Sousa, H. A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. Industrial Crops and Products, 76, 557-564.
- [28] De Sousa, A. A. S., Soares, P. M. G., de Almeida, A. N. S., Maia, A. R., de Souza, E. P., & Assreuy, A. M. S. (2010). Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. Journal of Ethnopharmacology, 130(2), 433-436.

- [29] Delespaul, Q., de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Michel, G., Marquier-Viñuales, C., & Bessière, J. M. (2000). The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 256-266.
- [30] Deyra, B., Guinobert, I., Feuillolay, C., Haddioui, L., Roques, C., & Brochot, A. (2017). Effet antimicrobien et sur le mal de gorge d'un spray à base d'extraits de sauge et de sureau, d'huile essentielle de menthe poivrée, de miel et de zinc. *Phytothérapie*, 15(4), 203-210.
- [31] Eberhard, T., Robert A., Annelise, L. (2005). *Plantes aromatique épices aromates condiments et huiles essentielles*. TEC et DOC. Paris.
- [32] Farnsworth, N.R. ; Akerele, O. ; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. bulletin de l'organisation mondiale de la santé 1986, 64 (2), 159-175; b) Roux, D.; Catier, O. « Botanique, pharmacognosie, phytothérapie », 3^{ème} Ed. Porphyre 2007, 13. (il n'est pas en style APA)
- [33] Ford, A. C., Talley, N. J., Spiegel, B. M., Foxx-Orenstein, A. E., Schiller, L., Quigley, E. M., & Moayyedi, P. (2008). Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 337, a2313.
- [34] Freise, J., & Köhler, S. (1999). Peppermint oil-caraway oil fixed combination in non-ulcer dyspepsia--comparison of the effects of enteric preparations. *Die Pharmazie*, 54(3), 210-215.
- [35] Galeotti, N., Mannelli, L. D. C., Mazzanti, G., Bartolini, A., & Ghelardini, C. (2002). Menthol: a natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, 322(3), 145-148.
- [36] Grigoleit, H. G., & Grigoleit, P. (2005). Gastrointestinal clinical pharmacology of peppermint oil. *Phytomedicine*, 12(8), 607-611.
- [37] Hammami.S et Abdesselem M.(2005).Extraction et analyse des huiles essentielles de la menthe poivrée de la région de Ouargla .Thèse IngUniv Blida P69.
- [38] Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- [39] Hart, T., & Shears, P. (1997). *Atlas de poche microbiologie*. Flammarion, France.
- [40] Hendawy, S. F., El Gendy, A. G., Omer, E. A., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2018). Growth, yield and chemical composition of essential oil of *Mentha piperita* var. *multimentha* grown under different agro-ecological locations in Egypt. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(1), 23-39.
- [41] Hiki, N., Kurosaka, H., Tatsutomi, Y., Shimoyama, S., Tsuji, E., Kojima, J., & Mafune, K. I. (2003). Peppermint oil reduces gastric spasm during upper endoscopy: a randomized, double-blind, double-dummy controlled trial. *Gastrointestinal Endoscopy*, 57(4), 475-482.
- [42] Hosseinzadeh, H., & Younesi, H. M. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology*, 2(1), 7.
- [43] Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860.

- [44] Hubert, Z. (2005). Les plantes aromatiques et les huiles essentielles à grasse, l'Harmattan paris, Pp : 209-211.
- [45] Il Edrissi, A. (1982). Etude des huiles essentielles de quelques Espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Rabat, Maroc.
- [46] İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, H. C., & Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(14), 3943-3946.
- [47] John Spicer, W., 2002. Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie. Edition Lavoisier, Paris, France.
- [48] Johnson, K. B., Stockwell, V. O., McLaughlin, R. J., Sugar, D., Loper, J. E., & Roberts, R. G. (1993). Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. Phytopathology (USA).
- [49] Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L., & Sugar, D. (2000). Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple. Phytopathology, 90(11), 1285-1294.
- [50] Kačaniová, M., Vukovič, N., Horská, E., šalamon, I., Bobková, A., Hleba, L., & Bobko, M. (2014). Antibacterial activity against *Clostridium* genus and antiradical activity of the essential oils from different origin. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 49(7), 505-512.
- [51] Kamatou, G. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochemistry, 96, 15-25.
- [52] Koenig, H. (2001). Rôle du laboratoire dans le diagnostic des mycoses viscérales: Mycoses viscérales. La Revue du Praticien, 51(7), 719-724.
- [53] Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R., & Kakou, A. (2016). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ethnopharmacologie, phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. Phytothérapie, 14(6), 384-392.
- [54] Lambrecht, B.N., & Hammad, H. (2010). The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. The Lancet, 376(9743), 835-843.
- [55] Lamnaouer D.(2002). Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord: Phase III. Etat d'avancement. p 3-7.
- [56] Liu, B., Fan, L., Balakrishna, S., Sui, A., Morris, J. B., & Jordt, S. E. (2013). TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain. Pain, 154(10), 2169-2177.
- [57] Liu, J. H., Chen, G. H., Yeh, H. Z., Huang, C. K., & Poon, S. K. (1997). Enteric-coated peppermint-oil capsules in the treatment of irritable bowel syndrome: a prospective, randomized trial. Journal of Gastro-Enterology, 32(6), 765.
- [58] Lüllmann, H., Mohr, K. & Ziegler, A. (2001). Atlas de poche de pharmacologie. Edition Médecine-Science Flammarion (2ème édition), France.
- [59] Madisch, A., Heydenreich, C. J., Wieland, V., Hufnagel, R., & Hotz, J. (1999). Treatment of functional dyspepsia with a fixed peppermint oil and caraway oil

- combination preparation as compared to cisapride. *Arzneimittelforschung*, 49(11), 925-932.
- [60] Martoja, R., & Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale.
- [61] May, B., Köhler, S., & Schneider, B. (2000). Efficacy and tolerability of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil in patients suffering from functional dyspepsia. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(12), 1671-1677.
- [62] May, B., Kuntz, H. D., Kieser, M., & Köhler, S. (1996). Efficacy of a fixed peppermint oil/caraway oil combination in non-ulcer dyspepsia. *Arzneimittelforschung*, 46(12), 1149-1153.
- [63] Mimica-Dukic N, Bozin B, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 2003;69(5):413-9.
- [64] Mizuno, S., Kato, K., Ono, Y., Yano, K., Kurosaka, H., Takahashi, A., & Hiki, N. (2006). Oral peppermint oil is a useful antispasmodic for double-contrast barium meal examination. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(8), 1297-1301.
- [65] Mohsenzadeh, M. (2007). Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(20), 3693-3697.
- [66] Morin, O. (2001). Mycoses viscérales émergentes: Mycoses viscérales. *La Revue du praticien*, 51(7), 742-746.
- [67] Muraschi, T. F., Friend, M., & Bolles, D. (1965). Erwinia-like microorganisms isolated from animal and human hosts. *Applied Microbiology*, 13(2), 128-131.
- [68] Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
- [69] Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917), 846.
- [70] Nickavar, B., Alinaghi, A., & Kamalinejad, M. (2010). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 203-209.
- [71] Organisation Mondiale de la Santé (OMS), Eureka santé.
- [72] Osman M. (2011). L'examen cytot bactériologique de pus .Mémoire de fin d'études en vue d'obtention d'un diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Sétif, Algérie.
- [73] Oussou, K. R., Yolou, S., Boti, J. B., Guessennd, K. N., Kanko, C., Ahibo, C., & Casanova, J. (2008). Etude chimique et activité anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24(1), 94-103.
- [74] Pedersen, J. A. (2000). Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical systematics and Ecology*, 28(3), 229-253.
- [75] Pileggi, M., Pileggi, S. A. V., Olchanheski, L. R., da Silva, P. A. G., Gonzalez, A. M. M., Koskinen, W. C., & Sadowsky, M. J. (2012). Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere*, 86(11), 1127-1132.
- [76] Pittler, M. H., & Ernst, E. (1998). Peppermint oil for irritable bowel syndrome: a critical review and metaanalysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(7), 1131-1135.

- [77] Prescott L., Harley J., Kleins A.,(2003). Microbiologie. Ed. De Boek université.
- [78] Russo-Marie, F. (1998). L'inflammation. John Libbey Eurotext. p.565.
- [79] Serhan, C. N., Ward, P. A., & Gilroy, D. W. (Eds.). (2010). Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press.
- [80] Shah, P. P., & Mello, P. M. D. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*.
- [81] Shavakhi, A., Ardestani, S. K., Taki, M., Goli, M., & Keshteli, A. H. (2012). Premedication with peppermint oil capsules in colonoscopy: a double blind placebo-controlled randomized trial study. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, 75(3), 349-353.
- [82] Shin, S. (2004). Essential oil compounds from *Agastache rugosa* as antifungal agents against *Trichophyton* species. *Archives of Pharmacal Research*, 27(3), 295-299.
- [83] Soro, T. Y., Traore, F., & Sakande, J. (2009). Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Comptes Rendus Biologies*, 332(4), 371-377.
- [84] Tony H, Paul S; (1999). Atlas de poche de microbiologie. Édition 2 eme. Paris.
- [85] Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65.
- [86] Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
- [87] Vandeputte, P., Pineau, L., Larcher, G., Noel, T., Brèthes, D., Chabasse, D., & Bouchara, J. P. (2011). Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, 171(1), 11-21.
- [88] Weill, B., & Batteux, F. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck Supérieur.
- [89] Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., & Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8484-8489.
- [90] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.
- [91] Yamamoto, N., Nakai, Y., Sasahira, N., Hirano, K., Tsujino, T., Isayama, H., & Hiki, N. (2006). Efficacy of peppermint oil as an antispasmodic during endoscopic retrograde cholangio-pancreatography. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(9), 1394-1398.
- [92] Youssef A.N, (1990).Dictionary of Medicinal plants, Librairie du Liban 160 p.

Annexe 1

Technique de coloration « Hématoxyline-Eosine »

1. Fixation :

- Elle a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire après le prélèvement, par immersion dans un grand volume de liquide fixateur (formol).
- Elle est la plus importante dans les techniques de préparation des échantillons histologiques.

2. Déshydratation et Eclaircissement :

- La déshydratation a pour but de faire sortir l'eau contenue dans les tissus pour les préparer à l'inclusion. On utilise généralement un automate muni (Leica TP 1020, V2.3 Français-03 /2008) de plusieurs bacs contenant par ordre :

Réactifs	Temps (h)	Température (°C)
Formol	2	< 40
Ethanol 50%	2	45
Ethanol 50%	1	45
Ethanol 60%	1	45
Ethanol 70%	1	45
Ethanol 90%	1	45
Ethanol 98%	1	45
Xylène 50%	1	45
Xylène 60%	1	45
Paraffine 50%	2	60
Paraffine 60%	2	60

- L'inclusion dans la paraffine nécessite au préalable la déshydratation des pièces histologiques (bains successifs d'éthanol de degrés croissants, jusqu'à l'absolu).
- L'élimination complète des traces d'éthanol et l'imprégnation par le xylène.
- L'élimination de xylène et le remplacement par la paraffine. Les pièces sont placées successivement dans deux bains chacun, d'une durée de deux heures à une température de 60°C.

Mode opératoire :

- On met les pièces des oreilles dans des cassettes en plastique (Leica Micro Systems 39 LC – 550-2 J et Routine VI) qui se placent en vrac dans le panier. Chaque cassette porte toutes les indications utiles de Chaque pièce. On met le panier dans l'automate d'infiltration qui va effectuer automatiquement toutes les opérations de traitement des prélèvements tissulaires : fixation, déshydratation, et éclaircissement des spécimens dans les solvants pour finir par l'inclusion dans la paraffine liquide.
- Le panier est transporté d'un poste à l'autre, le déplacement s'effectue dans le sens des aiguilles d'une montre. Un mouvement de va et vient est imprimé au panier immergé. Ce mouvement a pour but de faciliter et d'accélérer l'infiltration.
- Avant de quitter un poste, le panier est maintenu pendant 60 secondes au-dessus du récipient pour laisser au produit le temps de s'égoutter (on réduit au minimum le risque

de contamination de solvants.). Enlever le panier et prendre les cassettes pour l'enrobage.

3. L'inclusion :

- L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes histologiques fines et régulières.
- Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Le paraplast (Leica Microsystems) est une paraffine synthétique qui imprègne bien les pièces.
- Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°C).
- L'inclusion se fera dans des moules pour la confection de blocs qui se montent sur le microtome.

Mode opératoire :

On utilise pour cette étape une station d'enrobage tissu-TEK 111, (Réf.74588), contenant : console thermique, console d'enrobage et console réfrigérante.

- Placer les moules en Acier inoxydable (tissus-TEK111) dans le bac de préchauffage.
- Retirer les cassettes de la paraffine liquide à l'aide des pinces préchauffées et les placer sur la plate-forme chaude de travail.
- Après avoir rempli le moule de paraffine, le placer sur la plate-forme chaude, positionner le tissu au centre et au fond du moule.
- Déplacer le moule de la « région chaude » à la « région froide ». Le refroidissement de la base du moule fait que le tissu est maintenu exactement dans la position choisie.
- La cassette d'enrobage est alors enlevée de la plate-forme de travail chauffée, puis placée au-dessus du moule : la température de la cassette et la paraffine liquide permettent une soudure immédiate. La cassette et le moule sont alors de nouveau placés sous le système de distribution, la paraffine est ajoutée jusqu'à ce que la cassette soit à moitié remplie. Placer la cassette et le moule ainsi remplis sur la grande plaque réfrigérée pour refroidissement définitif.
- Après quelques minutes de refroidissement, les blocs ainsi réalisés, avec précision, peuvent donc être stockés dans le tiroir réfrigéré en attendant d'être coupés.

4. Réalisation des coupes au microtome :

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5 µm d'épaisseur.
- Les rubans obtenus sont étalés sur les lames (CITOGLAS® 217105-1 Super GRADE) et mises à sécher 1h à 60°C. Les indications de l'organe sont préalablement gravées sur la lame correspondante.

5. Coloration :

- Elle est précédée par séchage des lames à 90°C pendant 10 min à l'étuve dans le but d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes.

Les différentes étapes de la coloration Hématoxyline-Eosine sont:

- Déparaffinage (Xylène).
- Hydratation (Ethanol).
- Coloration.
- Déshydratation (Ethanol).
- Eclaircissement (Xylène).

L'automate de coloration (Sakura Finetechnical Co., Ltd.) utilisé comprend les bacs suivants :

	Durée (minutes)
Xylène	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Eau distillé	2
Hématoxyline de Harris	6
Eau courante	3
HCl 1%	2 secondes
Alcool pur (éthanol 98%)	3
Eau lithiné	2
Eau courante	2
Eosine	12
Eau courante	3
Alcool (éthanol 98%)	2
Xylène	3

Annexe 2

Statistiques du pouvoir anti-inflammatoire topique

Traitement / Fisher (LSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
Bethazone vs Control -	-0,006	-2,772	2,120	0,014	Oui
Bethazone vs Voltarene	-0,005	-2,306	2,120	0,035	Oui
Bethazone vs HE	-0,001	-0,378	2,120	0,710	Non
HE vs Control -	-0,005	-2,526	2,120	0,022	Oui
HE vs Voltarene	-0,004	-2,030	2,120	0,059	Non
Voltarene vs Control -	-0,001	-0,598	2,120	0,558	Non

LSD-value : 0,004

Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)	Groupes
Bethazone	0,003	0,001	-0,001	0,006	A
HE	0,003	0,001	0,000	0,006	A B
Voltarene	0,007	0,001	0,004	0,011	B C
Control -	0,009	0,002	0,005	0,012	C

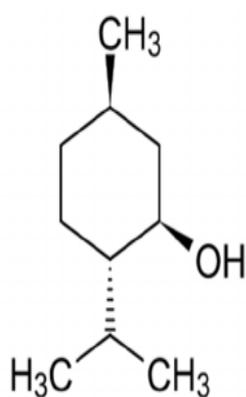
Statistiques de l'activité antalgique *in vivo*

Traitement / Fisher (LSD) / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% :

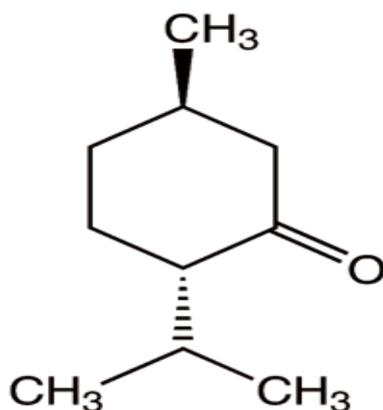
Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
HE vs Contrôle	-43,200	-4,357	2,179	0,001	Oui
HE vs Spasfon	-7,200	-0,726	2,179	0,482	Non
Spasfon vs Contrôle	-36,000	-3,631	2,179	0,003	Oui

LSD-value : 21,604

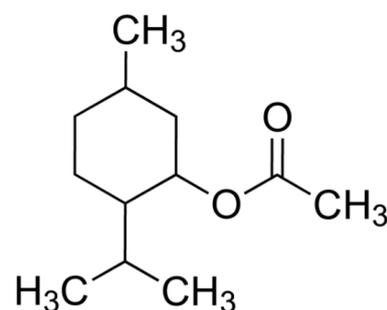
Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Borne inférieure (95%)	Borne supérieure (95%)	Groupes
HE	19,000	7,011	3,723	34,277	A
Spasfon	26,200	7,011	10,923	41,477	A
Contrôle	62,200	7,011	46,923	77,477	B



Menthol

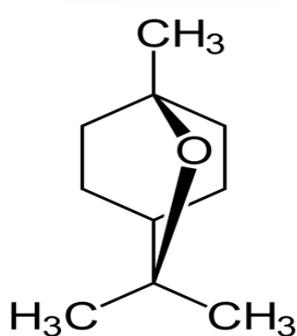


Menthone

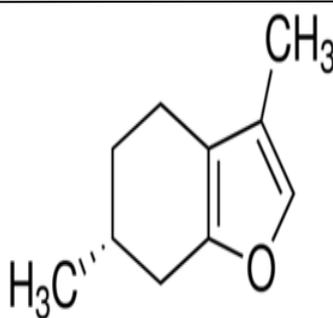


Acétate de menthyle

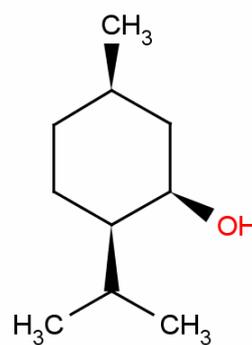
Composés majoritaires



Eucalyptol



Menthofurane



Isomenthone

Composés minoritaires

Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence de *Mentha piperita*.

Annexe 3

Analyse Chromatographique de l'Huile Essentielle

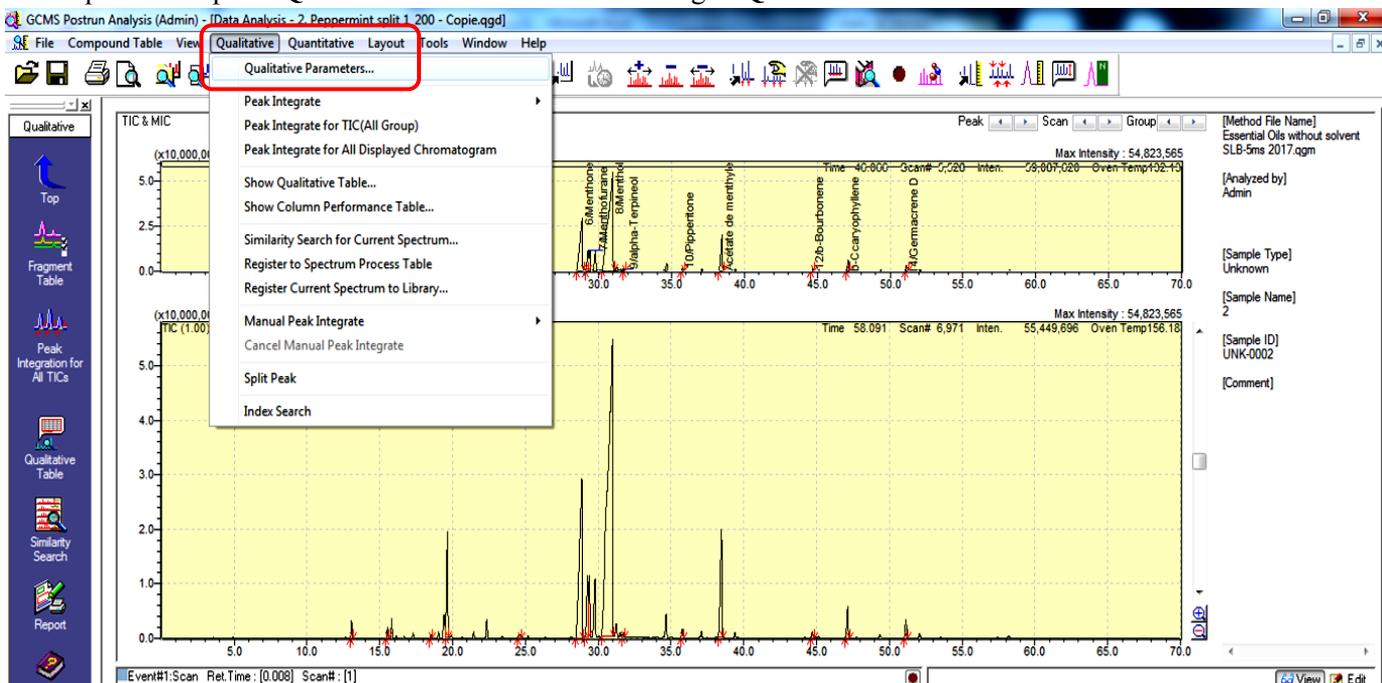
Identification des composés terpéniques

→ Mélange n-Alcanes injecté à la GC-MS pour la détermination des **Temps de Rétention** des alcanes.

Alcanes	Tr	IR
C10	17.785	1000
C11	25.006	1100
C12	32.437	1200
C13	39.669	1300
C14	46.625	1400
C15	53.217	1500
C16	59.511	1600
C17	65.454	1700

→ Ouvrir le fichier du chromatogramme

→ Cliquer sur l'option **Qualitative Parameters** dans l'onglet **Qualitative**



→ Dans l'onglet **Retention Index**, copier les valeurs (**Tr** et **IR** des **n-alcanes**) dans le tableau pour les intégrer.

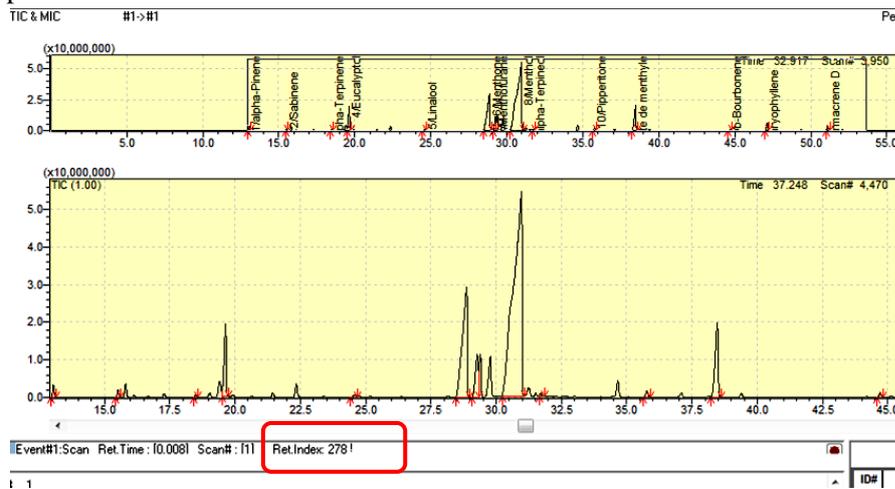
Qualitative Parameters

Peak Integration | Spectrum Process | Similarity Search | **Retention Index** | Column Performance

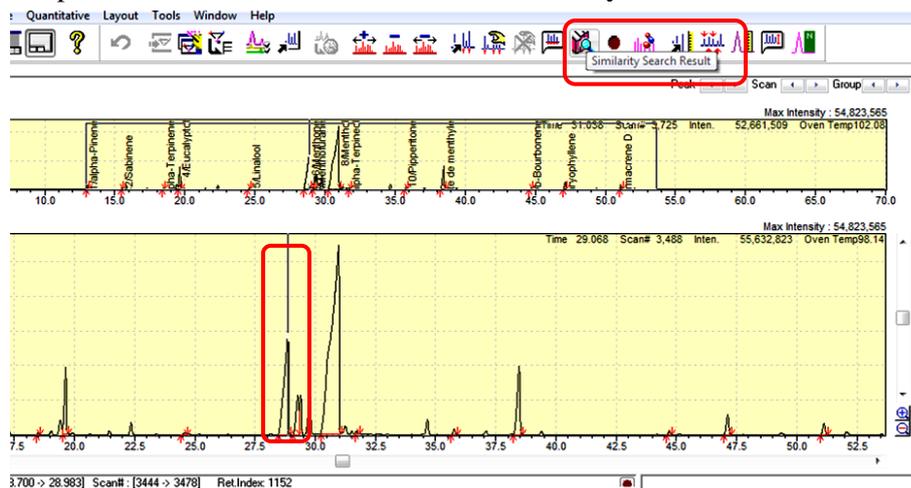
Index Table of Standards:

	Name	Ret. Time	Index
1	C6	3.200	600
2	C7	4.191	700
3	C8	7.016	800
4	C9	11.494	900
5	C10	17.785	1000
6	C11	25.006	1100
7	C12	32.437	1200
8	C13	39.669	1300
9	C14	46.625	1400
10	C15	53.217	1500
11	C16	59.511	1600
12	C17	65.454	1700

→ Cliquer OK. Les indices de rétention (**Ret. Index**) seront automatiquement **intégrés** dans chaque pic.

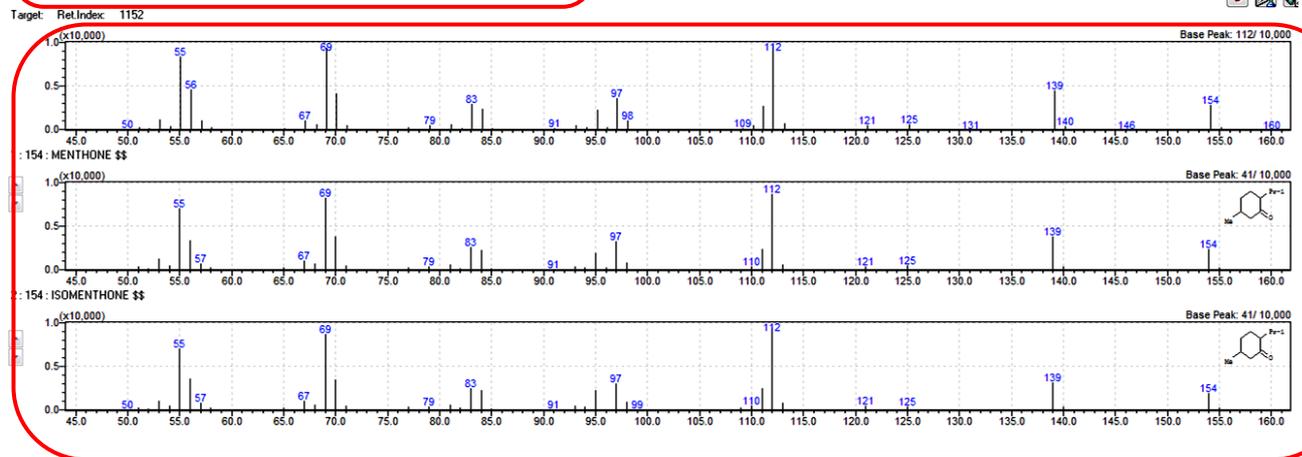


→ **Zoomer** le pic à identifier, puis cliquer sur **Similarity Research Result** pour **identifier** le pic, en comparaison avec la base de donnée **NIST** et **Wiley**.



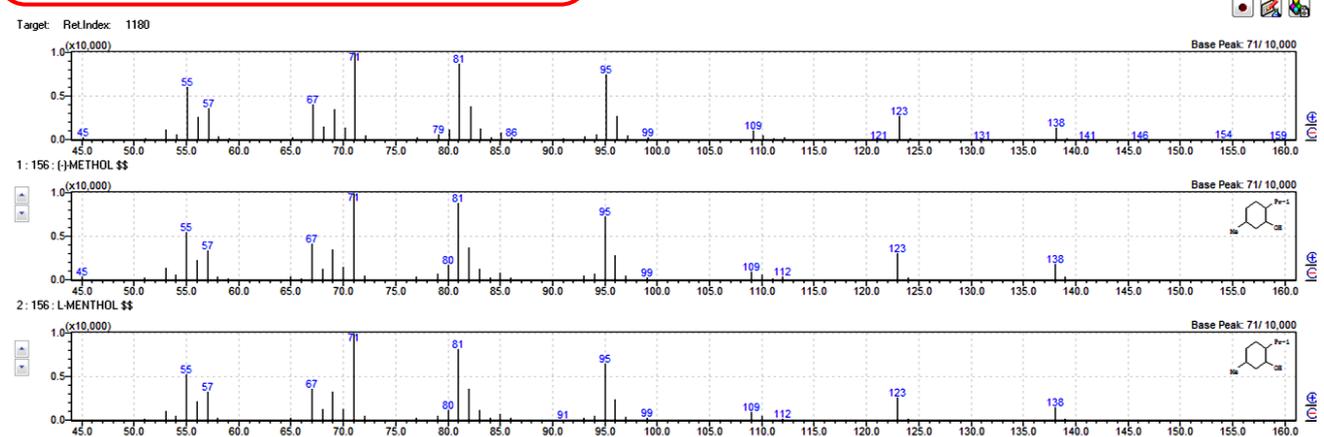
→ Une fenêtre s'ouvre. Elle contient les **spectres de masse** du pic avec plusieurs possibilités de composés (dans notre cas, tous correspondent à **isomenthone** ou ses synonymes) trouvés dans la base de données **Wiley**.

Hit#	Similarity	Regi	Ret.	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
98	7	0		MENTHONE SS	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
97		0		ISOMENTHONE SS	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
96		0		Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
95		0		p-Menthone SS Cyclohexanone, 5-methyl-2-(154	C10 H18 O	Wiley229.lb
95		0		Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
95		0		Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
95		0		ISOMENTHONE SS	154	C10 H18 O	Wiley229.lb
95		0		p-Menthone SS Cyclohexanone, 5-methyl-2-(154	C10 H18 O	Wiley229.lb

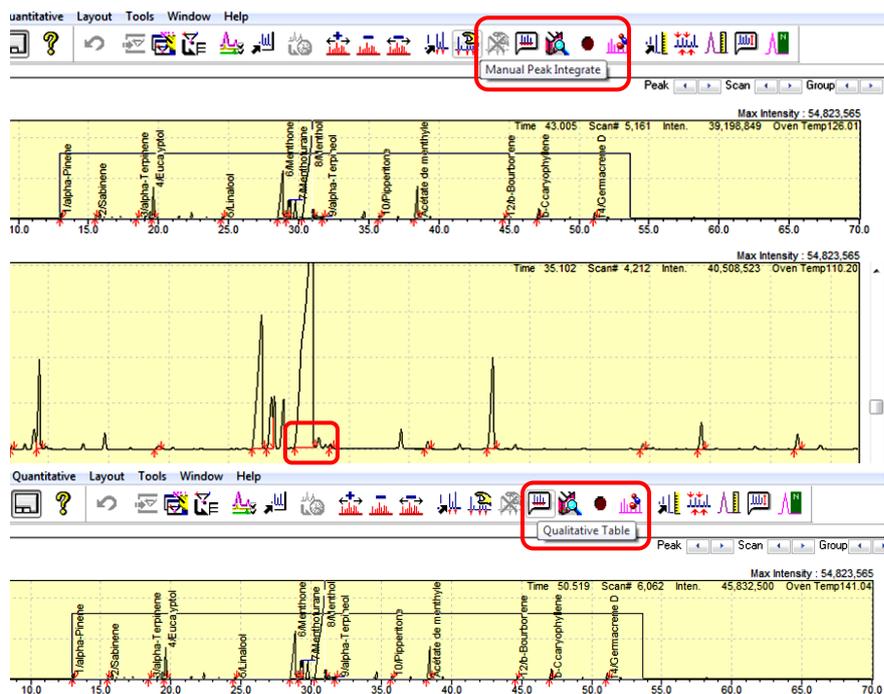


→ Autre exemple d'identification pour le **Menthone** (Masse moléculaire, Formule chimique et Base de données)

Hit#	Similarity	Regi	Ret.	Compound Name	Mol Wt	Formula	Library
1	98	✓	0	(-)-MENTHOL SS	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
2	98		0	L-MENTHOL SS	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
3	97		0	l-MENTHOL SS	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
4	97		0	(+)-Menthol SS Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
5	97		0	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)- (C	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
6	96		0	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)- (C	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
7	96		0	L-(-)-Menthol SS Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1	156	C10 H20 O	Wiley229.lb
8	96		0	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)- (C	156	C10 H20 O	Wiley229.lb



→ Intégrer le composé identifié (base du pic) (**Manual Pic Intergrate**) puis le copier-coller après avoir cliquer sur **Qualitative Table**.



→ Résultats final du tableau intégrer donnant le **nom** de chaque composé, son **TR** et **Surface** du pic.

Peak#	Ret.Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Narr
1	13.051	12.958	13.167	TIC	13293264	0.65	3219251	2.10	4.13	MI	alpha-Pinene
2	15.526	15.425	15.608	TIC	8702323	0.43	1913130	1.25	4.55	MI	Sabinene
3	18.491	18.408	18.583	TIC	3155076	0.16	654861	0.43	4.82	MI	alpha-Terpinene
4	19.637	19.517	19.733	TIC	107081492	5.28	19420151	12.65	5.51	MI	Eucalyptol
5	24.613	24.425	24.708	TIC	6337103	0.31	726138	0.47	8.73	MI	Linalool
6	28.877	28.450	28.992	TIC	376392849	18.20	29214469	19.03	12.68	MI	Menthone
7	29.275	29.083	29.333	TIC	86804029	4.26	11321709	7.38	7.67	MI	Mentofurane
8	30.974	30.225	31.083	TIC	1202890253	59.09	54418220	35.44	22.10	MI	Menthol
9	31.707	31.650	31.858	TIC	4350113	0.21	832791	0.54	5.22	MI	alpha-Terpineol
10	35.773	35.633	35.900	TIC	10102206	0.50	1638338	1.07	6.17	MI	Peperitone
11	38.472	38.225	38.617	TIC	153841829	7.56	19874134	12.95	7.74	MI	Acétate de menthyle
12	44.710	44.567	44.833	TIC	7065508	0.35	1129175	0.74	6.26	MI	b-Bourbonene
13	47.139	46.950	47.283	TIC	39066110	1.92	5834546	3.80	6.70	MI	b-Caryophyllene
14	51.138	50.975	51.283	TIC	22370720	1.10	3296439	2.15	6.79	MI	Germaacrene D

→ Si, dans le cas où **plusieurs propositions** sont données par la base de données, il faut recourir à une comparaison avec la **littérature online** (chercher le nom du composé pour avoir son **Indice de Rétention** dans la colonne **DB-5** avec une **programmation de température**). Site web : www.webbook.nist.gov

WebBook de Chimie NIST

Base de données standard de référence NIST numéro 69

Aller voir: [Options de recherche](#), [Modèles et outils](#), [Documentation](#), [Notes](#)

► Crédits

Le NIST se réserve le droit à l'avenir de facturer l'accès à cette base de données.

Options de recherche

Recherches générales

- Formule
- Nom
- Identificateur IUPAC
- Numéro d'enregistrement de CAS
- Réaction

Recherches basées sur les propriétés physiques

- Propriétés d'énergétique d'ion
- Énergies vibrationnelles et électroniques
- Poids moléculaire

Recherche des données d'espèce par le nom chimique

Veuillez suivre les étapes ci-dessous pour effectuer votre recherche ([Aide](#)):

- Entrer un nom d'espèce chimique ou de modèle (par exemple, méthane, *2-hexène)
- Sélectionner l'unité désirée pour les données thermodynamiques:
 - SI basé-calorie
- Sélectionner le type(s) désiré des données:

Données Thermodynamiques <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Phase Gazeuse <input type="checkbox"/> Phase condensée <input type="checkbox"/> Changement de phase <input type="checkbox"/> Réaction <input type="checkbox"/> Énergies ioniques <input type="checkbox"/> Groupes ioniques 	Autres Données <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Spectre IR <input type="checkbox"/> Spectre THz IR <input type="checkbox"/> Spectre de Masse <input type="checkbox"/> Spectre UV/vis <input checked="" type="checkbox"/> Chromatographie en phase gazeuse <input type="checkbox"/> Niveaux d'énergie vibrationnelle & électronique <input type="checkbox"/> Constantes des molécules diatomiques <input type="checkbox"/> Loi d'Henry
--	---
- Cliquer ici pour lancer la recherche:

→ Le composé sera identifié et confirmé si la valeur du IR trouvé dans la littérature (pour le même type de colonne) est proche ou égale à celle donnée par le logiciel (**IR = 1152** pour l'**isomenthone** dans une colonne apolaire DB-5 avec programmation de température).

Normal alkane RI, non-polar column, temperature ramp

[View large format table.](#)

Column type	Active phase	I	Reference	Comment
Capillary	DB-1	1152	Salehi, Sonboli, et al., 2005	60. m/0.25 mm/0.25 µm, He, 5. K/min, 250. C @ 10. min; T _{start} : 60. C
Capillary	DB-5	1154.	Sefidkon and Jamzad, 2005	He, 4. K/min; Column length: 30. m; Column diameter: 0.25 mm; T _{start} : 40. C; T _{end} : 240. C
Capillary	HP-5MS	1156.	Slavkovska, Couladis, et al., 2005	30. m/0.25 mm/0.25 µm, He, 3. K/min; T _{start} : 60. C; T _{end} : 280. C
Capillary	RTX-1	1137.	Sonboli, Salehi, et al., 2005	60. m/0.25 mm/0.25 µm, He, 5. K/min, 25. C @ 10. min; T _{start} : 60. C
Capillary	HP-5MS	1176.	Tepe B., Sokmen M., et al., 2005	30. m/0.25 mm/0.25 µm, He, 50. C @ 3. min, 3. K/min; T _{end} : 240. C
Capillary	HP-5	1139.	Aghel, Yamini, et al., 2004	30. m/0.25 mm/0.32 µm, He, 60. C @ 3. min, 5. K/min; T _{end} : 250. C
Capillary	DB-1	1149.	Choi, 2004	60. m/0.25 mm/0.25 µm, N2, 70. C @ 2. min, 2. K/min, 230. C @ 20. min
Capillary	DB-5	1152 .	Kalvandi, Sefidkon, et al., 2004	60. m/0.25 mm/0.25 µm, He, 40. C @ 4. min, 4. K/min; T _{end} : 280. C
Capillary	DB-5	1152 .	Miyazawa, Fuhita, et al., 2004	Helium, 2. K/min, 240. C @ 999. min; Column length: 30. m; Column diameter: 0.25 mm; T _{start} : 60. C
Capillary	DB-5	1152 .	Miyazawa, Fujita, et al., 2004	Helium, 2. K/min, 240. C @ 999. min; Column length: 50. m; Column diameter: 0.25 mm; T _{start} : 60. C