

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

Projet de fin d'étude pour l'obtention du

Diplôme de Master en Science de la Nature et de la Vie

Option : Biotechnologie des Plantes Aromatiques et Médicinales et des Produits Naturels

Thème :

Valorisation de l'activité antimicrobienne d'extraits aqueux et des huiles essentielles de *Mentha piperita* L. et *Mentha pulegium* L.

Présenté par : Benhalima Nadji

Devant le jury composé de :

M^{me} HOUMANI .Z	Professeur	U.S.D.B.	Présidente
M^r. BENDALI .A	MAA	U.S.D.B.	Examineur
M^{me} AYACHI .N	MAA	U.S.D.B.	Examinatrice
M^r AISSAT .A	Maitre de conférences	U.S.D.B.	Promoteur

Année universitaire: 2014 - 2015

Remerciements

*Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à mon promoteur **Mr AISSAT A.** maître de conférence à l'Université de Saad Dahleb Blida d'avoir proposé le thème de recherche tout en assurant son évolution, par sa disponibilité et ses conseils.*

*Je tiens également à remercier **Mr TEFAHI D** responsable au laboratoire d'hygiène de l'hôpital universitaire CHU de Blida, qui m'a accueilli au sein de leur groupe et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de la période de recherche.*

*J'exprime ma profonde gratitude à **Mme Houmani Z.** professeur à l'Université de Saad Dahleb Blida, qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Je tiens à adresser mes vifs remerciements à **Mr. BENDALI A.** Maître assistant (A) à la faculté SNV de l'université Saad Dahlab de Blida et **Mme Ayachi N.** Maître assistante (A) à la faculté de pharmacie, Université de Blida, d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Aussi, je tiens à remercier tous les enseignants de la spécialité qui m'ont suivi durant tout mon cursus pour leur dévouement et précieux conseils.

Merci à tous.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*À mes **très chers parents** que dieu me les garde, pour vos mains qui ont tant travaillé*

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés

Pour vous qui m'avez tant aimé

*A mon petit frère **Chouaib***

*A mes sœurs : **Wissem et Lilya***

*À mes chères **tantes** et à toute ma **famille***

*A ma meilleure amie **Akila** pour sa gentillesse, sa grande patience et son soutien durant les moments les plus difficiles. Je lui souhaite un avenir radieux.*

*Sans oublier tous mes amis : **Sedik, Souad, Mohamed, Hicheme***

*A toute la promotion de **Biotechnologie des plantes aromatiques, médicinales et des produits naturels.***

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Résumé

Cette étude a pour objectif de valoriser l'efficacité antimicrobienne *in vitro* d'extraits aqueux et des huiles essentielles de deux espèces médicinales : *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*

Mentha piperita et *Mentha pulegium* sont connues pour leurs propriétés médicinales depuis l'antiquité. Les parties aériennes de ces deux plantes sont largement utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies.

L'extraction par l'hydrodistillation de type Clevenger des parties aériennes de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium* a donné un rendement en huile essentielles de 1.2% et 1% respectivement.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'aromatogramme, a révélé que l'huile essentielle de *Mentha piperita* et celle de *Mentha pulegium* ont un effet inhibiteur sur toutes les souches : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*.

Concernant les souches fongiques, seule *Mentha pulegium* s'est avérée modérément inhibitrice vis-à-vis de *Candidat albicans* et *Aspergillus brasiliensis*

Les diamètres d'inhibition de la croissance microbienne générés par les différents extraits aqueux testés ont affirmé l'absence du pouvoir antimicrobien des deux espèces.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *M. piperita* et *M. pulegium*, a montré une sensibilité des souches testées aux substances diluées avec des concentrations allant de 5% à 20% pour *M. pulegium* et de 10% à 20% pour *M. piperita*.

Mots clés : *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, huile essentielle, hydrodistillation, et activité antimicrobienne.

المخلص

تهدف هذه الدراسة الى تعزيز فعالية مضادات المكروبات في المختبر للمستخلصات المائية و الزيوت الاساسية كلاهما من النباتات الطبية النعناع الفلفلي *Mentha Pulegium*. الفليو *Mentha Pulegium* منذ العصور القديمة عرف النعناع الفلفلي *Mentha piperita* و الفليو *Mentha Pulegium* بخصائصهم الطبية و تستخدم الاجزاء العلوية من هذه النباتات على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج بعض الامراض

نستخرج من الاجزاء العلوية بتقنية التقطير البخاري الزيت الاساسي للنعناع الفلفلي *Mentha piperita* و الفليو *Mentha pulegium* اعطى العائد من 1.2 % و 1 % على التوالي

تقييم نشاطات مضادات الميكروبات بطريقة aromatoqramme كشف ان الزيوت الاساسية للنعناع الفلفلي *Mentha piperita* و الفليو *Mentha pulegium* لها تأثير كايح بشكل خاص على جميع السلالات: العصوية الرقيقة *Bacillus Subtilis* و الاشريكية القولونية *Escherichia coli* العصوية الشمعية *Bacillus cereus* السالمونية التيفية *Salmonella typhi* فيمل عدا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

فيما يتعلق بالسلالات الفطرية ثبت فقط ان الفليو *Mentha Pulegium* معتدلة بالنسبة للمرشح *Condidat Aspergillus brasiliensis* و *albicans*

ادعت اقطار تثبيط نمو المكروبات الناتجة عن مختلف المستخلصات المائية اختبار غياب القدرة المضادة للمكروبات بالنسبة لجميع انواع السلالات الميكروبية المدروسة تحديد الحد الادنى للتركيز المثبط من الزيت الاساسي للنعناع الفلفلي و الفليو اظهر حساسية سلالات مختبرة للمواد المخففة بتركيزات تتراوح بين 5 % الى 20 % *M. pulegium* و 10 % الى 20 % *M. piperita*

الكلمات الاساسية :

النعناع الفلفلي *Mentha piperita* – الفليو *Mentha pulegium* - الزيت الاساسي – التقطير البخار – النشاطات المضادة للمكروبات .

Summary

This study aims to valorize the antimicrobial effectiveness in vitro aqueous extracts and essential oils of two medicinal species: *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*

Mentha piperita and *Mentha pulegium* are known by their medicinal properties since antiquity. The aerial parts of these plants are widely used in traditional medicine, in the treatment of certain diseases.

The extraction by the Clevenger type hydro distillation of the aerial parts of *Mentha piperita* and *Mentha pulegium* has provided an output in essential oils, of 1.2% and 1% respectively.

The evaluation of the antimicrobial activity by the aromatogram method, has revealed that the essential oils of *Mentha piperita* and *Mentha pulegium* have an inhibitory effect on all strains: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella typhi* , except for *Pseudomonas aeruginosa*.

As regards the fungal strains, only *Mentha pulegium* has turned out to be moderately inhibitory in front of *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*

The inhibition diameters of the microbial growth, generated by the different aqueous extracts tested have affirmed the absence of the antimicrobial capacity of both species, in front of all kinds of the microbial strains studied.

The determination of the minimal inhibitory concentration of the essential oils of *M. piperita* and *M. pulegium* , have shown a sensitivity of the tested strains to the diluted substances with concentrations ranging from 5% to 20% for *M. pulegium* and from 10% to 20% for *M. piperita*.

Key words : *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, essential oil, steam distillation, and antimicrobial activity.

Liste des abréviations :

A. brasiliensis : *Aspergillus brasiliensis*

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC: American tube control collection

B. cereus : *Bacillus cereus*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

C. albicans: *Candida albicans*

cm: Centimeter

CMI : Constatation minimale inhibitrice

E. coli : *Escherichia coli*

g : Gramme

HE : Huile Essentielle

M. piperita : *Mentha piperita*

M. pulegium : *Mentha pulegium*

ml : Milliliter

mm : Millimeter

P. aeruginosa : *Pseudomonase aeruginosa*

S. typhi : *Salmonella typhi*

ZI : Zone inhibition

Liste des figures :

Figure 1 : <i>Mentha piperita</i>	05
Figure 2 : <i>Mentha pulegium</i>	09
Figure 3 : Schéma du dispositif de l'hydrodistillation	16
Figure 4 : Bacillus cultivée sur gélose nutritive	22
Figure 5 : Aspect morphologique de Bacillus, de longs bacilles disposés en chaînettes.....	23
Figure 6 : Pseudomonas aeruginosa, sur gélose nutritive	24
Figure 7 : Culture d'Aspergillus sur gélose de Sabouraud glucosée.....	29
Figure 8 : Localisation de la station Oued Mouzaia du secteur El Hamdania	31
Figure 9 : Station de récolte Oued Mouzaia	31
Figure 10 : Hydrodistillateur Clevenger	33
Figure 11 : Extraction par un Hydrodistillateur et récupération des huiles essentielles	34
Figure 12 : Les étapes de préparation de la poudre	35
Figure 13 : Etapes de la préparation d'extrait aqueux par procédé de macération	36
Figure 14 : Etapes de la préparation d'extrait aqueux par procédé d'infusion	36
Figure 15 : Diffusion sur milieu solide (aromatogramme)	37
Figure 16 : Suspension bactérienne et fongique	38
Figure 17 : Ensemencement	39
Figure 18 : Dépôt des disques imprégnés des substances à testées	40
Figure 19 : taux d'humidité de la partie aérienne de <i>Mentha piperita</i> et <i>Mentha pulegium</i>	42
Figure 20 : huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	44

Figure 21 : huile essentielle de <i>M. piperita</i>	44
Figure 22 : Rendement des huiles essentielles de <i>mentha piperita</i> et <i>mentha pulegium</i>	45
Figure 23 : Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Mentha piperita</i>	48
Figure 24 : Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	49
Figure 25 : Zones d'inhibitions observées chez les souches microbiennes testées sous le traitement de l'huile essentielle, N) <i>M. piperita</i> , F) <i>M. pulegium</i>	50
Figure 26 : Teste d'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de <i>M. piperita</i> par procédé de macération.....	55
Figure 27 : Teste d'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de <i>M. piperita</i> par procédé d'infusion.....	56
Figure 28 : CMI pour huile essentielle de <i>M. piperita</i> , 1) 50%, 2) 25%, 3) 12,5%, 4) 6,125%, 5) 3,06%, 6) 1,53% et 7) 0,76%.	60
Figure 29 : CMI pour huile essentielle de <i>M. pulrgium</i> , 1) 50%, 2) 25%, 3) 12,5%, 4) 6,125%, 5) 3,06%, 6) 1,53% et 7) 0,76%.	61

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification botanique des deux espèces <i>mentha pepirita</i> et <i>mentha pulegium</i> ...	04
Tableau 2 : Les souches utilisées.....	32
Tableau 3 : Taux d'humidité et de matière sèche de la partie aérienne de <i>Mentha piperita</i> et <i>Mentha pulegium</i>	42
Tableau 4 : Caractère organoleptique des deux espèces.....	43
Tableau 5 : Classe des zones d'inhibition.....	46
Tableau 6 : Résultat des tests d'inhibition de de l'activité antimicrobienne de huile essentielle de <i>Mentha piperita</i> et <i>Mentha pulegium</i>	47
Tableau 7 : Résultat des tests d'inhibition de de l'activité antimicrobienne des extrait aqueux par macération et infusion de <i>Mentha piperita</i>	54
Tableau 8 : Résultat des tests d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits aqueux de <i>Mentha piperita</i> de la macération et d'infusion.....	57
Tableau 9 : Résultat des teste de CMI de <i>Mentha pulegium</i> sur les 6 souches microbien.....	59
Tableau 10 : Résultat des tests de CMI de <i>Mentha piperita</i> sur les 4 souches bactériennes.....	59

Glossaire

Antibiogramme : examen bactériologique qui permet d'apprécier la sensibilité ou la résistance d'une bactérie vis-à-vis des antibiotiques.

Anti-inflammatoire : réaction pour maintenir l'intégrité de l'organisme contre les attaques extérieures.

Antiseptique : agent d'un médicament propre à prévenir les infections.

Calice : enveloppe extérieure de la fleur formée de pièces (sépalés) libre ou soudées entre elles.

Corolle : ensemble des pièces florales libres (dialypétales) ou soudées entre elles (gamopétales), situées entre le calice et les étamines

Étamines : organes mâles de la fleur, situé entre la corolle et le pistil et composés du filet et de l'anthère

Gastralgie : ensemble de symptômes provoquant des douleurs gastriques.

Hypotension : diminution anormale de la pression artérielle.

Pharmacologique : science des médicaments, de leurs effets et de leur emploi.

Sédative : calme la douleur.

Souche: ensemble d'individus issus de repiquage successif d'une colonie microbienne.

Spasmolytiques : remèdes qu'on emploie pour soulager les spasmes musculaires (muscles lisses)

Stomachique : se dit des médicaments pour l'estomac ; substance qui favorise la digestion au niveau de l'estomac.

Table des matières

Introduction	1
Partie bibliographique chapitre I : Données bibliographiques des plantes	
I. Les lamiacées	3
II. Généralités sur la menthe	3
II.1. Systématique	4
II. 1.1. <i>Mentha piperita</i>	4
II. 1.1.1. Nom vernaculaire	5
II. 1.1.2. Description botanique	5
II. 1.1.3. Répartition géographique	7
II. 1.1.4. Composition chimique	7
II. 1.1.5. Propriétés et utilisations	7
II. 1.2. <i>Mentha pulegium</i>	8
II. 1.2.1. Nom vernaculaire	9
II. 1.2.2. Description botanique	9
II. 1.2.3. Répartitions géographiques	10
II. 1.2.4. Composition chimique	10
II. 1.2.5. Propriétés et utilisations de la menthe pouliot	11
Partie bibliographique chapitre II : Les huiles essentielles et les extraits aqueux	
A. Les huiles essentielles	12
I. Historique des huiles essentielles	13
II. Définition des huiles essentielles	13
II. 1. Répartition et localisation des huiles essentielles	14
II. 2. Propriété physique des huiles essentielles	14
II. 3. Composition chimique des huiles essentielles	15

II. 4. Conservation des huiles essentielles	15
III. Les procédés d'obtention des huiles essentielles	15
III. 1. La distillation	15
III. 2. L'expression	17
IV. Propriété pharmacologique des huiles essentielles	17
IV. 1. Propriété antiseptique	17
IV. 2. Propriétés spasmolytiques et sédatives	17
IV. 3. Propriétés anti-inflammatoires	17
V. Activité antimicrobienne des huiles essentielles	18
V.1. Activité antibactérienne	18
V.2. Activité antifongique	18
B. Les extraits aqueux	19
I. Généralité	19
II. Procédés d'extraction des extraits aqueux	19
Partie bibliographique chapitre III : Micro-organismes étudiés	
I. Généralité sur les microorganismes	21
II. Les bactéries	21
II. 1. <i>Bacillus sp</i>	22
II. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
II. 3. <i>Escherichia coli</i>	25
II. 4. <i>Salmonella sp</i>	26
III. Les champignons	26
III. 1. Les levures	27
III. 1.1. <i>Candida albicans</i>	27
III. 2. Les moisissures	28
III. 2.1. <i>Aspergillus sp</i>	28
Partie expérimentale Matériels et méthodes	

I. Localisation du lieu d'expérimentation	30
II. Matériel	30
II. 1. Matériel biologique	30
II. 2. Matériel de laboratoire	32
III. Méthode d'étude	33
III. 1. Détermination de la matière sèche et du taux d'humidité	33
III. 2. Extraction des huiles essentielles	33
III. 3. Détermination du rendement en huile essentielle	35
III. 3. Préparation des extraits de <i>Mentha pulegium</i> et <i>Mentha pepirita</i>	35
III. 4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	37
III. 5. Détermination de concentration minimale inhibitrice	40
Partie expérimentale Résultats et discussion	
I. Résultat du taux d'humidité de la matière végétale	42
II. Résultats de l'extraction des huiles essentielles	43
II. 1. Caractères organoleptiques	43
II. 2. Rendement en huile essentielle	44
III. Résultat de l'activité antimicrobienne des deux espèces	46
III. 1. Résultat de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	46
III. 2. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux	54
III. 3. Résultat de la détermination de la constatation minimale inhibitrice (CMI)	59
Conclusion	63

Introduction

Introduction

Les plantes sont depuis des siècles une source habituelle de remèdes sous forme de préparations traditionnelles ou de principes actifs purs. D'après une estimation de l'OMS, 80% de la population du globe, ont essentiellement recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire leurs besoins en soins de santé primaires, et on peut présumer que la majeure partie du traitement traditionnel consiste à utiliser des extraits de plantes ou leurs principes actifs (**Norman et al., 1986**).

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire (**Salton et Tomasz, 1974**).

Sans aucun doute, les antibiotiques représentent actuellement l'un des groupes de médicaments les plus employés en médecine. Leur utilisation clinique, dès la fin de la première moitié du 20^{ème} siècle, a radicalement modifié le pronostic des maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Siegenthaler et Luthy, 1978**), c'est à dire des agents antimicrobiens non ou relativement peu toxiques pour l'organisme humain ou animal.

A côté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles ou essences connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique (**Sauvage, 1974**), (**Siddiquiet et al., 1996**) et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire (**Cawthorn, 1995**).

Les huiles essentielles ont un très large spectre d'inhibition comprenant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Remmalet et al., 1993**), des champignons (**Maudsley et Kerr, 1999**) aussi bien que des virus à ADN et à ARN (**Siddiquiet et al., 1996**).

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité (**Basli et al., 2011**). La situation est plus préoccupante du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à plusieurs antibiotiques ce qui constitue un problème de santé important à l'échelle mondiale (**Benbrinis, 2012**), d'où

Introduction

l'importance d'orienter les recherches vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (**Bouhdid et al., 2009**).

Dans le cadre de valorisation des plantes aromatiques et médicinales algériennes, nous sommes intéressés à deux espèces de genre *Mentha* de la famille des Lamiacées, la menthe pouliot et la menthe poivrée qui ont actuellement un intérêt économique et pharmaceutique mondial, considérable. Elles sont très utilisées en médecine traditionnelle; leur pouvoir antimicrobien a été démontré par plusieurs travaux.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha pépirta* et *Mentha pulegium*, obtenues par hydrodistillation, et leurs extraits aqueux sur quelques germes pathogènes.

Partie bibliographique

Chapitre I : Données bibliographiques des plantes

I. Les lamiacées :

La famille des lamiacées ou labiées est aussi nommée labiacées. Celle-ci comprend environ 3000 espèces dont la dispersion est extrêmement étendue avec une prédominance dans les régions méditerranéennes (**Guignard, 1983**). Ce sont le plus souvent des plantes herbacées voire arbustes et plus rarement des arbres (**Helali, 2005**). Elle est l'une des premières à être distinguée par les botanistes grâce à la particularité de ses caractères en générale odorantes, à tiges quadrangulaires (**Messali, 1995**).

Cette famille est caractérisée par des plantes productrices d'huile essentielle dont un grand nombre de genres sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et composés phénoliques. (**Mebarki, 2010 in Saoudi 2013**).

II. Généralités sur la menthe :

Les menthes appartiennent au genre *Mentha* de la famille des labiées. Ce genre comporte une vingtaine d'espèces et un grand nombre de sous-espèces (**Leung et Foster, 1996**), qui s'hybrident facilement entre elles, rendant la taxonomie du genre particulièrement difficile (**Bianchini et corbetta, 1975**).

Elles sont parmi les plantes médicinales les plus anciennes connues ; des archéologues ont découvert ces feuilles dans des pyramides d'Egypte vieilles de 3000 ans (**Benayad, 2008 ; Bianchini et corbetta, 1975**).

Les menthes sont des plantes herbacées vivaces très odorantes, susceptibles de se reproduire à partir de rhizomes ou par marcottage. La menthe se cultive en générale dans les régions humides et froides en hiver. Elle demande un sol peu profond légèrement argileux et non compact riche en humus bien drainé. (**Patrick, 1985 in Korichi, 2007**).

Ce sont des plantes aromatiques très utilisées en médecine traditionnelle dans les préparations culinaires, les confiseries, en cosmétique et en parfumerie (**Delille, 2007**).

II. 1. Systématique :

Tableau 1 : classification botanique des deux espèces *mentha pepirita* et *mentha pulegium* selon (Deysson, 1979) ; (Gaussen *et al.* 1982)

Règne :	Végétal
Sous règne :	plantes vasculaires
Embranchement:	Spermaphyte
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe :	Gamopétales
Série :	Superovariées Tétracyclique
Super ordre :	Tubiflorales
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	<i>Mentha</i>
Espèce 1 :	<i>Mentha pepirita</i> L.
Espèce 2 :	<i>Mentha pulegium</i> L.

II. 1.1. *Mentha piperita* :

La menthe poivrée est une plante assez commune dans les lieux humides (Delille, 2007). Elle est un hybride stérile, issue du croisement entre la menthe aquatique (*Mentha aquatica*) et la menthe verte (*mentha spicata*) (Teuscher *et al.*, 2005 et Schauenberg *et paris*, 2005), et elle est inscrite à la 10ème édition de la pharmacopée française comme tel (Bruneton, 1999).

Selon Valnet, (1984) ; Bézanger-beauquesme, (1980), La menthe poivrée est un hybride entre *Mentha viridis* et *Mentha aquatica*. Alors que ces mêmes auteurs indiquent que *Mentha viridis* et *Mentha spicata* correspondent à la même espèce.



Figure 1 : *Mentha piperita*

Deux principaux types de menthe poivrée sont cultivés

- Menthe poivrée blanche. Var. *piperita palescens* ou « white mint », à tiges et feuilles vert-clair. Elle possède des fleurs blanches, et se caractérise par une odeur fine. Cette variété est fragile et peu cultivée.
- Menthe poivrée noire. Var. *piperita rubescens* ou « black mint », à tiges et feuilles pourprés. Ces fleurs sont brunes rouges. Elle donne une essence moins fine, mais comme elle est robuste c'est cette variété qui est généralement cultivée (Moyse, 1971 in badaoui et haoua, 2013).

II. 1.1.1. Nom vernaculaire :

- Nom scientifique : *Mentha piperita*
- Nom français : menthe poivrée, menthe anglaise (Bianchini et Corbetta, 1975)
- Nom anglais : peppermint (Belanger et Grondin, 2000)
- Nom arabe : nânâ haar (Delille, 2007), nânâ folfoli (Hammami et al., 2005)

II. 1.1.2. Description botanique :

La menthe poivrée est une plante vivace par son rhizome d'une grande vigueur et peut atteindre environ 60 cm de haut (Arnal-Schnebelen et al., 2008). Formant de longs stolons traçants, les uns aériens, les autres souterrains (Teuscher et al., 2005).

II. 1.1.2.1. Les tiges :

Elles sont ramifiées, peuvent atteindre 60 cm de haut (Schmidt, 2011), sont noueuses, quadrangulaires, souvent striées de violet foncé. Certaines portent à leur partie supérieure des poils dressés en arrière (Teuscher et al., 2005).

II. 1.1.2.2. Les feuilles :

Elles sont opposées, écartées presque sur un plan horizontal, toujours pétiolées. Leur limbe est allongé, ovale ou lancéolé. Les feuilles font 4 à 8 cm de long et 1,5 à 2,5 cm de large, elles sont vert à vert-rougeâtre, leur bord est grossièrement dentelé (Fluck, 1977).

II. 1.1.2.3. L'inflorescence :

Les inflorescences des fleurs faiblement bilabiées de couleur pourpre, sont groupées en épis très serrés (Bruneton, 1999).

II. 1.1.2.4. Les fleurs :

Elles sont violacées, forment des épis très courts, ovoïdes à l'extrémité des rameaux (Benayed, 2008 et Edrisi, 1982).

- **Le calice** : il est faiblement velu, comporte 5 dents lancéolées et acuminées non concaves.
- **Les étamines** : elles sont au nombre de 4, de taille identique et écartées l'une de l'autre (Teuscher et al., 2005).
- **La corolle** : elle est en forme d'entonnoir presque régulier, forme 4 lobes de couleur rouge pâle à rose-violet (Guignard, 1983).
- **L'ovaire** : il est formé de loges biovulées (Teuscher et al., 2005).

II. 1.1.2.4. Les fruits :

Le fruit est un tétrakéne ovoïde refermant 4 graines de couleur brun marron. La plupart des graines avortent car les cultivars sont généralement stériles (Arnal-Schnebelen et al., 2008).

II. 1.1.2.5. La floraison :

Elle s'étend de juin jusqu'à juillet (Delille, 2007).

II. 1.1.3. Répartition géographique :

- **Dans le Monde :** La menthe poivrée est originaire d'Angleterre mais elle est assez répandue dans le bassin méditerranéen (**Teuscher et al., 2005**). Elle est communément cultivée en Europe, en Amérique du Nord et dans certains pays d'Afrique (**Hosein et Rogers, 2005**).
- **En Algérie :** la plante est une spontanée des régions humides, mais elle est plus retrouvée à l'état cultivé (**Delille, 2007**).

II. 1.1.4. Composition chimique :

Les huiles essentielles de la menthe poivrée représentent de 1 à 3 % de la masse de la matière sèche qui renferme de nombreux composés tels que les flavonoïdes (en particulier des flavones polysubstitués fréquentes chez les lamiaceae), triterpènes, carotinoïdes, mais le constituant majoritaire est toujours le menthol 30 à 70% (**Bruneton, 1999**), ainsi que menthone (teneur comprise entre 15 et 76%), acetate de menthyl (2 à 5% voire jusqu'à 23%), 1,8-cinéole (3 à 8%), menthofure (0 à 7%), néomenthol (2.5% à 5%), et pulegone (0,5 à 1,5%). Ces constituants majoritaires sont accompagnés d'hydrate de trans-sabinène, de pipéritenone, d' α et β -pinènes et de veridiflorol, et d'autres constituants chimiques à très faible quantité (**Teuscher et al., 2005**).

II. 1.1.5. Propriétés et utilisations :

II. 1.1.5.1. Propriétés :

La saveur aromatique de cette menthe provoque une stimulation réflexe des sécrétions salivaires et gastriques, d'où ses propriétés apéritives et digestives (**Verdrager, 1978**).

II. 1.1.5.2. Utilisations :

La menthe poivrée est une plante aux nombreuses propriétés médicinales et thérapeutiques selon l'usage :

- **Usage culinaire :**

Il est toujours utile de faire cuire quelques feuilles de menthe avec les plats gras et lourds afin de faciliter la digestion. Dans les salades ou soupes, une feuille de menthe peut donner une saveur particulière au plat. Elle est très appréciée comme garniture de nombreux dessert (**Schmidt I, 2011**).

- **Utilisation commerciale :**

La menthe sert de condiment dans plusieurs pays et entre dans la composition de certaines sauces. On prépare des liqueurs et des sirops à base de menthe. On utilise même l'arôme de la menthe pour les bonbons et les confiseries. Son odeur est également utilisée dans les parfumeries, (**Baba aissa, 1999**).

- **Usage médicinal :**

- **En usage externe :**

La menthe s'utilise également sous forme de cataplasme ou par inhalation. Elle soulage les maux de tête, et traite l'inflammation des voies respiratoires et de la muqueuse buccale. Elle soulage les symptômes du rhume et de la toux, les douleurs rhumatismales musculaires et névralgiques (**Penelope Ody, 1995**).

Elle traite encore les parasites de la peau (acné dermatite, démangeaisons cutanées). Elle est antiseptique et s'utilise contre les courbatures ; elle est relaxante. (**Branger, 2004**)

- **En usage interne :**

Sous forme d'infusion, la menthe poivrée s'utilise surtout contre les troubles digestifs (spasmes, inflammations, colites, états nauséux), mais aussi contre l'hypotension (améliore la concentration) (**Benthin et Col, 1999**).

Ses infusions sont utilisées dans les cas de digestions difficiles et dans certaines affections d'origine nerveuse. (**Laredj, 2004**)

II. 1.2. *Mentha pulegium* :

Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de pulex, la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces (**Lambinon, 1965**). C'est une espèce aromatique, qui pousse à l'état sauvage dans la région méditerranéenne. Elle est à l'origine de nombreux cultivars (**Beguin, 1977**).



Figure 2 : *Mentha pulegium* (Collin, 2007).

V. 1.2.1. Nom vernaculaire : selon (Delille, 2007) et (Ait youssef, 2006).

- Nom scientifique : *Mentha pelugium*
- Nom anglais : pennyryal
- Nom français : herbe aux puces, menthe pouliot, herbe de saint-laurent, menthe des prés
- Nom arabe : Fliou.
- Nom berbère : temarsa

II. 1.2.2. Description botanique :

La menthe pouliot est une petite plante vivace très odorante qui peut atteindre 40 cm de haut (Collin, 2007). Elle est commune dans les régions humides (Delille, 2007).

II. 1.2.2.1. Les tiges :

Elles sont rampantes ou dressées et peuvent atteindre 30cm de hauteur. Elles sont rameuses, grêles et de section quadrangulaire. Elles sont pubescentes et de couleur rougeâtre légèrement velues (Ait youssef, 2006).

II. 1.2.2.2. Les feuilles :

Elles sont opposées, à pétioles courts, simples et de forme ovale. Elles sont longues de 15 mm à 25 mm, plus ou moins dentées sur les bords (Beloued, 2001).

II. 1.2.2.3. L'inflorescence :

L'inflorescence est formée de nombreux verticillastres (fleurs disposées en verticales), ces verticilles étant axillaires denses, feuillés et distants les uns des autres, étagés le long de la tige : ils diminuent de grosseur au fur et à mesure qu'ils approchent du sommet de la tige (**Ait youssef, 2006**).

II. 1.2.2.4. Les fleurs :

Elles sont pédiculées, purpurines, roses, ou blanches réunies par verticilles qui approchent du sommet et forment par leur ensemble des épis droits (**Delille, 2007**).

- **Le calice** : Velu, tubuleux à gorge fermée par des poils connivents, subbilabiés à 5 dents inégales, ciliées, les deux inférieures plus étroites (**Beloued, 2001**).
- **La corolle** : Elle est à pétales soudées ; elle est en forme d'entonnoir, de couleur violet pâle (**Ait youssef, 2006**).
- **Les étamines** : Elles sont au nombre de 4 saillantes et de taille identique.
- **L'ovaire** : Il est supère, à 2 feuillets et divisé en 4 lobes (**Teuscher et al., 2005**).

II. 1.2.2.4. Les fruits :

Le fruit est un tétrakène, chaque akène renfermant une graine d'environ 0.5mm de long et d'un brun brillant. (**Teuscher et al., 2005**).

II. 1.2.2.5. La floraison :

La floraison a lieu en été de juillet jusqu'à août (**Beloued, 2001**).

II. 1.2.3. répartitions géographiques :

- **Dans le monde** : la menthe pouliot est très répandue dans le bassin méditerranéen ainsi qu'en Europe du sud au Moyen-Orient et dans la péninsule arabique.
- **Au Maghreb** : elle est très répandue au Maroc où elle se rencontre partout dans les endroits humides ; On la trouve également dans les autres pays du Maghreb comme l'Algérie et la Tunisie.
- **En Algérie** : Elle est assez commune, surtout dans les Tell. On la trouve surtout dans les lieux inondés en hiver (**Ait youssef, 2006**).

II. 1.2.4. Composition chimique :

L'huile essentielle de la menthe pouliot est surtout riche en pulégone à raison de 14% à 90%. Celle-ci est accompagnée de menthone (10% à 31%), de néoisomenthone

jusqu'à 21%, d'isomenthone (2% à 10%), pipériténone (0,5% à 2.5%), d'acétate de néoismenthyle (0,3% à 8%) 1,8-cineole et bornéole. Dans les plantes trouvées à l'état sauvage, le rapport de cétone varie énormément (**Teuscher et al., 2005**).

II. 1.2.5. Propriétés et utilisations de la menthe pouliot :

II. 1.2.5.1. Propriétés :

Le caractère aromatique de sa saveur est à l'origine des propriétés apéritives et digestives. Son huile essentielle est insecticide (**Teuscher et al., 2005**), et présente des propriétés antimicrobiennes sur les bactéries et les champignons (**Mahboubi et Haggi, 2008**).

II. 1.2.5.2. Utilisations :

- **Usage médicinal :**

Elle est employée afin d'éliminer les vers intestinaux. Elle fait baisser la fièvre, et favorise la sécrétion des muqueuses. (**Iserin, 1997**)

- **Usage interne :**

Utilisée sous forme d'infusion, elle est très appréciée en cas de refroidissement, et de douleurs intestinales (**Collin, 2007**).

Elle peut être aussi utilisée en décocté dans les cas de gastralgie et dans les cas de diarrhée (**Ait youssef, 2006**).

- **Usage externe :**

Les feuilles fraîches appliquées en cataplasme arrêtent la sécrétion lactée. (**Collin, 2007**). Elle est aussi utilisée par aérosol en inhalation dans les cas de rhume, maux de gorge, de toux, et de bronchites. Elle est considérée comme la plante par excellence des maladies de l'hiver (**Teuscher et al., 2005**).

- **Usage culinaire :**

Au même titre que la menthe verte, la menthe pouliot est surtout employée pour agrémenter les farces et les pâtes relevées (**Teuscher et al., 2005**). Aussi utilisée en complément ou en remplacement de la menthe douce, dans la préparation du thé. (**Collin, 2007**)

- **Usage industriel :**

On l'utilise surtout pour parfumer les savons et les détergents (**Andeas, 1998**). Elle entre aussi dans les préparations des sirops, de confiseries, elle sert également à parfumer les produits d'hygiène buccale (**Teuscher et al., 2005**).

- **Usage agricole :**

L'huile essentielle de la menthe pouliot a un effet insecticide (**Lamin et al., 2001**). La menthe éloigne les pucerons, elle est donc utile pour protéger d'autres cultures (**Garnero, 1991**).

Chapitre II : les huiles essentielles et extraits aqueux

A. Les huiles essentielles :

I. Historique des huiles essentielles :

L'utilisation des huiles essentielles (parfums et aromates) remonte à l'Antiquité (**Sallé, 1991**). Les huiles essentielles sont des substances naturelles existant depuis l'antiquité. Les arômes et les parfums furent parmi les premiers signes de la reconnaissance qui marquèrent la vie de l'homme (**Mengal et al, 1993**).

Les traces d'utilisations d'aromathérapie retrouvées au Pakistan ont plus de 7000 ans sur terre (**Yoredon, 2004**). On retrouve des écrits qui montrent que les Egyptiens savaient distiller des essences de conifères 40 siècles avant J-C (**Sallé, 1991**).

Les Romains et les grecs utilisaient également les aromates pour parfumer leur bain (**Sallé, 1991**). Mais ce sont les arabes qui mirent au point la technique d'hydro-distillation (entraînement à la vapeur d'eau) (**Roux, 2005**).

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Paracelsus Von HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**Burt, 2004**).

II. Définition des huiles essentielles :

On appelle huiles essentielles (ou parfois essence végétale) le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques volatiles d'une plante. Elles sont obtenues par distillation ou extraction chimique, par solvant (eau, alcool). Contrairement à ce que suppose la dénomination, ces extraits ne sont pas forcément huileux (**paris, 1981 in Lahrech, 2010**).

Le terme « huile » provient du fait que la substance volatil est visqueuse et hydrophobe. La dénomination « essentielle » reflète le caractère principal des plantes à dégager des odeurs agréables (**El Abed et al., 2004**).

Pour la 8^{ème} édition de la pharmacopée française 1965, les huiles essentielles (= essence = huile volatile) sont : des produits de composition généralement assez complexes, renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (**Bruneton, 1993**).

Selon la norme AFNOR NFT 75-006 (**Février, 2000**), l'huile essentielle est un « Produit obtenu à partir de matière première végétale, soit par entraînement à la

vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par un procédé physique».

II. 1. Répartition et localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles. **(Bruneton, 1993)**. Ces huiles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (rose, jasmin), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorce (cassia, cannellier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane, citron), ou grains (carvi) **(Hernandez-Ochoa, 2005)**

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. On distingue des cellules à huiles essentielles chez les lauracées, des poils sécréteurs chez les lamiacées, des poches sécrétrices chez les myrtacées et les rutacées et les canaux sécréteurs chez les opiacées ou des astéracées **(Bruneton, 1993)**.

II. 2. Propriété physique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeur très forte, généralement incolores ou jaune pâle et quelques fois bleue **(Charpentier et al., 2008)**.

Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C, de densité généralement inférieure à 1, la plus dense reste l'huile essentielle de wintergreen à 1,187 **(Durafourd et Lapraz, 2002)**. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée **(Bruneton, 1999)**.

Ces essences sont solubles dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes. Elles sont insolubles dans l'eau à laquelle toutefois elles communiquent leurs odeurs **(Sallé, 1991)**. Exposées à la lumière et à l'oxygène les huiles essentielles s'oxydent, se résinifient, leur odeur change, leur point d'ébullition augmente et leur solubilité diminue **(Cheik Ali et Abbas, 2011)**.

II. 3. Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Le groupe des terpénoïdes,
- Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils aussi dit :

- Composés d'origines diverses (**Bruneton, 1999**)

II. 4. Conservation des huiles essentielles :

Selon **Moro (2008)**, les huiles essentielles doivent être protégées de la lumière de la chaleur, de l'air, de l'humidité et des écarts de température dans des flacons en verre teinté, en position verticale et dans un lieu sec et frais.

III. Les procédés d'obtention des huiles essentielles :

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans altérer la qualité (**Lardy et Haberkorn, 2007**).

Selon **Sallé (1991)**, il existe plusieurs procédés d'extraction des matières aromatiques donnant les huiles essentielles. Les plus distinctes sont :

- La distillation
- L'expression
- L'enfleurage
- L'extraction par solvants organiques volatils

III. 1. La distillation :

C'est la méthode la plus employée pour récupérer les huiles essentielles. Elle représente 80% de la récupération des huiles (**Sallé, 1991**).

Selon **Piochon (2008)**, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation :

- Hydro-distillation
- L'entraînement à la vapeur d'eau
- Hydro-diffusion

III. 1.1. hydrodistillation :

C'est le procédé le plus ancien. La plante aromatique (entière ou brayée) placée dans un alambic, est immergée dans l'eau, portée à ébullition, l'eau à l'état vapeur en passant à travers le matériel végétal entraîne l'huile essentielle ; elle est refroidie et condensée dans un serpentin. L'huile essentielle est séparée de l'eau par différence de densité dans un vase florentin. L'huile obtenue est une florale ou hydrolat aromatique, elle referme des molécules aromatiques (**Raynaud, 2006**).

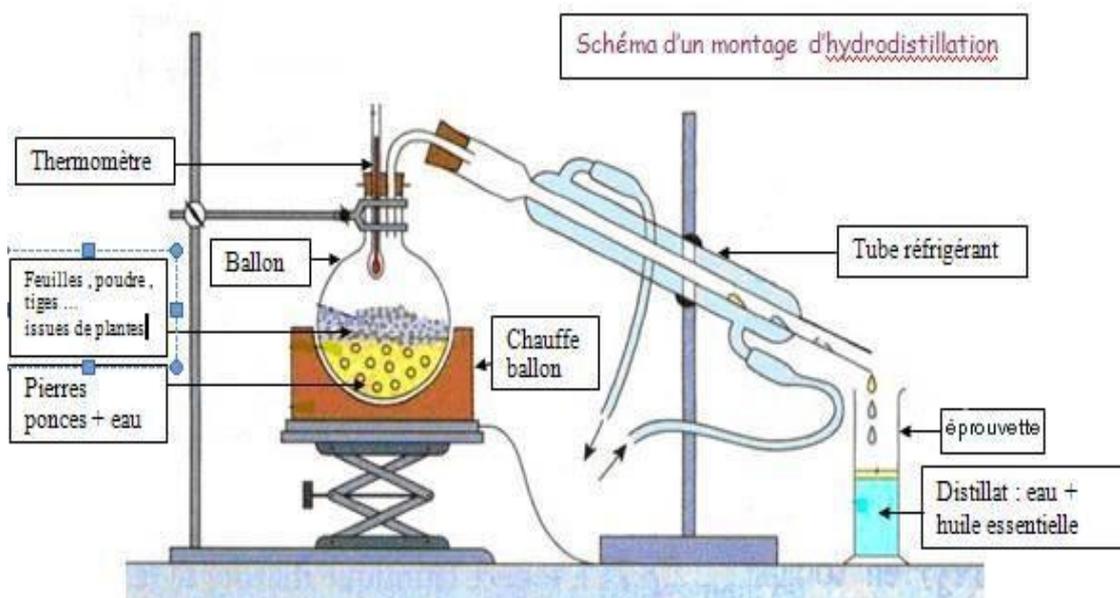


Figure 3 : Schéma du dispositif de l'hydrodistillation (**Khebri, 2011**).

III. 1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact directe l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau traverse la matière végétale, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Ces vapeurs saturées en composés organique volatil sont condensés et récupérées par décantation (**Lucchesi, 2005**)

III. 1.3. Hydrodiffusion :

Ce procédé consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La composition des produits obtenus est moins endommagée que celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (**Bruneton, 1999**).

III. 2. L'expression :

Elle est réservée aux agrumes par suite de la localisation superficielle de l'essence. Il s'agit d'un procédé mécanique dans lequel le fruit entier est placé dans des tambours relatifs munis de pointes en acier qui déchiquète le péricarpe, l'huile essentielle est entraîné par l'eau, le mélange est centrifugé et l'on recueille directement une huile essentielle extrêmement naturelle est pure (**Jean et al., 2009**).

IV. Propriété pharmacologique des huiles essentielles :

IV.1. Propriété antiseptique :

Ce pouvoir antiseptique s'exerce à l'encontre de bactéries pathogènes variées, y compris les souches habituellement résistantes. Certaines huiles essentielles sont également actives sur des champignons responsables de mycoses et sur des levures (*Candida*) (**Bruneton, 1999**).

IV. 2. Propriétés spasmolytiques et sédative :

Les huiles essentielles (menthe, verveine, ...) sont réputées efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux. Il est fréquent qu'elles stimulent la sécrétion gastrique d'où les qualificatifs de « digestives » et de « stomachiques ». Elles sont également utilisées dans certains cas d'insomnies, et de trouble psychosomatique (**Bruneton, 1999**).

IV. 3. Propriétés anti- inflammatoire :

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Ainsi, l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* agit en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateur de l'inflammation (**Piochon, 2008**).

IV. Activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobienne appartiennent à la famille des Labiées : menthe, thym, origan, lavande, romarin, sauge. Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies, certains auteurs attribué l'activité antimicrobienne des composés aromatiques à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988).

V.1. Activité antibactérienne :

Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Guinoiseau, 2010).

- **Mode d'action :**

Très peu d'étude ont porté sur le mode d'action des huiles essentielles vis-à-vis des différentes souches de bactéries, cependant plusieurs observations ont été notées :

- Interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- Altération des systèmes enzymatiques dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure
- Destruction ou inactivation du matériel génétique. (Daferera *et al.*, 2003).

V. 2. Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux acteurs contre les moisissures allergisantes, et contre les champignons pathogènes tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* (Cox., 2000 in Sisaber, 2012).

- **Mode d'action :**

Les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels, tels que les phénols et les aldéhydes, exercent leurs pouvoirs antifongiques sur la biomasse et la production des pseudo-mycéliums des levures alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Daroui-Mokaddem, 2012).

B. Les extraits aqueux :

I. Généralité :

Les plantes médicinales sont employées dans le monde entier depuis des milliers d'années, les présentations et préparations phytothérapeutiques ont évolué de façon très diverses. Elles sont utilisées sous des formes très différentes d'un pays à l'autre et selon leurs indications (**Sallé, 1991**).

Le savoir de préparation et d'utilisation des extraits de plantes médicinales est transmis d'une génération à une autre, avec l'ignorance des effets exacts ou le mode d'action des composants de ces extraits sur l'organisme humain jusqu'au dernier siècle ce qu'on appelle la révolution scientifique et les progrès dans tous les domaines médecine, pharmacie, biologie, botanique, pharmacologie, toxicologie, pharmacognosie... (**Fournier, 1999 in Djedioui, 2010**).

Actuellement, les extraits bruts des plantes commencent à avoir un intérêt très prometteur comme source potentielle de molécule bioactive. Les extraits végétaux font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour les traitements bactéricides et fongicides et autre traitement (**Yakhlef, 2010**).

II. Procédés d'extraction des extraits aqueux :

Un extrait aqueux est obtenu par un procédé de macération, infusion, décoction dans laquelle le liquide obtenu est un mélange d'eau qui dissout les substances actives contenues dans une plante médicinale par explosion des cellules végétales. En d'autres termes, c'est le pouvoir d'une plante médicinale transformée en médicament. Cependant les extraits aqueux doivent être utilisés de suite ou dans une période de temps très courte. La dégradation biochimique et la contamination microbienne font que rapidement ces préparations ne sont plus aptes à la consommation humaine, parce qu'elles perdent leurs propriétés curatives (**Darr, 1981**). Parmi les préparations des extraits aqueux on distingue :

- **La macération :**

Le liquide de macération peut être de l'eau ou de l'alcool. Pour l'eau les plantes sont mises dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou 12 heures, en principe). Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine d'heures, par risque d'oxydation et de fermentation du liquide (**Pierre et Lis, 2007**).

- **L'infusion :**

Elle consiste à verser l'eau bouillante sur les plantes fraîches ou sèches en laissant reposer la mixture pendant 10 à 15 minutes (**Sofowora, 2010**).

- **La décoction :**

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, 2 ou 3 minutes pour les tiges, les feuilles et les fruits, 5 minutes ou plus pour les écorces et les racines (**Pierre et Lis, 2007**).

- **Filtration :**

Après une période prédéfinie en fonction de la plante, la masse est filtrée pour séparer le liquide de la matière végétale solide (**Darr, 1981**).

Chapitre III : micro-organismes étudiés

I. Généralité sur les microorganismes :

Les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans la nature, participant aux cycles des éléments chimiques et entretenant des relations nombreuses et variées avec les autres êtres vivants. Certaines de ces relations se manifestent au niveau de tube digestif et influencent directement le processus de digestion.

Un micro-organisme est un organisme vivant, le plus souvent végétal, que l'on peut seulement observer à l'aide d'un microscope.

Les micro-organismes peuvent être classés en cinq groupes majeurs : les virus dépourvus de structure cellulaire, les protozoaires qui sont de structures unicellulaires, les bactéries, les levures et les moisissures (**Nout et al, 2003**).

II. Les bactéries :

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire ; ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).

Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1 μm . On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (Cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'au microscope électronique (**Nauciel et Vildé, 2005**).

La membrane cytoplasmique assure les échanges de la cellule avec l'extérieur, et renferme le cytoplasme contenant de nombreux ribosomes et un chromosome fait d'ADN à double brin (**Nauciel et Vildé, 2005**). Le tout est protégé d'une paroi à structure rigide et complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif et leur permettant de résister à la lyse osmotique. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pili, ou une capsule à l'extérieur de la paroi (**Hart et Shears, 1997**).

Les bactéries sont aérobies ou anaérobies et ceci d'une manière stricte ou facultative. Les aérobies ont besoin d'oxygène pour vivre. Les anaérobies sont détruits par l'oxygène, ils ne peuvent vivre qu'en absence d'oxygène et pour les anaérobies facultatifs, l'oxygène n'a pas d'influence sur leur vie (**Nout et al, 2003**).

II. 1. *Bacillus sp* :

II. 1.1. Habitat :

La plupart des espèces sont saprophytes et très répandues dans la nature, les spores leur confèrent une très grande résistance dans le milieu extérieur. Ce sont des germes telluriques que l'on rencontre également dans l'eau et l'air ainsi que dans les produits alimentaires (Denis et al., 2007).

II. 1.2. Caractères culturels :

La plupart des espèces se développent mieux à 28°C-33°C jusqu'à 37°C, les bacilles sont aérobie ou anaérobie facultative. La plupart des espèces se développent bien sur milieu de culture usuel, les milieux favorables pour l'identification sont la gélose nutritive à pH 6 (Avril et al, 1992).

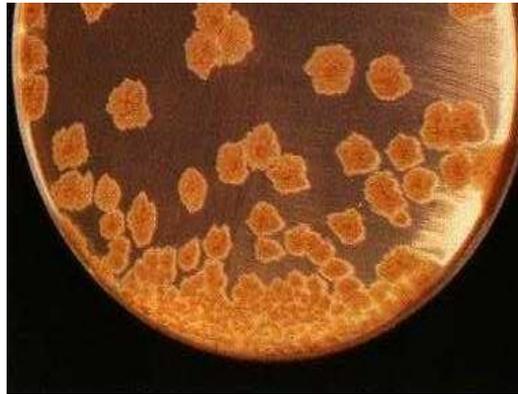


Figure 4 : *Bacillus* cultivé sur gélose nutritive (Avril et al., 1992).

II. 1.3. Caractère morphologique :

Bacillus sont des bacilles (bâtonné) à gram positif de 3 à 5 μm sur 1,25 μm avec souvent des extrémités carrées. Les *Bacillus* sont le plus souvent mobiles par ciliature pérित्रиче Sauf *Bacillus anthracines* (Avril et al., 1992).

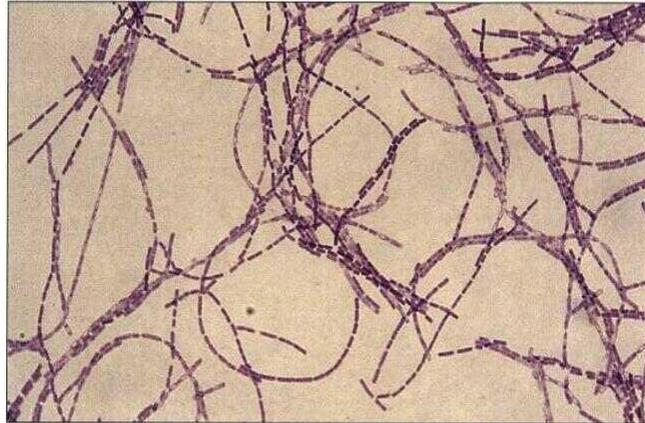


Figure 5 : Aspect morphologique de *Bacillus*, de longs bacilles disposés en chaînettes (HART et SHEARS, 1997)

II. 1.4. Pouvoir pathogènes :

Certain *Bacillus* comme *B. cereus* peuvent surinfecter des plaies traumatiques, provoquer des infections oculaires graves et parfois être à l'origine de toxi-infection alimentaire (Nauciel et Vildé, 2005).

II. 2. *Pseudomonas aeruginosa* :

II. 2. 1. Habitat :

C'est une bactérie qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide, cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. (Avril et al., 1992).

Les bacilles sont largement répandus dans le sol, l'eau, les eaux d'égouts et l'air. *Pseudomonas aeruginosa* fait souvent partie de la flore normale, en nombre réduit. On la retrouve aussi sur la peau humaine (Jawetz et al., 1973 ; Nauciel, 2001).

II.2.2. Caractère morphologique :

Ce sont des bacilles Gram négatif de 1 à 3 μm de long et 0.5 à 1 μm de large , mobiles grâce aux flagelles, parfois entourés d'une pseudo-capsule appelée slime. Elles produisent des pigments hydrosolubles se diffusant dans le milieu (Avril et al., 1992).

II.2.3. Caractères cultureux :

Les *Pseudomonodaceae* peuvent être cultivés facilement sur tous les milieux à 37°C ou 30°C (Avril et al., 1992).

Ils constituent le modèle des bactéries aérobies strictes, c'est-à-dire à métabolisme strictement respiratoire, dépourvues de métabolisme fermentatif des glucides. (Meyer et al., 2004).

Il ne fermente pas le lactose et forme des colonies lisses et arrondies, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier, de couleur fluorescente verdâtre et d'odeur aromatique douceâtre.

Parmi les pigments produits par la *P. aeruginosa*, il y a la pyocyanine, et la fluorescéine (Jawetz et al., 1973).

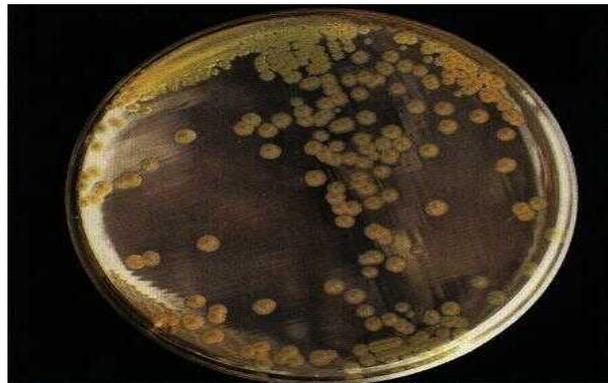


Figure 6 : *Pseudomonas aeruginosa*, sur gélose nutritive (Avril et al., 1992).

II. 2.4. Pouvoir pathogènes :

P. aeruginosa n'est pathogène que lorsqu'elle s'introduit dans des zones dépourvues de défenses normales.

- ✓ Elle infecte des plaies, produisant du pus bleu vert.
- ✓ Cause la méningite lorsqu'elle est introduite par ponction lombaire.
- ✓ Cause des infections urinaires lorsqu'elle est introduite par des solutions d'irrigation.
- ✓ Elle provoque des infections oculaires (endophtalmie).

P. aeruginosa résiste à la plupart des agents antimicrobiens (Jawetz et al., 1973 et Nauciel, 2001).

II. 3. *Escherichia coli* :

II. 3.1. Habitat :

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif humain et animal. *E. coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particulière (Nauciel, 2001).

La source principale d'*E. coli* est la viande hachée peu cuite, elle se trouve aussi dans les selles des malades et elle est prédominante de la flore normale du colon humain et animal (Dromigny, 2011).

II. 3.2. Caractères cultureux :

E. coli se développe à 37 °C et se divise en moins de 20 minutes sur les milieux gélosés en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre (Avril et al., 1992). *E. coli* est une bactérie aérobie facultative. Elle a relativement peu d'exigences nutritionnelles, la cellule se développe et se multiplie abondamment en présence d'une source d'énergie (le glucose), d'une source d'azote et de quelques sels minéraux (Jawetz et al., 1973).

II. 3.3. Caractère morphologique :

Ce sont des bacilles à Gram négatif, appartenant à la famille des Entérobactériaceae et au genre *Escherichia*. *E. coli* appartient au groupe des bactéries coliformes (Dromigny, 2012).

Elle est de forme non sporulée, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 0.8 µm, (Percival, 2004 ; Garrett et Grisham, 2000).

II. 3.4. Pouvoir pathogène :

E. coli est responsable de colites hémorragiques (diarrhée aqueuse puis sanglante, avec crampes abdominales) (Leyral et Vierling, 2007)

Elle provoque des infections (urinaires, intestinales), une infection néonatale qui peut se traduire par une méningite ou une septicémie (Nauciel, 2001).

II.4. *Salmonella sp* :

Les différentes espèces sont en relation étroite du point de vue antigénique (**Jawetz et al., 1973**)

II. 4. 1. Habitat :

Les Salmonelles sont des bactéries de l'intestin. Chez de nombreux sujets, elles peuvent être présentes sans entraîner des symptômes (porteurs sains).

Quelques sérovars sont spécifiquement humains : Thyphi et Paratyphi, d'autres ne se rencontrent que chez l'animal (**Nauciel, 2001**).

II. 4. 2. Caractère morphologique :

Les Salmonelles sont des bacilles à Gram négatif qui ne forment pas des spores et qui varient en longueur. La plupart des espèces sont mobiles grâce à des flagelles péritriches (**Jawetz et al, 1973**).

II.4. 3. Caractères culturels :

Les salmonelles sont des bactéries aéro-anaérobies facultatif qui poussent sur gélose nutritive à température optimale de 37°C, les colonies sont lisse, centre noir, bord régulier, translucide, rondes légèrement bombées (**Pilet et al, 1987**).

II. 4.4. Pouvoir pathogène :

- ✓ Dans toutes les formes d'infections à *Salmonella sp*, les organismes entrent par voie orale et peuvent produire 3 types principaux de maladie :
- ✓ Fièvre entérique, septicémie, gastro-entérite (**Jawetz et al, 1973**)

II. Les champignons :

Les microbiologistes utilisent le terme mycète pour désigner des organismes eucaryotes. Ils possèdent donc un noyau entouré d'une membrane nucléaire, ainsi que différents types d'organites cytoplasmiques limités par des membranes. Ils peuvent constituer des assemblages de grande taille (**Hart et Shears, 1997**), porteurs de spores, dont la nutrition se fait par absorption, dépourvus de chlorophylle et se reproduisent de façon sexuée et asexuée (**Prescott et al., 2003**).

II. 1. Les levures :

Les levures sont des organismes unicellulaires, généralement plus grandes que des bactéries, leur taille varie considérablement, elles sont sphérique ou de forme ovoïde. Elles n'ont pas de flagelle mais possèdent la plupart des organites des autres cellules eucaryotes

Elles possèdent une paroi cellulaire rigide de structure analogue à celle des filaments. La plupart des levures se divisent par bourgeonnement, très peu par division binaire comme les bactéries (**Prescott et al., 2003**).

III.1.1. *Candida albicans* :

III. 1.1.1. Habitats :

Les *Candida albicans* sont des champignons opportunistes, habituellement commensales des muqueuses digestives et urogénitales chez l'homme (**Beucher, 2007**), ainsi, sa présence sur la peau n'est pas habituelle et peut provoquer un état pathogène (**Moulinier, 2003**).

III.1.1.2. Caractère principaux :

Les levures du genre *Candida* se présentent sous forme de petite cellule, ovoïde mesurant de 3 à 7 µm de long (**Beucher, 2007**)

C. albicans est une levure non pigmentée, non capsulée à bourgeonnement multiple et forme un pseudo-mycélium et du mycélium vrais (**Moulinier, 2003**).

En culture sur gélose les colonies sont rondes de couleur blanche crémeuse (**Graser et al, 1996**).

La culture et l'isolement en boîte pétri de *Candidat albicans* est réalisé sur milieu Sabouraud ou gélose au sang (**Hark et Shears, 1997**)

Certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu peuvent influencer l'aspect morphologique de cette levure (**Buffo, 1984**)

III.1.1.3. pouvoir pathogène :

La candidose est la mycose causée par le mycète *Candidat albicans*, (**Prescott et al., 2003**). Ces levures sont susceptibles de devenir pathogène et d'envahir le tissu superficiel ou profond sur certains terrains immunodéprimés.

Il existe plusieurs facteurs prédisposant à la survenue d'une candidose physiologique (âge, grossesse) pathologique (Sida) médicamenteuse ou encore chirurgicale (**Beucher,**

2007) chez les nouveau-nés, la candidose orale est une maladie très fréquente. Elle est révélée par le nombreuses petites plaques blanches couvrant la langue et la bouche (**Prescott et al., 2003**).

III.2. Les moisissures :

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (**Nicklin et al., 2000**).

III.2.1. *Aspergillus sp* :

Les *Aspergillus* sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins. Près de 300 espèces composent ce genre (**Anonyme, 2014**).

III.2.1.1. Habitat :

Ces champignons filamenteux vivent en saprophytes et sont retrouvés dans l'atmosphère, le sol, les débris végétaux en décomposition, les graines alimentaires (**Hoog et al., 2000 in Amari, 2005**).

III.2.1.2. Caractère morphologique :

Les *Aspergillus sp* sont des champignons filamenteux ramifiés, septés de 7-10 µm de diamètre, ils sont classés selon leurs structure clinique et par leurs structure asexuées (**JOHN SPICER, 2002**).

III.2.1.3. Caractères culturels :

Aspergillus sp présente en culture une couleur et d'aspect variable (bleu, jaune, vert ou brun à noir) et d'aspect poudreux, cotonneux ou velouté. Ils sont caractérisés par des têtes aspergillaires et unisériées (**Onions et al., 1981**).

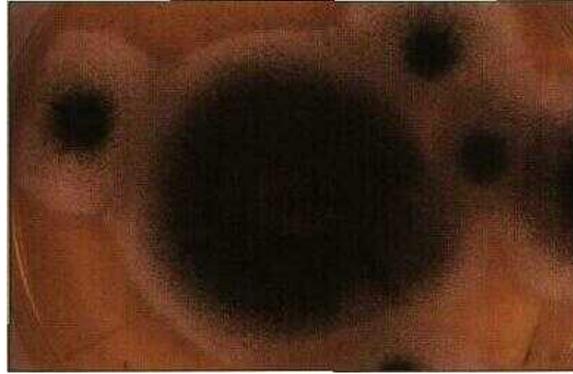


Figure 7 : Culture d'Aspergillus sur gélose de Sabouraud glucosée (**HART et SHEARS, 1997**).

Aspergillus sp pousse bien sur milieu de Sabouraud glucosé à une température de 25°C à 37°C, ainsi que sur milieu au malt pour favoriser la sporogénèse (**Moulinier, 2002**).

La culture se fait également sur milieu Czpek, qui facilite le diagnostic, en favorisant le développement des pigments aux couleurs caractéristiques des espèces (**Riper 2013**).

III.2.1.4. pouvoir pathogène :

Les aspergilloses sont des mycoses (surtout pulmonaires) dues au développement d'un champignon filamenteux du genre *Aspergillus*.

L'*Aspergillus* s'infecte chez l'homme par inhalation des spores et pénétration jusqu'au niveau des alvéoles où elles germent et causent une Aspergillose (**Pebret, 2003**).

Partie expérimentale

Matériels et Méthodes

Dans le présent chapitre, on décrira la partie expérimentale dans laquelle les points suivants y seront développés :

- Récolte et séchage des plantes étudiées
- Extraction des huiles essentielles des deux plantes choisies
- Elaboration d'extraits aqueux des plantes choisies
- Test biologique sur des souches bactériennes et fongiques

I. Localisation du lieu d'expérimentation :

Notre travail a été réalisé durant la période allant de mars à la fin du mois d'octobre dans deux laboratoires différents :

- l'extraction de l'huile essentielle au niveau du laboratoire de BPMA au niveau du département de Biotechnologie université de Blida.
- La valorisation de l'activité antimicrobienne au niveau du laboratoire d'hygiène de l'hôpital universitaire, CHU de Blida.

II. Matériel :

II.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique est constitué de matériel végétal et de matériel bactériologique.

II.1.1. matériel végétal :

Le matériel végétal est représenté par la partie aérienne de deux espèces de menthe *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*.

II.1.1.1. Localisation du lieu de récolte et identification :

➤ *Mentha piperita* a été acquise fin mai 2014 dans un marché urbain, à l'état frais sous forme de bottes d'environ 70g, 40 bottes ont été acquises.

L'identification a été faite conformément au critère botanique cité par les différents auteurs: **Delille, 2007 ; Fluck, 1977 et Marmouz, 2012.**

➤ *Mentha pulegium* a été récolté au niveau de la station Oued Mouzaia secteur El Hamdania début mai 2014. La récolte a été effectuée de façon aléatoire durant le stade préfloraison, de 09h30 jusqu'à 11h30, environ 3 kg de la partie aérienne ont été cueillis.

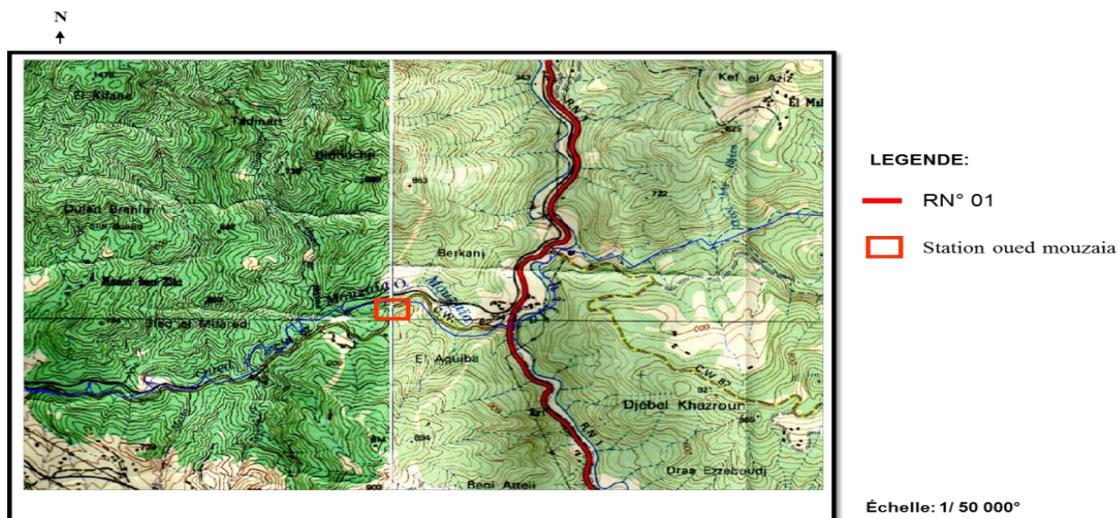


Figure 8 : Localisation de la station de récolte Oued Mouzaia du secteur El Hamdania.

La zone de récolte est située dans le secteur d'El Hamdania, parc national Chréa commune de Tamezghida willaya de Médéa. Celle-ci est comprise entre $36^{\circ} 20' 1.1''$ de latitude nord et $2^{\circ} 45' 42.6''$ de longitude est. Elle est située à 388 m d'altitude.



Figure 9 : Station de récolte Oued Mouzaia

L'identification botanique de l'espèce a été confirmée en comparaison avec l'herbier du parc national de Chrea, secteur El Hamdania.

II. 1.1.2. Séchage et stockage du matériel végétal :

Les parties aériennes des deux espèces de menthe sont mises à sécher, étalées en couches minces sur du papier, à une température ambiante, pendant 15 jours, dans un endroit aéré et à l'ombre, pour mieux conserver les molécules sensibles à la lumière et à la chaleur. Les échantillons sont retournés de temps en temps afin d'éviter tout risque de fermentation qui pourrait altérer la qualité des essences.

Après séchage, les échantillons sont découpés en petits morceaux et mis dans des sacs en papier et conservés, à l'abri de la chaleur et de la lumière. Ces échantillons vont servir pour l'extraction des huiles essentielles et à la préparation d'extraits aqueux.

II. 1.2. Matériel microbiologique :

Ce sont des souches référencées qui ont été fournies par le laboratoire d'hygiène de l'unité microbiologie, de l'hôpital universitaire CHU de Blida.

Tableau 2 : les souches utilisées

Souche	Référence	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Pseudomonase aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	+
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 9372	+
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	moisissure
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	levure

II. 2. Matériel de laboratoire :

Voire annexe I

III. Méthode d'étude :

III. 1. Détermination de la matière sèche et du taux d'humidité :

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale, pour cela, nous avons pris 4g (pesé au mg près) d'échantillon frais de la partie aérienne de chaque espèce étudiée, juste après la récolte. Après séchage dans l'étuve à 105°C pendant 24h, Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'eau} = [(M_F - M_S) / M_F] \times 100$$

M_F : Matière fraîche

M_S : Matière sèche

III. 2. Extraction des huiles essentielles:

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation, à l'aide d'un hydrodistillateur de type **Clevenger (1923)** représenté dans la figure 3.



Figure 10 : Hydrodistillateur Clevenger.

III. 2.1. Principe :

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou broyé) dans un alambic rempli d'eau, qui est ensuite porté à ébullition.

Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1993).

III. 2.2. Mode opératoire :

Une quantité de 80 g de la partie aérienne de la plante (tige, feuille) a été coupée en petits morceaux et introduite dans un ballon de 500 ml, rempli au 2/3 d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon, pendant 3h . Ceci engendre la formation de vapeurs chargées de substances volatiles qui traversent le réfrigérant, se condensent puis s'écoulent à l'état liquide, goutte à goutte, dans le tube gradué de Clevenger. L'eau (hydrolat) et l'huile essentielle se séparent par différence de densité en deux phases non miscibles. À la fin de l'extraction les essences qui sont séparées l'une de l'autre par le robinet de Clevenger, sont récupérées dans un eppendorf.

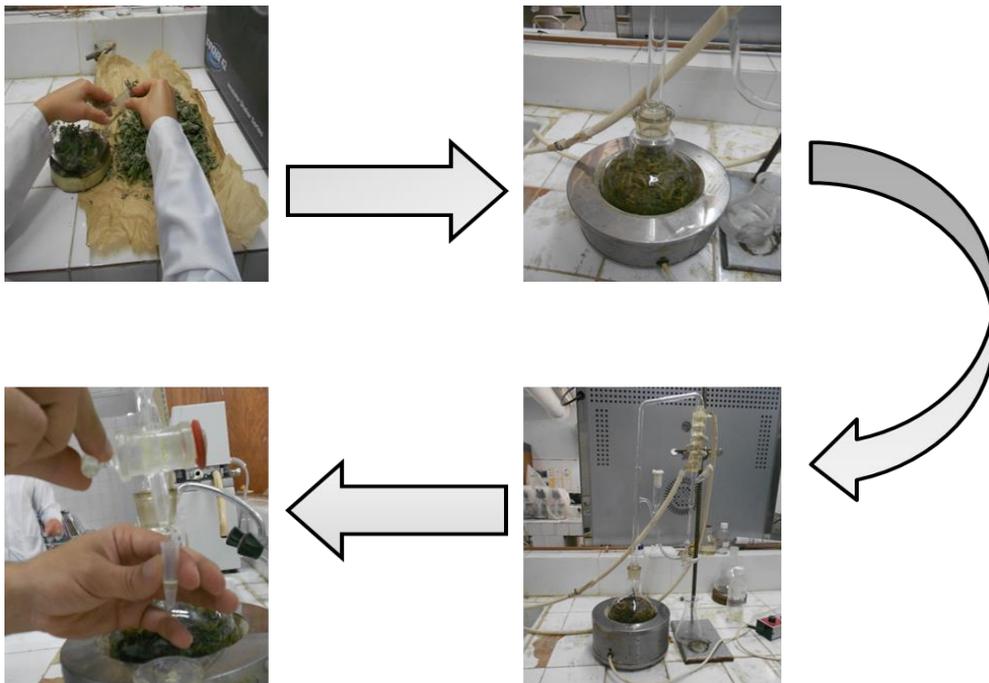


Figure 11 : Extraction par un Hydrodistillateur et récupération des huiles essentielles.

Les huiles essentielles obtenues sont conservées au réfrigérateur à +4°C jusqu'à leur utilisation pour les tests antimicrobiens. L'opération est répétée trois fois pour chaque espèce.

III. 3. Détermination du rendement en huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle est déterminé par le rapport entre le volume de l'huile essentielle extraite et la masse de la matière traitée (**pharmacopée européenne, 2000 in Acherouf, 2013**) le rendement est exprimé en pourcentage (%), il est calculé selon la formule suivante :

$$R = (V / M) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle (ml/100g) ou en pourcentage (%)

V : volume obtenu de l'huile essentielle (ml)

M : poids du matériel sec (g)

III. 3. Préparation des extrais de *Mentha pulegium* et *Mentha pepirita* :

Les extrais aqueux sont obtenus par deux procédés d'extraction différents.

- **Macération**
- **Infusion**

III. 3.1. Préparation de la poudre :

Après séchage, la partie aérienne des deux espèces, a été broyée à l'aide d'un mixeur. La poudre est obtenue après tamisage du produit broyé ; elle est ensuite récupérée dans des bocaux, à l'abri de la lumière et l'humidité, afin d'éviter toute contamination et dégradation de la matière active.

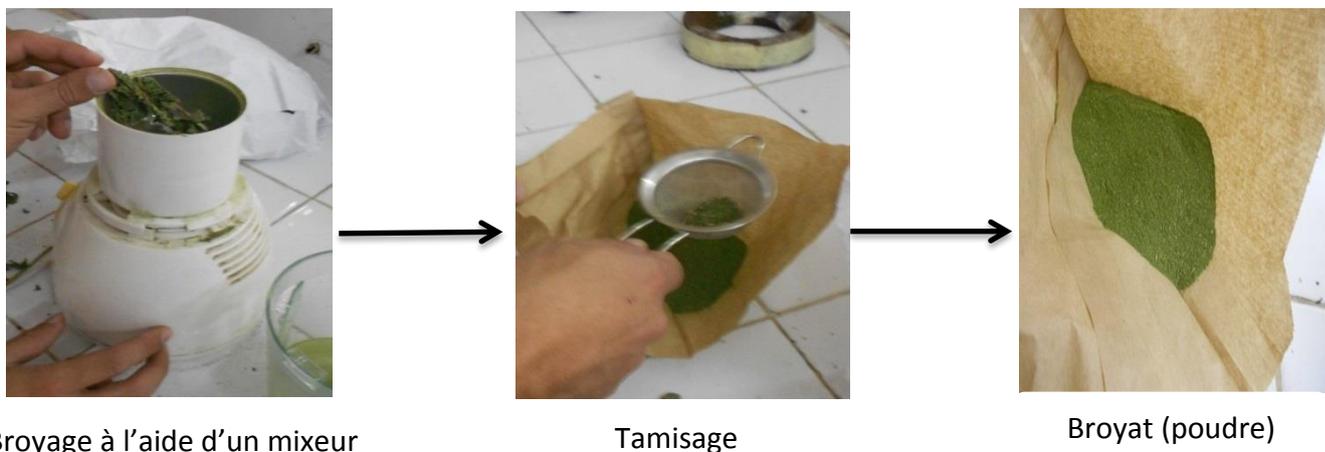


Figure 12 : Les étapes de préparation de la poudre.

III. 3.2. Préparation des extraits aqueux :

➤ Macération :

On pèse 10g de poudre de la partie aérienne de chaque espèce qui sont homogénéisés avec 100 ml d'eau distillée et mis à macérer dans un erlenmeyer avec agitation magnétique continue pendant 15 H (*Ouattara et al, 2003*).

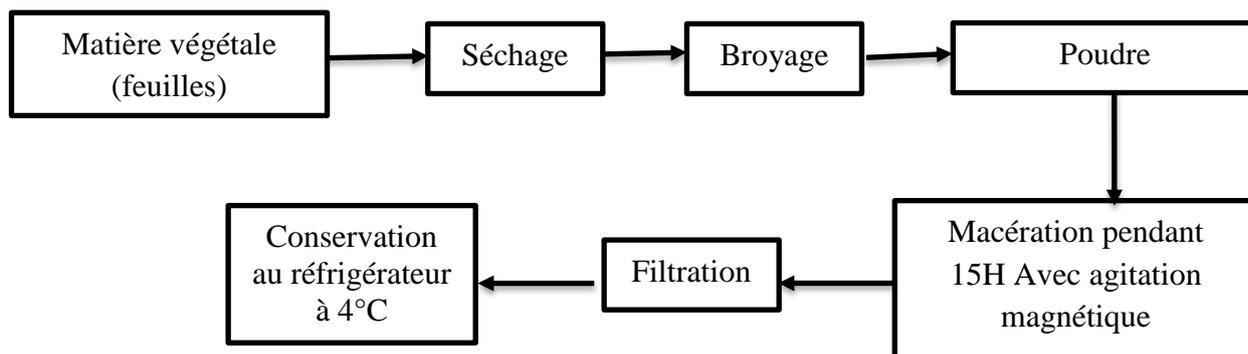


Figure 13 : Etapes de la préparation d'extrait aqueux par procédé de macération.

➤ Infusion :

10 g de poudre végétale ont été additionnés à 100 ml d'eau distillée à 100°C, couvrir et laisser infuser pendant 15 mn puis, filtrer après refroidissement.

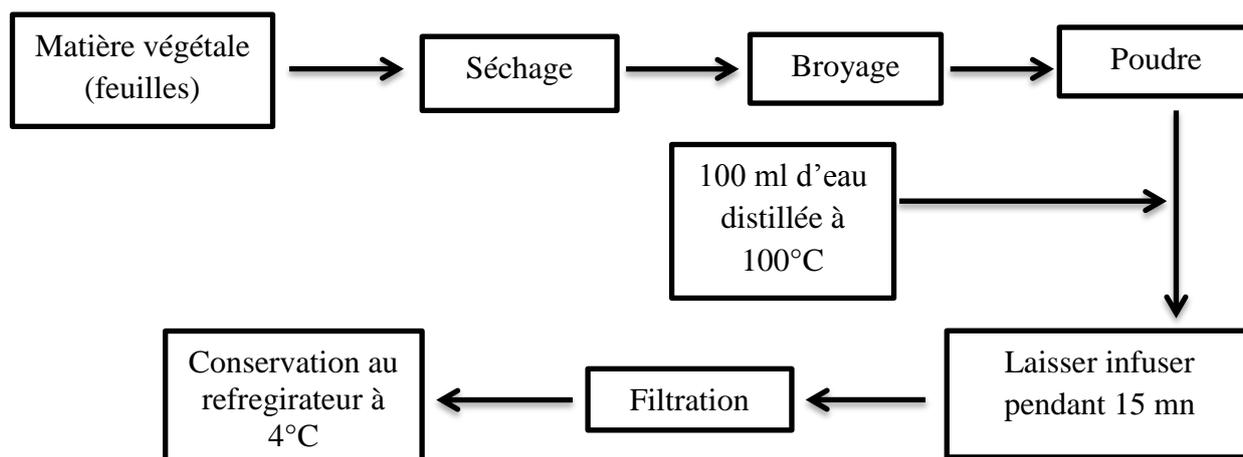


Figure 14 : Etapes de la préparation d'extrait aqueux par procédé d'infusion.

III. 3.3. Filtration des extraits aqueux :

Les quatre extraits issus des deux procédés d'extraction vont être filtrés et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

III.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose où les disques sont imbibés de chaque extrait (Sokmen et al, 2004).

III.4.1 Diffusion sur milieu solide (aromatogramme) :

C'est une technique microbiologique qui permet d'étudier comme un antibiogramme la sensibilité des germes à différents substances, c'est-à-dire, leur pouvoir antibactérien et antifongique (SALLE, 1991).

III. 4.2. Principe :

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Benjlali et al., 1986).

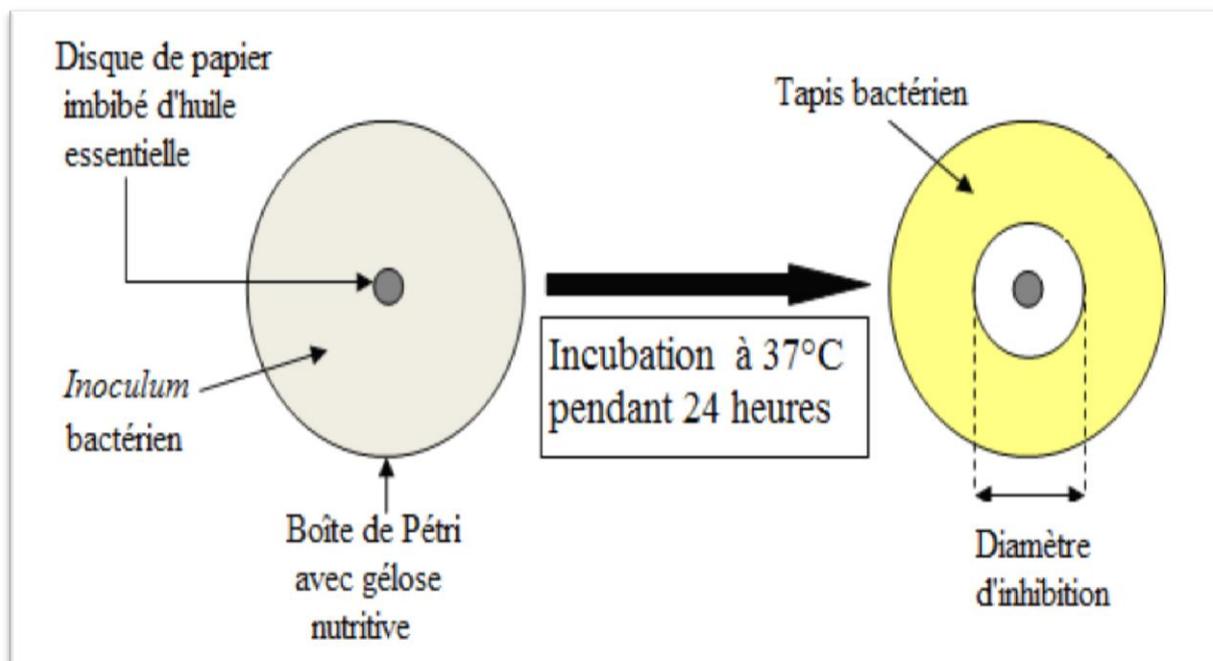


Figure 15 : Diffusion sur milieu solide (aromatogramme) (Tharib et al., 1983).

III. 4.3. Mode opératoire :

- **Préparation des milieux de culture :**

- Liquéfier les milieux de culture Muller Hilton pour les bactéries, et Sabouraud pour levure et champignon, par autoclave à 120°C pendant 20min et garder en surfusion dans un bain marie à 45°C
- Coulage des milieux dans les boîtes de pétri, en plastique, stériles et rondes de 9 mm de diamètre ; à raison de 20 ml par boîte.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paillasse, à température ambiante.

- **Repiquage des souches :**

- Afin d'obtenir des cultures jeunes de 24h, les souches conservées ont été repiquées par ensemencement en strie, sur gélose nutritive pour les bactéries et milieu Sabouraud pour les souches fongiques, puis incubées, 24h à 37°C /bactérie, 48h à 25°C /levure, et 3 jour à 25°C /champignon.

- **Préparation de l'inoculum :**

- A partir des cultures jeunes préparées et isolées. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques ;
- Décharger la anse dans 5 ml d'eau physiologique, agiter et homogénéiser la suspension (agitation manuelle), jusqu'à dissolution totale des colonies dans l'eau physiologique et avoir une solution de 0.5 Mac Farland ;
- Sept tubes correspondant aux sept souches utilisées, ont été préparés.



Figure 16 : Suspension bactérienne et fongique.

- **Ensemencement**

- L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.
- L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60°C à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.



Figure 17 : Ensemencement.

- **Dépôt des disques :**

- Prélever aseptiquement un disque stérile de 9 mm de diamètre avec une pince stérile.
- Mettre en contact le bout du disque avec la substance à tester (huile essentielle ou extrait aqueux), qui va être absorbée par capillarité.
- Les disques ainsi imbibés (huile essentielle ou l'extrait aqueux), sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.
- Les boîtes de pétri sont laissées sur la pailasse pendant 30 min puis incubées à l'étuve, 24h à 37°C /bactérie, 48h à 25°C /levure, 72h à 25°C /champignon.



Figure 18 : Dépôt des disques imprégnés des substances à tester.

- **Lecture de l'aromatogramme :**

- La lecture de l'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle simple.
- **Meena et Sethi (1994)** ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes (disque de 9mm):
 - Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28mm.
 - Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 16 et 28mm.
 - Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre 10 et 16mm.
 - Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est entre est inférieur à 10mm.

N.B : afin d'assurer les conditions d'asepsie locale indispensable, le travail s'est effectué près d'un bec bunzen (pour stériliser les instruments en passant dans la flamme).

III. 5. Détermination de concentration minimale inhibitrice:

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne ou l'apparition d'une zone d'inhibition (**Daroui-Mokaddem, 2012**)

III. 5.1. Principe :

Une solution mère de chaque substance à tester, a été diluée au 1/2^{ème} (0,5ml d'huile essentielle a été diluée dans 0,5ml de Tween 80), puis une série de dilution a été réalisée en Tween 80 (dilution en cascade), à partir de la solution mère. La gamme de concentration finale ainsi obtenue correspond à : 50% – 25% – 12,5% – 6,125% – 3,06% – 1,53% – et 0,76%. Des disques stériles de 9mm de diamètre ont été imprégnés de 20µl des différentes dilutions, puis ont été déposés à la surface des milieux ensemencés avec les différentes souches bactériennes et fongiques. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 24h (bactérie) et 25°C pendant 48h (levure), et 25°C pendant 3 à 4 jours (champignon) (Sidali *et al.*, 2014).

Pour une meilleure évaluation de l'action de la concentration minimale inhibitrice, trois essais ont été effectués pour chaque germe. La valeur de la CMI étant celle qui s'est répétées au moins 2 fois sur les 3 tests

Résultats et discussion

❖ Résultats et discussion :

I. Résultat du taux d'humidité de la matière végétale :

Après séchage de la partie aérienne de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium* à 105°C pendant 24h, l'analyse de nos échantillons a révélé un taux d'humidité important représenté par le tableau 3 et la figure 19.

Tableau 3 : Taux d'humidité et de matière sèche de la partie aérienne de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*.

Espèce	Matière fraîche (g)	Poids après séchage	Taux d'humidité (%)	Matière sèche (%)
<i>Mentha piperita</i>	4	0,78	76%	24%
<i>Mentha pulegium</i>	4	0,67	67%	33%

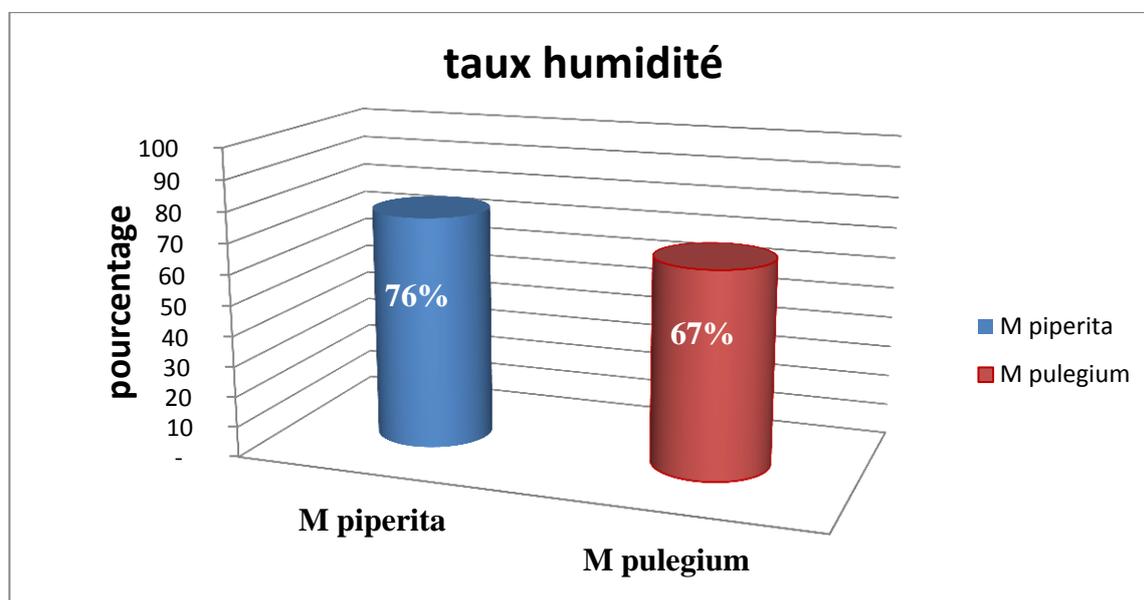


Figure 19 : taux d'humidité de la partie aérienne de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*

Selon les résultats obtenus, le taux de humidité signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau ; on constate que *Mentha piperita* et *Mentha pulegium* sont très riches en eau avec un taux de 76% et 67% respectivement. Ce qui signifie

que 23% et 33% représentent le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction de l'huile essentielle.

○ **Discussion :**

Les deux espèces ont montré un taux d'humidité assez élevé. Pour *M. piperita* le taux qu'on a trouvé est plus élevé que celui de **Machhour et al. (2008)** qui a travaillé sur la même espèce et a trouvé un taux d'humidité bien plus faible. Alors que **Khaled Khodja, (2009)** signale un taux d'humidité de *M. pulegium*, nettement plus élevé aux nôtres.

M. pulegium et *M. piperita* ont montré des taux d'humidité proches à celui trouvé par **Brahmi (2005)**, qui a fait une étude sur la menthe verte (*Mentha spicata*) et qui a trouvé un taux d'humidité de $70\% \pm 10.92$.

II. Résultats de l'extraction des huiles essentielles :

II.1. Caractères organoleptiques :

L'hydrodistillation des parties aériennes déjà séchées des deux espèces étudiées nous a permis d'extraire des huiles essentielles dont les caractéristiques organoleptiques sont observées dans le tableau suivant et les figures 20 et 21 :

Tableau 4 : Caractère organoleptique des deux espèces

	Aspect	couleur	Odeur
<i>Mentha pulegium</i>	huileux	jaunâtre	Très forte odeur caractéristique
<i>Mentha piperita</i>	huileux	Jaune claire	Forte odeur caractéristique de la molécule

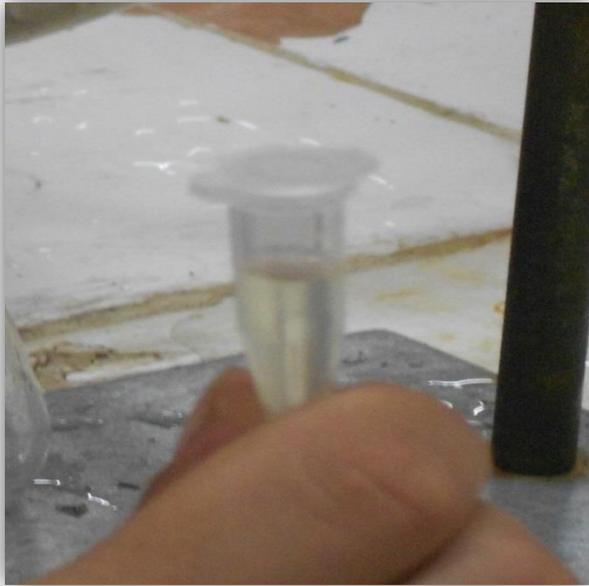


Figure 20 : huile essentielle de *M. pulegium*.



Figure 21 : huile essentielle de *M. piperita*.

○ **Discussion :**

M. piperita : les caractères organoleptiques trouvés lors de notre extraction sont presque semblables à ceux trouvés par **Saggou (2008)** qui a travaillé sur la même espèce cueilli à Ouargla et sont aussi semblables à la norme **AFNOR (2000)**, à l'exception du caractère de la couleur.

M.pulegium : Les caractères organoleptiques trouvés dans notre recherche sont semblable à ceux trouvés par **Larhrech (2010)** qui a travaillé sur l'extraction de *Mentha pulegium* de la région de Djelfa.

II. 2. Rendement en huile essentielle :

Les rendements en huile essentielle obtenus sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière végétale sèche. Les résultats sont montrés dans la figure 22.

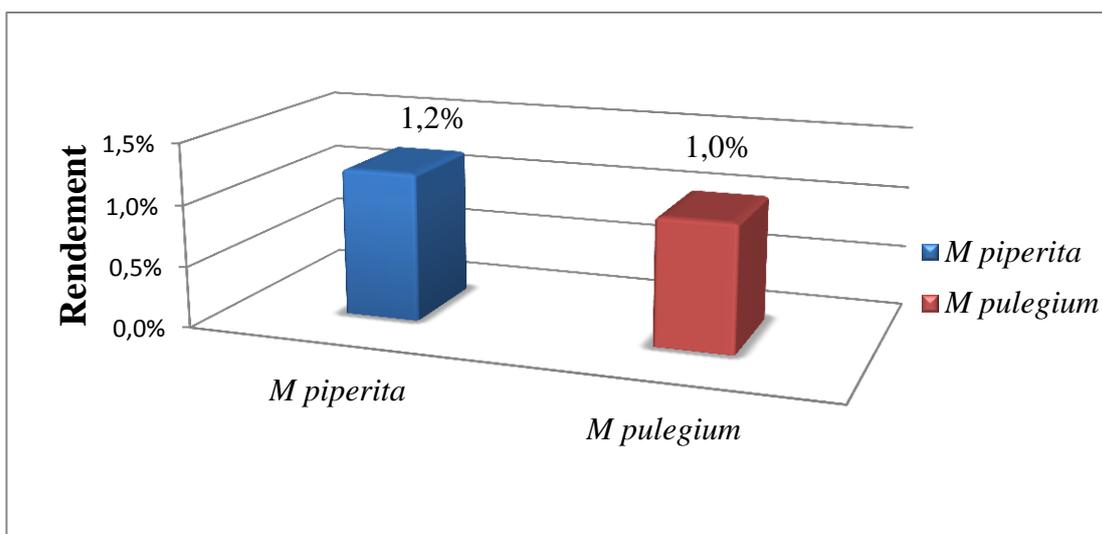


Figure 22 : Rendement des huiles essentielles de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*

Nos échantillons ont donné un rendement moyen en huile essentielle, qui représente un taux d'environ 1,2% pour *Mentha piperita* et 1% pour *Mentha pulegium*.

On note que le rendement de *Mentha piperita* est légèrement plus élevé que celui de *Mentha pulegium*

○ **Discussion :**

En comparant nos résultats avec la littérature scientifique ; **Bruneton (1993)** qui a indiqué que l'huile essentielle de la *M. piperita* représente 1% à 3% de la matière sèche, ainsi que **Ait youcef (2005)** qui précise que le rendement de *M.pulegium* est compris entre 0.5% et 1%, on peut déduire que nos échantillons ont donné un rendement moyen en huile essentielle pour *M. piperita* et assez élevé pour *M. pulegium* .

La variation du Rendement de l'huile essentielle de *M. piperita* et *M.pulegium* a été observée par plusieurs auteurs et dans diverses régions.

En Algérie, **Belaoucha et al., (2012)** ont obtenu un rendement de 0,82% en travaillant sur la menthe poivrée cueillie dans la région d'Alger, et récemment **Chebanis (2013)** a fait une étude phytochimique et biologique sur *M. piperita*, récoltée dans la région de Constantine, il a obtenu un rendement de 1% qui est également inférieur à nos résultats.

Adjou et Soumanou (2013), on étudie l'efficacité des extraits de la menthe poivrée dans la lutte contre les moisissures au Bénin, ont trouvé un rendement de 1.17%, qui est assez proche à nos résultats.

Lahreche, (2010) a travaillé sur l'extraction et l'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* récoltée dans la région de Djelfa, il a trouvé un rendement de 0.33% qui est largement inférieur à nos résultats. Par contre **Benyad (2008)**, a effectué une étude sur l'huile essentielle *M. pulegium* au Maroc, et a trouvé un rendement bien plus supérieur à nos échantillons.

Selon **Gilly, (1997) et Bruneton, (1999)**, Ces variations du rendement au sein de la même espèce peuvent être liées à plusieurs facteurs, l'écologie de la plante, le cycle végétatif, et les conditions édaphiques.

III. Résultat de l'activité antimicrobienne des deux espèces :

L'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium* a été évaluée par des essais basés sur la méthode de diffusion par disque (aromatogramme) et par test de détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI).

Cette étude est basée sur la mesure de diamètre de la zone d'inhibition qui entoure les disques imprégnés par l'huile essentielle de *M. piperita* et *M. pulegium* et par leurs extraits aqueux.

D'après **Meener et Sekhi (1994)** les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne étaient rangés en 4 classes regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : classe des zones d'inhibition.

degré d'inhibition	Diamètre des zones d'inhibition (mm)	signe
fortement inhibitrice	> 28 mm	+++
modérément inhibitrice	Comprise entre 16 et 28 mm	++
légèrement inhibitrice	Comprise entre 16 et 10 mm	+
absence d'inhibition	< 10 mm	Abs

III.1. Résultat de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle :

Les résultats des tests d'inhibition de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des espèces étudiées, obtenus par la mesure de la zone d'inhibition de la croissance des microorganismes sont rapportés dans le tableau 6 et la figure 23, 24 et 25.

Au cours de cette étude, 3 essais ont été réalisés et il est nécessaire de noter que le diamètre du disque (9mm) a été inclus dans les calculs de la zone d'inhibition.

Tableau 6 : résultat des tests d'inhibition de de l'activité antimicrobienne de huile essentielle de *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*

souche testé	HE de <i>Mentha piperita</i>			HE de <i>Mentha pulegium</i>			Gram
	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre Zi	Degré d'inhibition	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre ZI	Degré d'inhibition	
<i>Escherichia coli</i>	18	16,67±1,15	++	12	13,33±1,53	++	Gram -
	16			13			
	16			15			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram -
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Bacillus subtilis</i>	30	31,67±2,08	+++	29	28,67±1,53	+++	Gram +
	31			30			
	34			27			
<i>Bacillus cereus</i>	26	27±1,73	++	20	25±1,00	++	Gram +
	26			23			
	29			26			
<i>Salmonella typhi</i>	13	13,33±1,53	++	12	12±1,00	+	Gram -
	12			11			
	15			13			
<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	-	21	21,67±0,58	++	levure
	Abs			22			
	Abs			22			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Abs	Abs	-	21	20,67±1,53	++	moisissure
	Abs			19			
	Abs			22			

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 6, nous remarquons que les diamètres d'inhibition varient d'une souche à une autre.

L'huile essentielle de *M. piperita* a montré une activité fortement inhibitrice sur la souche *Bacillus subtilis* (31,67mm), modérément inhibitrice sur *Escherichia coli* (16,67mm), *Bacillus cereus* (27mm), légèrement inhibitrice sur *Salmonella typhi* (13,33mm) et non inhibitrice sur *Candidat albicans*, *Aspergillus brasiliensis* (< 10mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (< 10mm) (figure 22).

L'huile essentielle de *M. pulegium* a montré une activité antimicrobienne, fortement inhibitrice sur *Bacillus subtilis* (28,67mm), modérément inhibitrice sur les souches, *Bacillus cereus* (25mm), *Candidat albicans* (21,07mm) et *Aspergillus brasiliensis* (20,67mm), légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli* (13,33mm), *Salmonella typhi* (12mm), et non inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* (< 10mm) (figure 23).

Les histogrammes et les figures suivantes nous montrent la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis de nos huiles essentielles

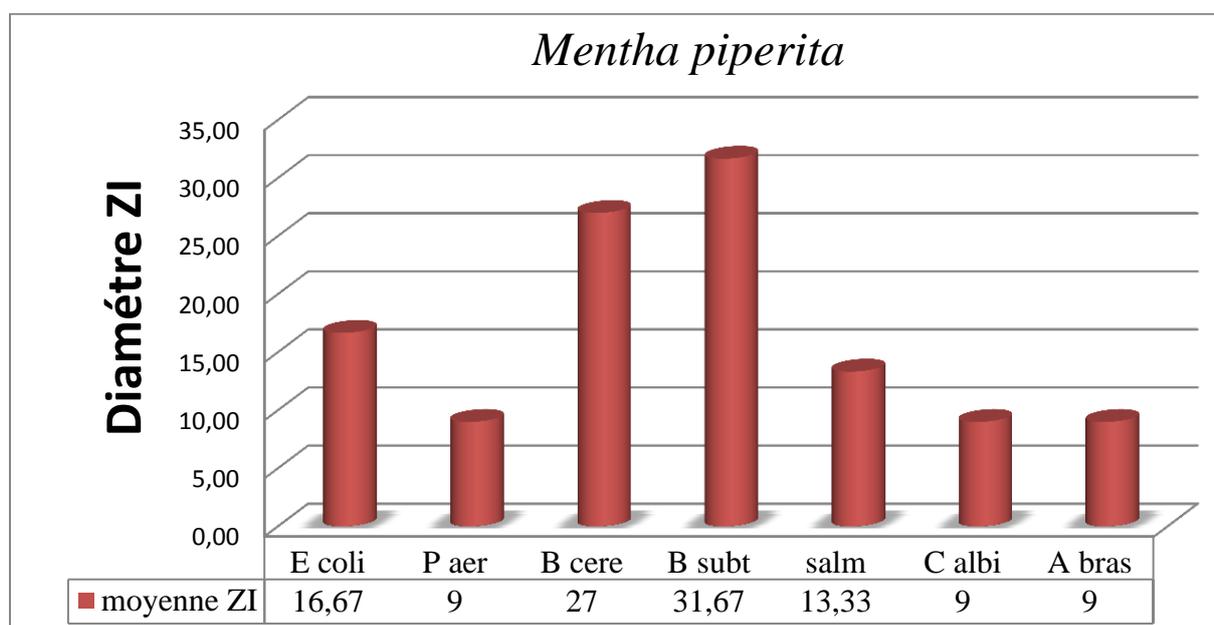


Figure 23 : Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Mentha piperita*

D'après la figure 23 nous remarquons que l'huile essentielle de *M. piperita* présente une plus forte activité sur les bactéries à Gram(+) *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, que sur les bactéries à Gram (-) *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, Cependant aucun effet inhibiteur n'a été enregistré sur *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que la levure *Candidat albicans* et champignon *Aspergillus brasiliensis*.

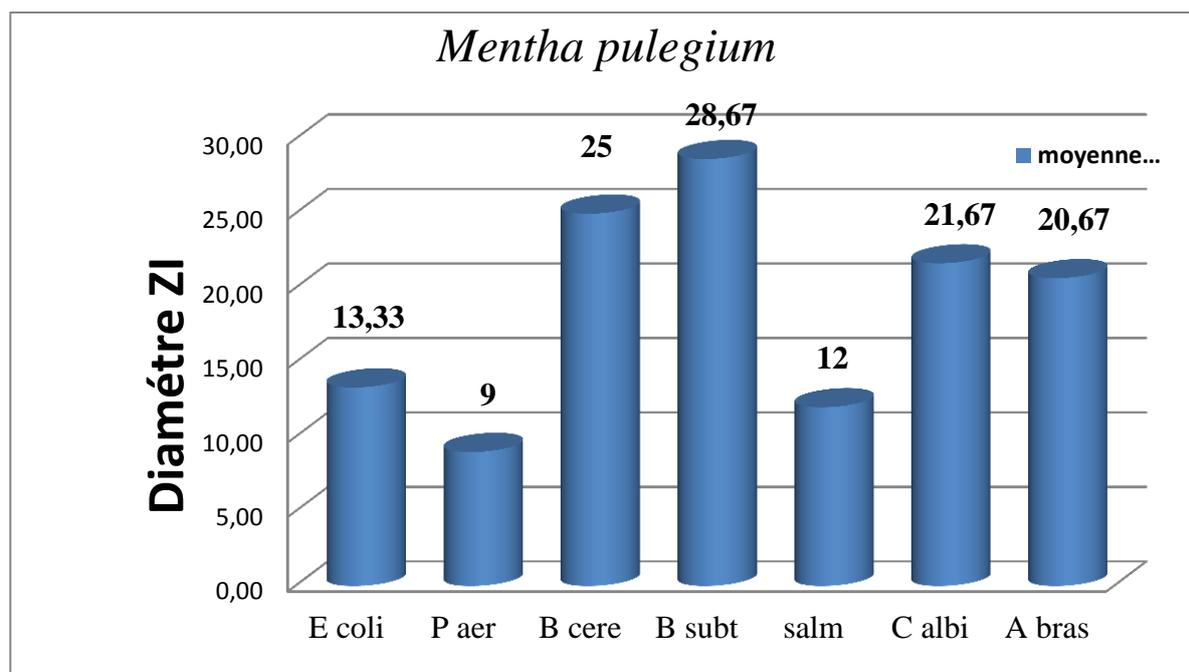


Figure 24 : Diamètre des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

D'après la figure 24 nous remarquons que l'huile essentielle de *M. pulegium* présente une activité plus forte sur les bactéries à Gram(+) *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, que sur les bactéries à Gram (-) *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*. Nous distinguons également que l'HE de *M. pulegium* présente une activité assez bonne vis-à-vis de *Candidat albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Cependant aucun effet inhibiteur sur *Pseudomonas aeruginosa* n'a été observé.

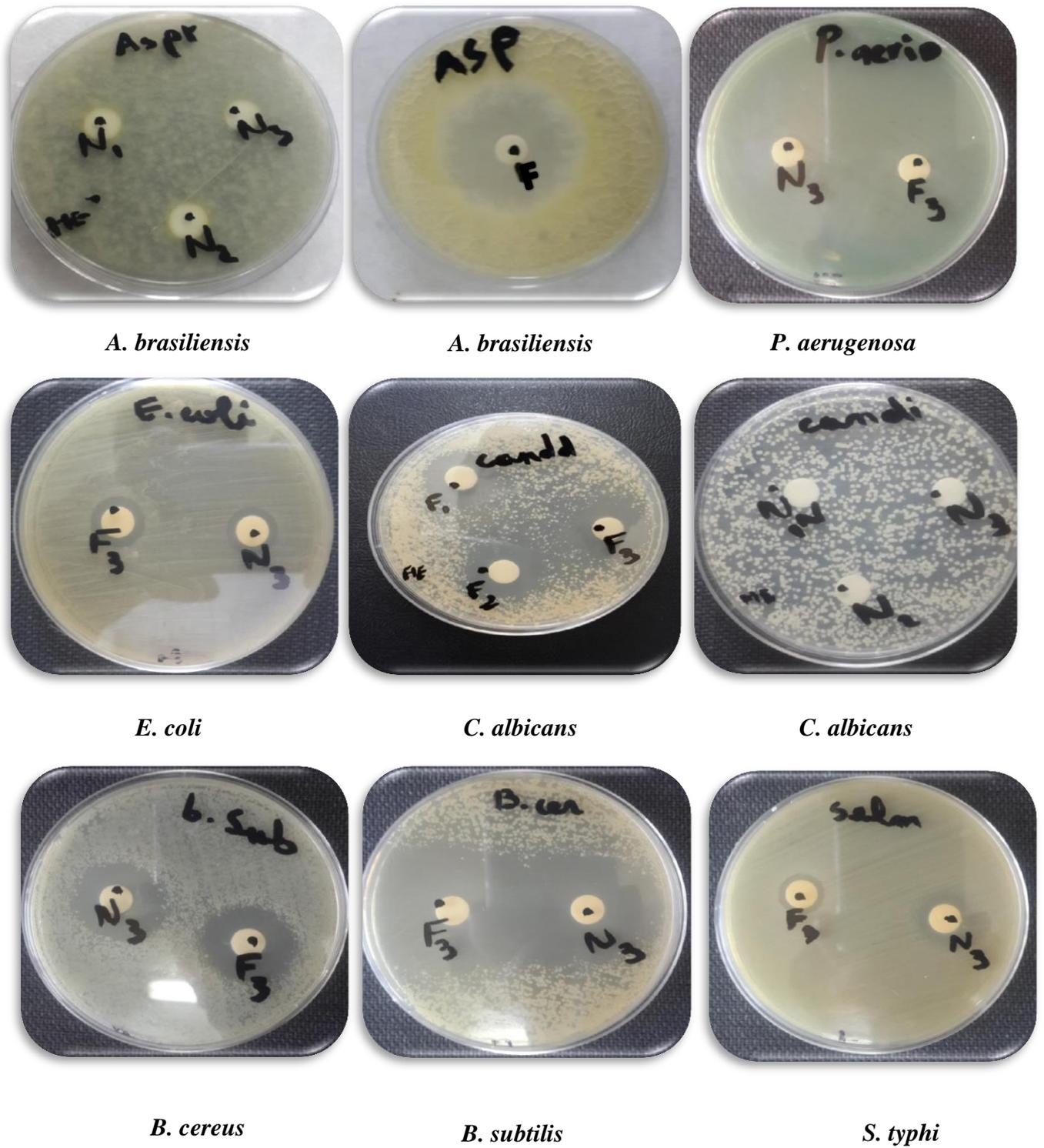


Figure 25 : Zones d'inhibitions observées chez les souches microbiennes testées sous le traitement de l'huile essentielle, N) *M. piperita*, F) *M. pulegium*.

○ **Discussion :**

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites de *M. pulegium* et *M. piperita* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose :

Les résultats expérimentaux présentés dans le tableau 6, les figures 23 et 24 montrent que l'huile essentielle de la menthe pouliot est active sur toutes les souches testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, alors que la menthe poivrée est active que sur les souches bactériennes testées, à l'exception de *P. aeruginosa*. Quant aux souches fongiques, aucune activité n'a été observée.

Les huiles essentielles extraites de *M. pulegium* et celle de *M. piperita* ont montré un effet antibactérien puissant vis-à-vis de *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*. Elles ont généré un effet antibactérien modéré à légèrement inhibiteur pour les souches *E. coli* et *Salmonella typhi*.

La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas surprenante car c'est une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. En effet, cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe (Haddouchi et al., 2009). D'après Hart et Shears (1997), cette même souche est résistante à la céfotaxime et à la gentamicine.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ayaidia (2009) qui a montré que l'huile essentielle de la menthe poivrée avait une activité non inhibitrice vis-à-vis de *P. aeruginosa* et une activité inhibitrice sur *E. coli*. Lahrech (2010), a mis en évidence l'activité antimicrobienne de *M. pulegium*, et a indiqué que l'huile essentielle de la menthe pouliot avait une activité non inhibitrice vis-à-vis de la souche bactérienne *P. aeruginosa* et limite pour *E. coli*.

Moreira et al., (2005) ont utilisé plusieurs huiles essentielles extraites de nombreuses espèces aromatiques appartenant à différentes familles, dont l'une des espèces est *M. piperita*, dans des tests d'antibiose contre quatre souches d'*E. coli*. Les résultats de ses tests ont montré que les différentes souches d'*E. coli* ont présenté une sensibilité modérée vis-à-vis de l'action des huiles essentielles utilisés, cela est également en accord avec nos résultats.

Selon Dorman et Deans (2008) les bactéries Gam- sont plus résistantes que les Gam+ grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gam- est plus en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de la Gam+ qui les rendent plus hydrophiles, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Dans notre étude cette

affirmation a été montrée. Nous remarquons que les bactéries Gam + sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gam - qui réagissent différemment aux huiles essentielles.

D'autre part, **Zaika (1988), et Hussein (1990)** ont indiqué que les bactéries à Gram positif sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif, ce qui est contraire aux résultats que nous avons trouvés.

Cependant **Eulgayer et al. (2001)** donnent un autre avis et notent qu'il est très difficile de faire de telles généralisations, parce que chaque huile essentielle est unique dans sa composition et chaque bactérie diffère considérablement en structure et en fonctionnalité y compris en pouvoir pathogène.

Les levures et les champignons ont montré une sensibilité modérée vis-à-vis de l'huile essentielle de la menthe pouliot avec des zones de 21,67 mm pour *C. albicans* et 20,67mm pour *A. brasiliensis*, alors que les mêmes souches fongiques ont été testées avec l'huile essentielle de menthe poivrée, elles se sont révélées résistantes.

Les travaux de **Lahrech (2010)** et **Belghazi et al., (2002)** mentionnent que *Mentha pulegium* est dotée d'une activité antifongique élevée. Plus tard, **chebli et al., (2003)** ont testée in vitro l'activité antifongique de l'huile essentielle de sept labiacées parmi elles la menthe pouliot ; elles ont présenté une activité antifongique modeste, ce qui est encore semblable à nos résultats

Concernant l'huile essentielle de *M. piperita*, les souches fongiques *C. albicans* et *A. brasiliensis* ont présenté une absence totale de zone d'inhibition, ce qui révèle une résistance à l'égard de l'huile essentielle de *M. piperita*.

Plusieurs études ont été faites pour apprécier l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *M. piperita*, mais rares sont les travaux qui ont porté sur l'activité antifongique.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par **Adjou et Soumanou, (2013)** qui ont fait une étude de l'activité antifongique de la menthe poivrée. En contrepartie, nos résultats viennent confronter ceux trouvés par **Belaoucha et al., (2012)**, qui signalent une faible sensibilité de *C. albicans* vis-à-vis de l'huile essentielle de la même espèce récoltée de la région de l'eucalyptus W. Alger.

Conner et Bauchat (1984) ont suggéré que le mode potentiel de l'action des huiles essentielles contre les champignons et les levures pourrait être dû à l'affaiblissement des processus enzymatique impliqué dans la production énergétique et la synthèse des composants structurales.

D'autre part, **Knobloch (1989)** a montré que les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes, réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures. Aussi, **Arras et al., (2001)** ; **De Billerbeck et al., (2001)** in **Amarti et al., (2010)**, ont indiqué que contre les champignons, les phénols terpéniques des huiles essentielles provoquent plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries. **Razzaghi-Abyaneh et al., (2008)** ont également signalé des changements au niveau de la mitochondrie, ainsi que la perturbation des membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique en présence de l'huile essentielle.

D'après **Daroui-Mokaddem (2012)** L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est liée principalement aux profils chimiques. Selon **Ghermen et al., (2002)** ; et **Beganboula et al., (2004)**, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *mentha piperita* est attribuée à son composé majoritaire le isomenthol appartenant à la classe des alcools mono-terpéniques, alors que **Hmiri et al., (2011)** attribuent le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *M. pulegium* à la pulegone. Cependant, **EL ARCH et al., (2003)** in **Saoudi (2013)**, indiquent qu'on ne peut pas négliger l'existence de phénomène de synergie entre les composés majoritaires et minoritaires.

D'après l'expérimentation que nous avons effectuée, nous pouvons remarquer que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* possède un effet antimicrobien très important par rapport à celui de *Mentha piperita*. Autrement dit l'huile essentielle de *M. piperita* est moins active que l'huile essentielle de *M. pulegium*.

III. 2. Résultat de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux :

L'activité antimicrobienne des extraits aqueux de *M. pulegium* et *M. piperita* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme). Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits aqueux de *M. piperita* des deux modes de préparation sont rapportés dans le tableau 7.

Tableau 7 : résultat des tests d'inhibition de de l'activité antimicrobienne des extrait aqueux par macération et infusion de *Mentha piperita*.

souche testé	Extrait aqueux de <i>Mentha piperita</i>						Gram
	Extrait aqueux de la macération			Extrait aqueux de l'infusion			
	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre Zi	Degré d'inhibition	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre Zi	Degré d'inhibition	
<i>Eschirichia coli</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram -
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram -
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Bacillus subtilis</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Bacillus cereus</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Ssalmonella typhi</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	levure
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	moisissure
	Abs			Abs			
	Abs			Abs			

D'après les résultats obtenus, toutes les souches bactériennes et fongiques ont montré une résistance vis-à-vis des extraits aqueux de *M. piperita* et cela peut être observé dans les figures 26 et 27.

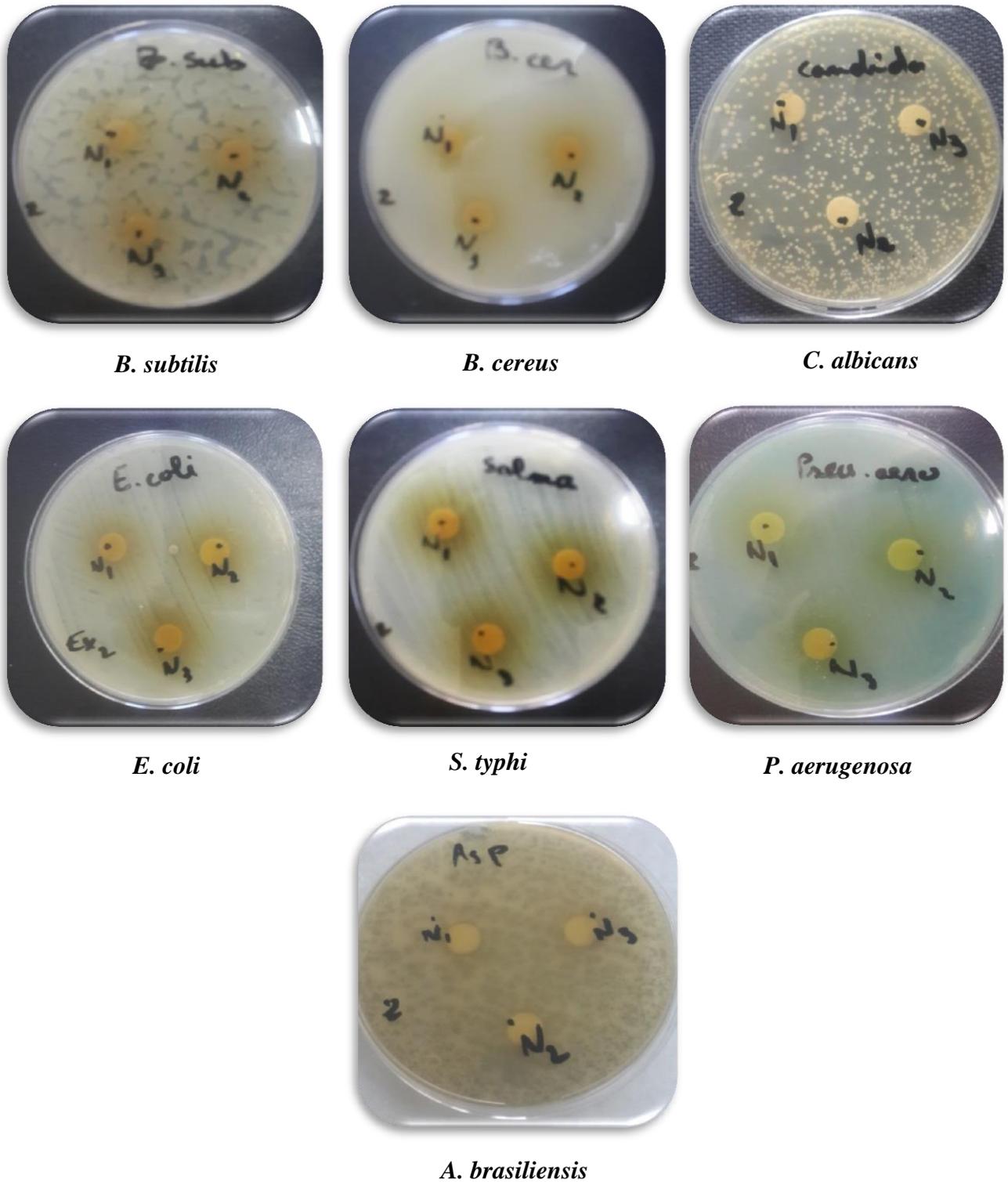


Figure 26 : Tests d'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *M. piperita* par procédé de macération.

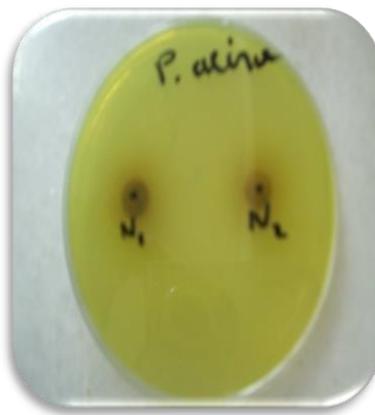
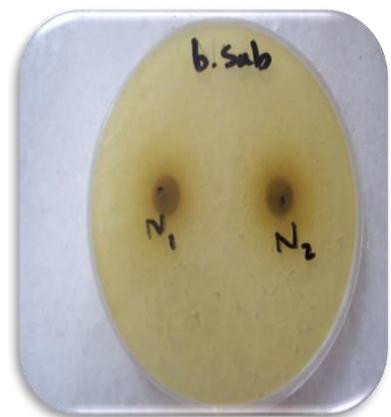
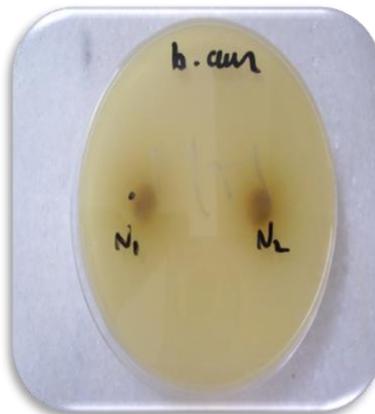
*C. albicans**P. aeruginosa**A. brasiliensis**S. typhi**E. coli**B. subtilis**B. cereus*

Figure 27 : Tests d'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *M. piperita* par procédé d'infusion.

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits aqueux de *M. pulegium* préparés par macération et par infusion sont rapportés dans le tableau 8.

Tableau 8 : résultat des tests d'inhibition de l'activité anti microbienne des extraits aqueux de *Mentha piperita* de la macération et d'infusion

souche testé	Extrait aqueux de <i>Mentha pulegium</i>						Gram
	Extrait aqueux de la macération			Extrait aqueux de l'infusion			
	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre Zi	Degré d'inhibition	Diamètre ZI (mm)	Moyenne diamètre Zi	Degré d'inhibition	
<i>Eschirichia coli</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram -
	Abs						
	Abs						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram -
	Abs						
	Abs						
<i>Bacillus subtilis</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs						
	Abs						
<i>Bacillus cereus</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs						
	Abs						
<i>Salmonella typhi</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	Gram +
	Abs						
	Abs						
<i>Candida albicans</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	levure
	Abs						
	Abs						
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Abs	Abs	-	Abs	Abs	-	moisissure
	Abs						
	Abs						

Les résultats des tableaux ci-dessus montrent que l'extrait aqueux des deux modes de préparations de *Mentha pulegium* n'ont pas d'activité inhibitrice vis-à-vis des souches microbiennes testées. Cela peut être observé dans les figures 30 et 31 (annexe 2).

○ **Discussion :**

L'évaluation de la préparation des remèdes traditionnels contre les microorganismes a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose et par deux modes de préparation, la macération et l'infusion pour *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*. Les résultats

expérimentaux présentés dans le tableau 7 et 8, montrent la non activité des extraits aqueux vis-à-vis des souches microbiennes testées pour les deux espèces. Ceci est dû probablement à :

- l'absence de principe actif dans nos extraits aqueux ;
- La perte des principes lors de la préparation de poudre ;
- Incapacité des méthodes de préparation à extraire les principes actifs ;
- Dénaturation des principes actifs lors de l'extraction.

Cependant **Hajlaoui et al., (2009)**, ont fait une étude sur l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* et *Mentha longifoliai*, et ont trouvé des résultats semblables aux nôtres. Les travaux de **Adjou et Soumanou (2013)**; signalent également une résistance des souches testées vis-à-vis de l'extrait aqueux de la menthe poivrée. **Newton et al., (2000) et Dulger et al., (2004)** ont effectués une étude antibactérienne des extraits aqueux et éthanoliques de quelques plantes correspondant à la famille des lamiacées, ils indiquent aussi une résistance des souches testées. Par contre, **Sqalli et al., (2007)** ont testés l'activité antibactérienne d'extraits aqueux de trente-six espèces de plantes, dont des espèces de la famille des lamiacées, au Maroc; ils indiquent que toutes les espèces ont montré une activité antibactérienne. Cela n'est pas en accord avec nos résultats.

Selon **Lee et al., (2003) in Djenat, (2012)** l'extraction aqueuse menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable due aux températures élevées, utilisées dans d'autres méthodes d'extraction, cela peut confirmer notre soupçon de la perte des principes actifs lors de la préparation de l'extrait aqueux par infusion. Cependant, **Ouldimam (2012)** a étudié l'effet biocide d'un extrait aqueux préparé par deux méthodes, ébullition et agitation, elle indique que l'extrait aqueux de l'ébullition a montré en générale une action inhibitrice alors que l'extrait aqueux de l'agitation a montré un certain effet négatif presque sur toutes les souches. **Lee et al., (2003) in Djenat, (2012)** indiquent aussi que le contenu total des principes actifs et l'activité biologique de la plante dépend essentiellement de la méthode d'extraction.

D'autre part, **Bouguendora (2011)**, qui a étudié le pouvoir antioxydant et antimicrobien de deux espèces de la famille des lamiacées, a indiqué que l'activité antimicrobienne des extraits dépend non seulement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de

différents métabolites secondaires. Dans notre travail ces composés phénoliques sont soupçonnés d'être dénaturés ou absents.

D'après nos résultats, il est possible de conclure que les huiles essentielles de la partie aérienne de *Mentha pulegium* et *Mentha piperita* sont plus actives que leur extraits aqueux. Des études ont montré que huile essentielle d'une plante avait un plus grand potentiel antimicrobien que son l'extrait. Selon **Hajlaoui et al., (2009)** l'extrait méthanolique des parties aériennes *Mentha pulegium* et *Mentha longifolia* n'ont montré aucune activité antimicrobienne. Tandis que les huiles essentielles de ces deux espèces ont montré un effet bactéricide contre les bactéries pathogènes.

III. 3. Résultat de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La détermination de la CMI a été effectuée pour l'huile essentielle de *M. piperita* et *M. pulegium*, car elles présentent un spectre d'activité et un pouvoir inhibiteur élevé, que les souches sensibles sont testées. Les résultats de cette étude sont présentés dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : résultat des tests de CMI de *Mentha pulegium* sur les 6 souches microbiennes

dilution	menthe pouliot						
	50%	25%	12,5%	6,125%	3,06%	1,53%	0,76%
<i>B.cerueus</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S.typhi</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>A.brasilien</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>C.albicans</i>	-	-	+	+	+	+	+

(-) absence de croissance ; (+) présence de croissance

La valeur de la CMI de l'huile essentielle de *M. pulegium* vis-à-vis de *Bacillus subtilis* est de 6,125% et pour *Bacillus cereus* est de 12,5% alors que pour *Candidat albicans*, *Aspergillus brasiliensis* et *Salmonella typhi*, est de 25%. Cependant *Escherichia coli* présente une résistance au produit dilué.

Tableau 10 : résultat des tests de CMI de *Mentha piperita* sur les 4 souches bactériennes

dilution	menthe poivrée						
	50%	25%	12,5%	6,125%	3,06%	1,53%	0,75%
<i>B.cerueus</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>B.subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. tiphy</i>	-	-	+	+	+	+	+

(-) absence de croissance ; (+) présence de croissance

D'après les résultats du tableau 10, la valeur de CMI de l'huile essentielle de *M. piperita* vis-à-vis des souches *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* est de 25% alors que pour *Bacillus cereus* elle est de 12,5%.

Les figures ci-dessous nous montrent les résultats obtenus par les différentes souches. Nous pouvons remarquer que la croissance microbienne augmente progressivement lorsque la dilution est diminuée.

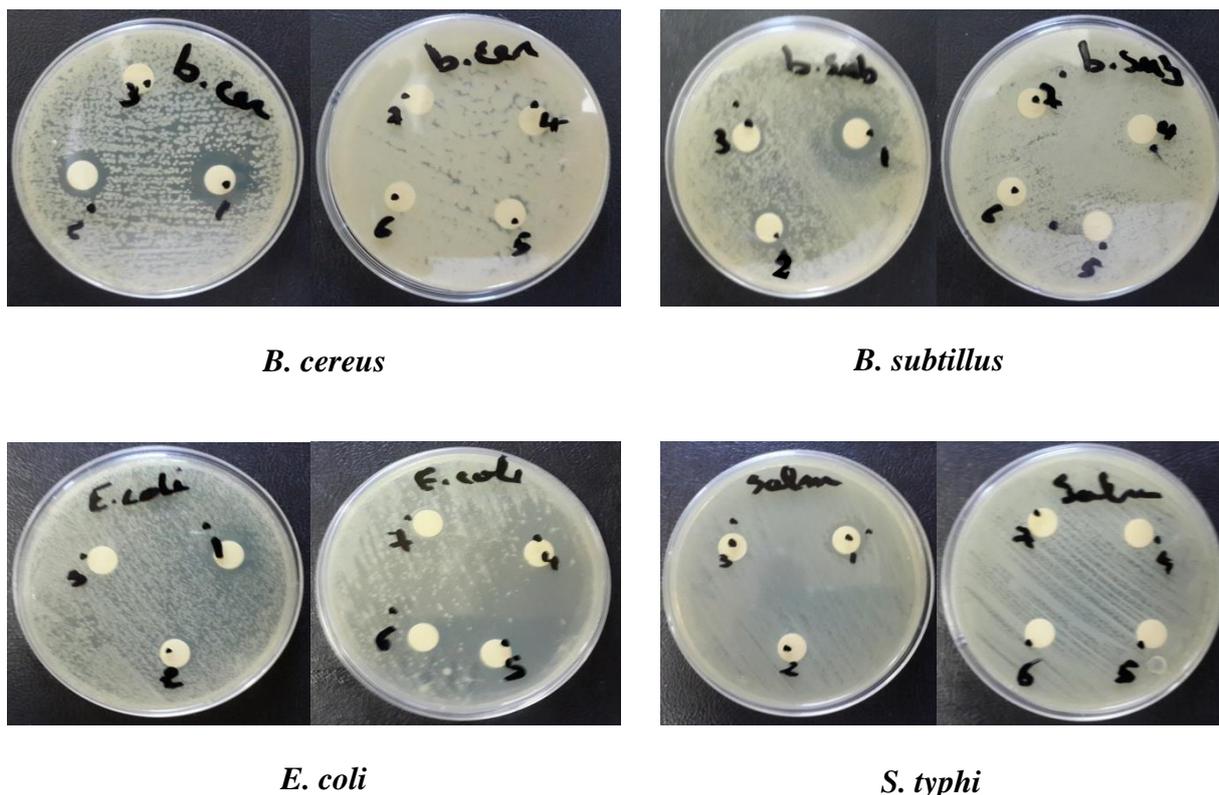


Figure 28 : CMI pour huile essentielle de *M. piperita*, 1) 50%, 2) 25%, 3) 12,5%, 4) 6,125%, 5) 3,06%, 6) 1,53% et 7) 0,76%.

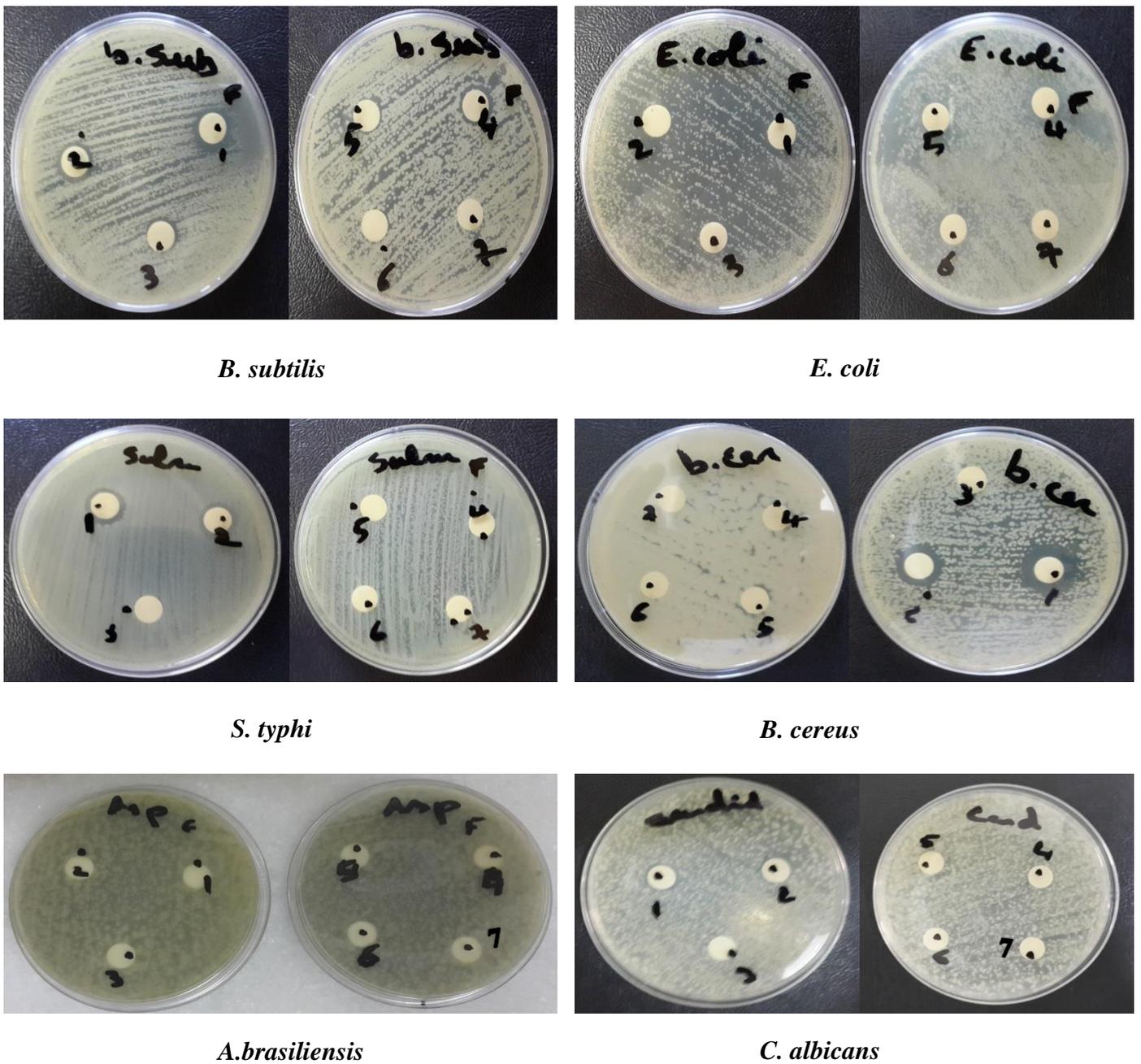


Figure 29 : CMI pour l'huile essentielle de *M. pulegium*, 1) 50%, 2) 25%, 3) 12,5%, 4) 6,125%, 5) 3,06%, 6) 1,53% et 7) 0,76%.

Discussion :

Selon les résultats obtenus nous remarquons que *B. subtilis* s'est montrée la plus sensible, elle a été inhibée à partir d'une concentration minimale de 6,125% par l'huile essentielle de la menthe pouliot. La concentration de 12,5% de l'huile essentielle de cette dernière a été suffisante pour arrêter la croissance de *B. cereus*, cette dernière a été inhibée par la même concentration de l'huile essentielle de la menthe poivrée. Alors que *B. subtilis*, *E. coli*, et *S. typhi* ont résistées jusqu'à 25% de la concentration de huile essentielle de menthe poivrée. *S. typhi*, *A. brasiliensis*, et *C. albicans* ont été inhibées à partir d'une concentration minimale de 25% de l'huile essentielle, alors que *E. coli* a résisté à toute les concentrations.

Selon **Koba et al. (2004)** et **Webster et al. (2008)** ont rapporté que le pouvoir inhibiteur d'un extrait végétal vis-à-vis d'une souche microbienne peut connaître différents classements. Il peut être excellent pour des CMI < 5%, intéressant pour des CMI entre 5 et 25%, faible pour des CMI entre 25 et 50% et médiocre ou nul pour des CMI > 50%.

Ainsi, d'après les résultats obtenus, les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et *Mentha piperita* présentent une activité antimicrobienne modeste, puisque des doses moyennes entraînent l'inhibition des microorganismes testés, à l'exception de *E. coli* qui présente une résistance à huile essentielle diluée de la menthe pouliot.

A la lumière de ces résultats, nous avons pu montrer que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et de *Mentha piperita* sont dotées d'activités antimicrobiennes remarquables mais l'extrait aqueux n'a présenté aucune activité vis-à-vis des souches testées. De ce fait, il serait très intéressant de réaliser des études supplémentaires et complémentaires sur ces plantes et de rechercher les molécules actives responsables de ces effets trouvés.

Conclusion

Conclusion :

Au terme de ce travail qui a porté sur l'extraction et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et des huiles essentielles de deux plantes médicinales la menthe poivrée et la menthe pouliot, l'extraction par hydrodistillation de type Clevenger des parties aériennes séchées, a donné un rendement en huile essentielle de 1.2% et 1% respectivement.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a montré qu'elle est fortement inhibitrice contre la souche *Bacillus subtilis*, et légèrement inhibitrice sur les souches, *Bacillus cereus*, *Candidat albicans* et *Aspergillus brasiliensis*, légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, par contre elle est non inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Concernant l'huile essentielle de *Mentha piperita*, nous avons constaté qu'elle est fortement inhibitrice pour *Bacillus subtilis*, modérément inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, et *Salmonella typhi*; quand aux *Pseudomonas aeruginosa* et les souches fongiques *Candidat albicans* et *Aspergillus brasiliensis* ils n'ont montré aucune sensibilité.

Cependant, toutes les souches microbiennes testées se sont révélées résistantes vis-à-vis des extraits aqueux obtenus par infusion et par macération de *Mentha pulegium* et de *Mentha piperita*.

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *M. piperita* et *M. pulegium*, présente une activité antimicrobienne modeste, puisque des doses moyennes entraînent l'inhibition des microorganismes testés.

Donc Il est important de poursuivre les travaux concernant ces deux plantes pour une éventuelle formation médicamenteuse à base de *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*.

Comme perspectives, et dans le but de confirmer et approfondir nos résultats, il serait nécessaire également de :

- Tester d'autres méthodes d'extraction de l'huile essentielle, et leur influence sur le rendement et la composition chimique de cette dernière.
- Tester d'autres méthodes d'extraction des extraits ; exemple par solvant
- Faire une étude analytique détaillée à l'aide de techniques plus performantes comme la CG (chromatographie gazeuse) ou la CG-MS (chromatographie gazeuse couplé à la spectrophotométrie de masse) et RMN (résonance magnétique nucléaire) pour

identifier et quantifier les composés actifs de la plante étudiée et leurs effets thérapeutiques.

- Faire une recherche supplémentaire sur la composition chimique de chaque extrait est plus que nécessaire pour comprendre l'évaluation de composés présentant l'activité antimicrobienne.
- Tester ces huiles essentielles vis-à-vis d'autres agents microbiens afin de confirmer leurs efficacités et de donner naissance à une alternative au antibiotique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- **Acherouf S., 2013** : Etude de l'activité antimicrobienne et valorisation de l'effet conservateur des huiles essentielles des feuilles de l'eucalyptus provenant de deux régions d'Alger. Université Saad Dahleb, Blida, p 27.
- **Adjou S, et Soumanou M., 2013** : Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide. Journal of Applied Biosciences, vol 70, Bénin ; p 5555-5566.
- **AFNOR, 2000** : Association française des normes, Recueil de norme. Les huiles essentielles, Échantillonnage et méthodes d'analyse (Tome I) p : 471. Monographies relatives aux huiles essentielles. Ed. AFNOR, France. Tome II, Volume 1, p 323.
- **Ait yousef M., 2006** : "Plantes médicinales de Kabylie", Edition : IBIS PRESS, Paris, pp : 215-219 ; ISBN : 978-9961-57-259-7. 349p
- **Amari, C.E, Bessai R, Serghini, E., 2005** : Caractérisation et identification des isolats d'*aspergillus* sp. De l'arachide de bouche en Algérie. Université Saad Dahleb, Blida, p 3.
- **Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M, Chaouch A., 2010**: Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* vol **14** (1), p 141, 148
- **Andeas, B., 1998** : Guides des plantes du bassin méditerranées. EUGEN ULMER, 400
- **Anonyme, 2014** : Aspergillose et autres champignons filamenteux opportunistes. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL), <http://umvf.univnantes.fr/parasitologie/enseignement/aspergillose/site/html/cours.pdf> . p1-19
- **Arnal-Schnebelen B, Goetz P, Grassart E, Hunnen M, Isrin P, Jacquemin M, Lejeune R, Leroux J, 2008** : Les plantes médicinales. Ed :Readers Digest, Paris, bruxelles, 253 p.
- **Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H., 1992** : Bactériologie clinique, 2ème édition, Ed : Ellipses, ISBN : 2-7298-9218-4, 511p.
- **Ayaidia, B., 2011** : Etude comparative de trois variétés d'huiles essentielles de menthe dans la région d'Ouargla. Mémoire de Master, Université Kasdi Masbah, Ouargla, p 48.
- **Baba Aissa F., 1999** : Encyclopédie des plantes utiles (flores d'Algérie et du Maghreb) librairie moderne. Rouïba, 173p.
- **Badaoui Y, Haoua A, 2013** : extraction et évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *mentha piperita* de deux régions différentes, université de SAAD DAHLEB Blida, Département de biologie, 20p
- **Basli A., Chiban M., Madani K. et Oukil M., 2011** : Activité antibactérienne des polyphénols extrait d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *origanum glandulosum* Desf. Springer-veriag France. Phytothérapie vol 10, p 2, 9.
- **Beguïn C., 1977** : "Petit guide panoramique des herbes médicinales". Ed. Lavoisier, Paris, 186 p
- **Belanger A. grondin N., 2000** : Essais pour la production commerciale d'huiles essentielles de menthe poivrée : //Res.arg.com/publication/resuma9900/belanger2_F.htm

- **Belaoucha A, Benmohamed A., 2012 :** Extraction, analyse et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la menthe poivrée. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'enseignement supérieur en biologie Université Saad Dahleb de Blida.
- **Belghazi L, Lahlou N, Alaoui I.M, Aboussaouira T, Habti N, Tantaoui I.A, Talbi M, Blaghen M, Fellat-Zarrouck K., 2002 :** extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot test antifongique. *Biochimie et santé*, p40-38. in Lahrech. K, 2010
- **Beloued A., 2001 :** *Plantes médicinales d'Algérie.*, OPU, Alger, 270
- **Benayad N, 2008 :** les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines, moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université de Mohamed V Agdal, Rabat, p 10,11,63
- **Benbrini S., 2012 :** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'extrait de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de magistère en biochimie 84 P.
- **Bengamboula C.F, Uyttendaele M, Debevere J., 2004:** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, eugenol, limonene and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, vol 21, p 33,42.
- **Benjilali. B, Tantouni-Elara. A, Ismaili-Aaou, M, et Avadi A., 1986:** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, *Plantes médicinales et phytothérapie*. tome XX, n°2. p 155, 156. Thèse de Magister en pharmacie. Université de Constantine.
- **Benthin B., et Col A., 1999:** *Journal of chromatography*
- **Beucher B., 2007 :** Spécificité antigénique de l'Als3p de *Candida albicans* et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte. *Cellular Biology*. Université d'Angers, French. P 5,6,7
- **Bézanger-beauquesme I, Pinkas M, Torck M, et Trotin F., 1980 :** Les plantes médicinales des régions tempérées. Ed Maloine S.A, p 331-335
- **Bianchini F et Corbetta F, 1975 :** Atlas de plantes médicinales. Ed Fernand Nathan, Paris, ISBN 2-09-284-599-3, p 42
- **Bougandoura, N., 2011 :** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* ssp *nepta* (nabta) et *Ajugaiwa* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de Magister. Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen, 97 p.
- **Bouhdid S, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Senhadji Skilil N, et Abrini D., 2009 :** L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souche d'origine clinique. PP
- **Brahmi F., 2005 :** Etude des interactions protéines-polyphénols. Etude de cas : extrait de feuilles de «*Mentha spicata*» avec la protéine Sérum Albumine Bovine (BSA). Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister, Université Abderahmane Mira, Bejaia. p 45
- **Branger J., 2004 :** cahier de charge_maitrise IUP GEPI
- **Bruneton J., 1993:** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition : Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 915p.
- **Bruneton J., 1999 :** Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales. Ed. Tec&Doc 3^{ème} Edition, Paris, p 416, 507,

- **Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R., 1984:** A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. Mycopathologia. vol 85: 21-30.
- **Burt S, 2004:** essential oils, their antibacterial properties and potential applications in food, a review. International journal of food microbiology 94, p223
- **Cawthorn A 1995:** A review of the literature surrounding the research into aromatherapy. Complement Ther Nurs Midwifery., 1(4): 118-120.
- **Chao S. C., Young D.G et Oberg G. J., 2000:** Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses J. Essent oil. Res, pp 639-649.
- **Charpentier B., Harmon F., Lorleae H., Harlay A., et Ridou L., 2008 :** guide de la préparation en pharmacie. Ed Elsevier Masson, paris, 1358 p
- **Chebli B, Mohamed A, Idrissi Hassani L.M, et MouhamedH., 2003 :** Journal of Ethnopharmacology, 89, p 165-169
- **Cheik Ali S, et Abbas M., 2011 :** Extraction, analyse et effet antimicrobien de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium*. L. Université Saad Dahleb Blida. Département d'agronomie, p20.
- **Chibani S, 2013 :** Etude photochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien. Mémoire pour l'obtention du diplôme de docteur. Université Constantine 1, 199 p.
- **Collin F, 2007 :** identifier les fleurs du Maroc Atlantique par leur couleur, rabat, p 154
- **Conner D.E et Beuchat L. R., 1984:** Effects of essential oil from plant on growth of food spoilage yeasts. J.Food sci. Thèse ing. Univ Blida pp 429-439.
- **Daferera D.J, Ziogas B.N, Polissiou, M.G., 2003 :** *Crop Protection*, 22, p 39-44
- **Daroui-mokaddem H., 2012 :** Etude photochimique et biologique des espèces : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniium olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Mémoire pour l'obtention du diplôme de Doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, 197 p
- **Darr. A, 1981 :** Technologie Pharmaceutique. Ed ACRIBIA, 2e édition.
- **Delille L, 2007 :** les plantes aromatiques en Algérie, Ed Berti, Alger, 163p
- **Denis F, Poly M-C, Martin c, Bingen, E Quentin R, 2007:** Bactériologie médicale: Technique usuelles. Ed : Masson, ISBN : 978-2-294-01172-6. 569p
- **Deysson., 1979 :** Cours de botanique générale, 4eme série, Tome 2 : organisation et classification des plantes vasculaires 2eme partie, systématique, p 413
- **Djedioui A., 2010 :** Evaluation de l'activité hypoglycémisante et anti hyperglycémisante de l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* ; une plante de l'Est Algérien chez le rat avec un diabète induit. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister. UNV Badji Mokhtar, Annaba, 55 p.
- **Djenat A., 2012 :** Pouvoir antifongique des extraits de feuilles de (*Laurus nobilis* L.) vis-à-vis (*Phytophthora infestans*) (Mont.) De Bary. Agent du mildiou de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) en Algérie. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master. Université Saad Dahleb de Blida, p
- **Dorman J.A, et Deans S.G., 2000:** Antimicrobial agents from plant, antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. Ed: Elsevier Masson, 1162 p.
- **Dromigny E, 2011 :** Les critères microbiologiques des denrées alimentaires, Ed : Lavoisier, Paris. p153, 530

- **Duraffourd C., et Lapraz J.C., 2002** : Traité de phytothérapie clinique : médecine et endobiogénie. Édition Masson, Paris, 827p.
- **El Abed D, Kambouche N, 2003**: les huiles essentielles, Ed DAR EL Gharb, Oran, 120p
- **Eulgayer F.A, Goldes J, et Mount J., 2001**: Composition chimique et activités antioxydant, antimicrobiennes et insecticides de l'huile essentielle *Juniperus phoenicea* . J. food Prot, n°16, p 119, 125.
- **Fluck H, 1977** : Petit guide panoramique des HERBES MEDICINALES. Ed Delachaux et Niestle Neuchâtel, Paris. P 134-137
- **Garnero, J., 1991** : Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et normalisation», Edition technique. Encyclo. Med. Nat ., Paris, France p 9, 20
- **Garrett. R et Grisham.C, 2000** : Biochimie. ed : Boeck université, Paris. 1292p
- **Gausсен, H., Leroy, J-F. & Ozenda, P. 1982** : Précis botanique 2- végétaux supérieurs. Tome II. 2e Ed. Masson: 407–408.
- **Ghermen C, Culea M, Cozar O., 2002**: comparative analysis of some active principle of herb plants by CG/MS. Talanta, vol 53, p253,262.
- **Gilly G., 1997** : Les plantes à parfum et les huiles essentielles à Grasse. Edition l'Harmanttan. Paris, Pages 428.
- **Graser Y, Volovsek M, Arrington J, Schonian G, Presber W, Mitchell T G, and Vilgalys R, 1996** : Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibit both clonality and recombination. Proc Natl Acad Sci USA., vol 93: p 12473
- **Guignard J.L, 1983** : abrégé de botanique. Ed masson, Paris, New York, Barcelone. P 259
- **Guinoiseau E., 2010**: Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de docteur de mention : biochimie – biologie moléculaire, Université de Corse pp : 50-51
- **Haddouchi F, Lazouni H.A, Mezane a, et Benmansour A., 2009** : Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de thymus fontanesii Bois et Reut, J. Afri. Sci, vol 5 n°2, p 246, 259
- **Hajlaoui H., Travelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., et Bakhrouf A., 2009** : Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microb Biot*, 25, 2227–2238.
- **Hammami. S et Abdesselem. M, 2005**: Extraction et analyse des huiles essentielles de la menthe poivrée de la région de Ouargla. Thèse Ing Univ, Blida. p69
- **Hart T, Shears P., 1997** : Atlas de poche de microbiologie. Ed : Médecine science, Flammarion. pp : 14,46, 68,87-123
- **Helali,A. 2005** : *Pharmacologie fondamentale et clinique.* , ENAG, 183p
- **Hernandez-Ochoa, L R., 2005**: Substitution de solvants et matier actives de synthèse par une combine solvant/actif d'origine végétale. Thèse de doctorat, institut national plytechnique de toulouse. 250 p.
- **Hmiri S, Rahouti M, Habib Z, Satrani B, Ghanmi M, et El Ajjouri M., 2011** : Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *mentha pulegium* et d'*eucalyptus*

camaldulensis dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, p.824 – 836

- **Hosein S, Rogers T, 2005** : Un guide pratique des plantes médicinales *pour les personnes vivant avec le VIH*. Ed Catie, canada. P 27
- **Hussein A., 1990**: Antibacterial and antifungal activity of some Libyan aromatic plants..*planta medica*, 56:644-649.
- **Il Edrisi A, 1982** : thèse de troisième cycle, étude des huiles essentielles de quelques espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc, faculté des sciences de Rabat
- **Iserin P, 1997**: Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse-Bordas, Londres, 278p
- **Jawetz.E et al., 1973** : Microbiologie médicale ed : Maloine Paris. p189,250
- **Jean E, Rene, Revuz, 2009** : Encyclopédie des plantes médicinales, Ed Larousse-Bordas, p15
- **John Spicer W., 2002** : Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie, Ed : Flammarion, ISBN : 2-257-10409-9, 122p
- **Kamoun,P. 1997** : Flammarion, *Appareil et méthodes en Biochimie et biologie moléculaire*.Paris, 418
- **Khaled Khodja N, 2009** : Etude des activités antioxydantes et antibactériennes des extraits méthanoliques de six labiées de la région de Béjaïa, Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa, p 31.
- **Khebri S., 2011**: Etude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia*. Mémoire de magister, Université El-hadj Lakhdar, Batna, p 7.
- **Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H, et Weis H., 1989**: Antibacterial and antifungal properties essential oil component. *Journal of Essential Oil Research*, vol 1 n°3, p119, 128.
- **Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y. A., Millet J. et Chaumont J. P., 2004** : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie, *Annales de médecine vétérinaire* 148, 202-206p.
- **Korichi S, 2007** : Etude du comportement de la menthe poivrée « *Mentha piperita* » sous palmeraies dans la région de Ouargla. Université Kasdi Merbah – Ouargla.
- **Lahrech. K, 2010** : extraction et analyse des huiles essentielles de *Mentha pulegium L.* ET DE *Saccocalyx satureioides*. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister, Université d'Oran Es-Sénia, 88 p.
- **Lambinon J., Delvosalle L. & Duvigneaud J.**, “La nouvelle flore de la Belgique, du G-D de Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines”. Ed.n°5, France, (1965), pp 102
- **Lamin A, Lhaloui S, Bendjilali B, Brradi M., 2001**: *Field crops Research.*, vol 71, 9-15
- **Lardry J., Haberkorn V., 2007** : Les huiles essentielles : principes de phytothérapie Rev 61, p18-23
- **Laredj H, 2004** : Les Plantes Médicinales Extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes. Université, Badji Mokhtar, Faculté de médecine département de pharmacie, Annaba.
- **Leyral.G et Vierling.E, 2007** : Microbiologie et toxicologie des aliments. Ed : Doin, France. 287 p

- **Lucchesi, M E., 2005 :** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de docteur en sciences. Université de la Reunion, p 16.
- **Machhour H, Mahrouz M , Imzilen B, Hadra I, et Idlimam A., 2008 :** Décontamination de la menthe poivrée par un traitement combiné thermochimique. Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger, p 203, 206
- **Mahboubi M, & Haghi G, 2008:** Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, vol 119: 325.
- **Maudsley F. & Kerr K.G 1999:** Microbiological safety of essential oil used complementary the raies and the activity of these compounds against bacterial and fungal pathogens. Support Care Cancer., vol 7(2): p 100,102.
- **Meena M.R et Sethi V,(1994) :** Antimicrobial activity of essential oils from Spices J. Food Sci and Tec, mysore, vol 31 p 68, 70
- **Menga1, p; Behn, D ; Gil, M. B. et Mompon, B., 1993:** Extraction d'huile essentielle par micro-ondes, *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, (114), p 66-67
- **Messali B, 1995 :** systématique des spermaphytes. OPU, Alger, p 91
- **Meyer.A et al, 2004 :** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés, Ed : Doin, France. 430 p
- **Moreira M.R., Ponce A.G, Del Valle C.E., Roura S.I., 2005:** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT, vol 38, p 565–570.
- **Moro A., 2008 :** grandes guide des huiles essentielles, santé, beauté, bien-être. Ed Hachette Pratique 3^{ème} Ed, p56
- **Moulinier C., 2003 :** Parasitologie et mycologie médicales « élément de morphologie et biologie », édition : Lavoisier, ISBN : 2-7430-0488-6, pp 747-748, 761-762
- **Nauciel C., 2001 :** Abrégé Bactériologie Médicinale, Édition : Masson, France, , ISBN : 2-294-00428-0. p 127,128, 133,134
- **Nauciel et Vildé J., 2005 :** Bactériologie médicale 2^{ème} édition, Masson, Paris, ISBN, p5, 8, 9,12
- **Newton S.M, Lau C, Gurcha S.S, Besra G.S., Wright C.W., 2002:** The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimycobacterial activities: isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol*, vol 79(1), p 57, 67.
- **Nicklin. J, Graeme-Cook. K, Praget. T, & Killington. R, 2000 :** L'essentiel en microbiologie. Ed.Berti.p:211-217.
- **Nout R., Hounhouigan J., Van Boekel T., 2003 :** Les aliments « Transformation, Conservation et Qualité », ISBN : 90-5782-124-9, 268 p.
- **Onions. A.H.S, Allosopp, D, et Eggins, H.O.W, 1981:** Smith's Introduction ton Industrial Mycology. 7^{ème} édition: Edward Arnold, London. p398
- **Ouattara Y; Sakandé B ; Simporé J ; Pr Issiaka Z, Kaboré ; Pr Innocent P, Guissou et Pr Laya Sawadogo 2003 :** Evaluation de l'activité hepatoprotectrice des extraits aqueux de plantes médicinales face a une hepatotoxicite letale induite chez la souris. Annales de l'Université de Ouagadougou, UFRSVT. Vol : 001 p 21 pp40

- **Ouldiam S., 2012** : Effet biocide de l'extrait aqueux des feuilles d'*Olea europea L.* Var. *oléaster* sur des agents infectieux. Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Master, Université Saad Dahleb DE Blida, p 52.
- **Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M. Kole C.R 1997**: Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios.*, 89 (358): p 39, 46
- **Penelope ody M, 1995** : les plantes médicinales, Paris, p 118
- **Percival. SL, 2004**: Microbiology of waterborne diseases Ed: Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston. p 480.
- **Pibiri M.C. ; 2005** ; Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ; Thèse de Doctorat de la Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit LAUSANNE ; p: 28-42
- **Pierre. M et Lis. M, 2007** : Secrets des plantes, Ed :Artemis, France. p 36
- **Pilet C, Bourdon J. L, Toma B, Marchal N, Balbastrec et Person J. M., 1987** : Bactériologie médicale et vétérinaire (Biologie appliquée). Edition : Dion, Paris, 450 p.
- **Piochon, M., 2008**: Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques. Université du Québec à Chicoutimi, Canada, 200 p.
- **Prescot J, Harley, et Klein D, 2003** : microbiologie. Ed De Boeck et Larcier, 2eme edition, Bruxelles, ISBN 2-8041-4256-6. 1101p
- **Raynaud J, 2006** : Prescription et conseils en aromathérapie. Ed tec et doc, paris, p246
- **Remmal A, Tantaoui Elaraki A, Bouchikhi T et Ettayebi M., 1993**:Inhibition if antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and Ethanol in liquid medium. *J. pharm. Belg. b*, 48(5): p 352,356.
- **Ripert C., 2013** : Mycologie médicale. Ed : TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 599p
- **Roux D, 2005** : les nouvelles plantes qui soignent, comment utiliser efficacement plus de 50 plantes médicinales. Edition Alpen, France, p42
- **Saggou. A, 2000**: Extraction des huiles essentielles de la menthe poivrée «*Mentha piperita*» de la région. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister, Université Kasdi Marbah, Ouargla, 106 p
- **Salle J-L., 1991** : « Les huiles essentielles « synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Ed : Frison-Roche, p16, 19, 20 21, 22, 23
- **Salton M.R.J & Tomasz A 1974**: Mode of action of antibiotics on microbial walls and membranes. *Ann. NY. Sci.*, 235: 31 p.
- **Saoudi k, 2013** : Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* et *Mentha spicata L.* Agronomie. Université Saad Dahleb, Blida, p 3.
- **Sauvage C., 1974** : L'état actuel de nos connaissances sur la flore du Maroc : la flore du bassin méditerranéen. Collogue du CNRS n°235, Paris.
- **Schauenberg P et paris F, 2005** : Guide des plantes médicinale. Ed Delachaux et Niestle, paris. 240 p
- **Schmidt I., 2011** : encyclopédie essentielle des plantes médicinales, Edition : intext, toulouse, p149

- **Sidali. L, Brada. M, Fauconnier. M-L, et Lognay. G, 2014 :** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. PhytoChem & BioSub Journal Vol. 8 n° 3, Algerie. p 160
- **Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M & Al-Ahdal M.N., 1996:** Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. Med. Sci.Res., 24 : 185-186
- **Siegenthaler W & LuthyR., 1978:** Current chemotherapy. Proceeding 10th international congress of chemotherapy.II. Am. Soc. Microbial, Washington DC.
- **Sisaber S., Bellahcene I., 2012** Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de géranium rosat (*pelargonium graveolens*) et de bigaradier (*citrus aurantium*) Mémoire d'enseignement supérieur en biologie Université Saad Dahleb de Blida. p 13
- **Sofowora. A, 2010:** Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed: Karthala, Nigeria. 378p
- **Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F., 2004:** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. Food Control;40: p627
- **Sqalli H, El Ouarti A, Ennabili A, Ibsouda S, Farah A, Haggoud A, et Houari A., 2007 :** évaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre-nord du Maroc. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, vol 146, p271-288.
- **Teuscher E, Anton R, et Lobstein A, 2005 :** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 522p
- **Tharib, S. M., Gnan, S.O., Veitch, G.B.A, 1983:** Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. J. Food. Prot. 46, p 681, 685.
- **Valnet J, 1984 :** Traitement des maladies par les essences des plantes, 10^{ème} édition, Ed Maloine S.A. p 235-239.
- **Verdrager J, 1978 :** ces médicaments qui nous viennent des plantes ou les plante médicinales dans les traitements modernes. Ed Maloine S.A, paris. p 163,164
- **Vokou D, Kokkini S, et Bressiere J.M., 1988 :** *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece
- **Yakhlef G., 2010 :** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris L.* et *Laurus nobilis L.*, thèse de Magister en biochimie appliqué, université de Batna : 78p.
- **Yuredon, 2004 :** La filière plante, extraits, huiles essentielles, l'échiquier des années 30, Edition Octaèdre, Toulouse, 10p.
- **Zaika L., 1988:** Spicer and herbs, their antibacterial activity and its determination. J. foodSaf 23:97-118.

Annexes

Annexe 1 :

- Anse de platine,
- Ballon de 500 ml,
- Bec bunsen,
- Boite de Pétri,
- Becherecher,
- Barreau magnétique,
- Crayon marqueur,
- Ecouvillon,
- Etiquette,
- Erlenmeyer,
- Gants,
- Papier aluminium,
- Papier buvard,
- papier filtre
- plaque chauffante
- Règle
- Pince,
- Pipette pasteur,
- Portoir,
- Seringue,
- Tube à essai,

❖ Réactifs :

- Alcool,
- Eau distillé,
- Eau physiologique à 0.9%.

Annexe 2 :



S. typhi



B. subtilis



B. cereus



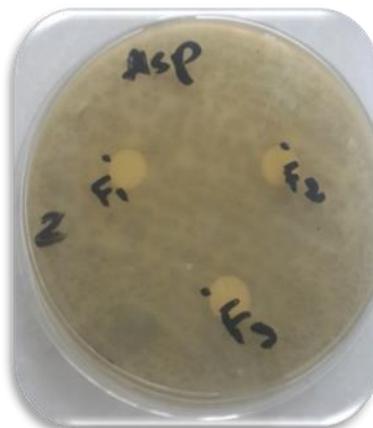
E. coli



P. aeruginosa



C. albicans



A. brasiliensis

Figure 30 : tests de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de *M. pulegium* par procédé d'infusion.



E. coli



C. albicans



P. aeruginosa



S. typhi



B. cereus



B. subtilis



A. brasiliensis

Figure 31 : Tests de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux de *M. pulegium* par procédé de macération.

Annexe 3 :



Figure 32 : Etuve d'incubation 37°C



Figure 33 : Balance



Figure 34 : Bain marie



Figure 35 : hydrodistillateur



Figure 36 : Réfrigérateur

Annexe 4 :

❖ La composition des principaux milieux de cultures utilisés :

➤ Gélose nutritive

Extrait de levure.....	2g
Extrait de viande.....	1g
Agar.....	5g
NaCl.....	5g
Peptone.....	15g

Ph=7,4

➤ Mueller-Hinton

Extrait de viande de bœuf.....	300g
Infusion de viande de bœuf.....	17.5g
Hydrolysate de caséine.....	1.5g
Gélose.....	10g

Ph=7,4

➤ Gélose sabouraud

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

Ph=6,3