



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

Scientifique

Université Dr. Moulay Tahar de Saida

Faculté des Sciences

Département De Biologie

Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation biologique des Plantes



**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MASTER EN BIOLOGIE**

Option : **Microbiologie appliquée**

Présenté par :

M^{elle}. ABIDI Asmaà

Sur le thème intitulé :

**Contribution à l'étude des activités biologiques des extraits de
Mentha pulegium et le mécanisme d'action de l'extrait
méthanolique sur *Staphylococcus aureus***

Soutenu le : 21 - 07 -2019.

Devant la commission de jury, composée de :

M. SI TAYEB T.	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Président
M. BENREGUIEG.M	Maître de conférences -A-	U T. M. de Saïda	Examineur
M. HALLA Nouredine	Maître Assistant classe -A-	U T. M. de Saïda	Encadreur

Année universitaire 2018/ 2019

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah le tout puissant, merci de m'avoir accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de mon rêve et le bonheur d'achever ce travail.

Je tiens à remercier mon encadreur, Mr HALLA N. (Maître Assistant classe -A- à l'université de Saida), merci pour le sujet si passionnant qu'il m'a proposé. Je le remercie pour le temps qu'il m'a accordé durant cette période de travail et ce malgré son emploi du temps si chargé, pour toutes les corrections qu'il a apportées pour mon rapport de master.

Je souhaite remercier Mr Si TAYEB.T (Maitre de conférences A à l'université de Saida, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce projet.

J'adresse mes remerciements à BENREGUIEG.M (Maître de conférences –A- à l'université de Saida), d'avoir accepté de juger ce travail. Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude pour son aide.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida particulièrement monsieur Hamad Ahmed.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université de l'université de Mostaganem.

Mes sincères remerciements vont également à KRIM Taha pour m'avoir considérablement aidé dans les tests réalisés avec une remarquable efficacité.

J'exprime ma profonde gratitude à BRAHIMI Mustapha pour son aide et ses conseils.

Je tiens également à remercier très sincèrement l'ensemble de mes collègues et amies, plus particulièrement Fatna, Chiraz, Majda, Soumeya et Nourhane pour l'atmosphère qu'elles ont toujours créée au laboratoire.

Je remercie ma famille, mes frères, ma sœur, ma très chère mère, mes belles sœurs pour leur soutien, mais aussi leur compréhension pour les choix qui sont les miens.

Je tiens à remercier également mes très chers parents, et mon très cher père, ceux à qui je dois tout. Une pensée particulière à mon très cher père à qui je dis, je t'aime.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements

Dédicace

À ma source d'inspiration

À celui à qui je ressemble

À mon très cher père

À ta mémoire et tout ce que tu représentes pour moi

J'espère que tu te reposes en paix là où tu es

À mes grands pères

À ma famille et à mes proches et mes amis

Résumé

La médecine traditionnelle a toujours occupé une place importante dans les traditions de médication en Algérie. Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une contribution à l'étude des activités biologiques de *Mentha pulegium*. Une enquête a été effectuée dans la région de Saida pour mettre en évidence les différentes utilisations traditionnelles de la plante étudiée. Ensuite, la préparation de différents extraits a été réalisée suivie par un screening phytochimique. Après, une évaluation de l'activité antioxydante (capacité totale et piégeage du DPPH) et de l'activité antimicrobienne (diffusion des disques et microdilutions) ainsi que l'étude de la cytotoxicité ont été effectués. En plus, une étude de l'effet de l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus* a été réalisée.

Trois extraits ont été préparés, il s'agit de l'extrait méthanolique (macéré), l'extrait aqueux (infusé) et l'huile essentielle. Les résultats obtenus ont enregistré que l'extrait méthanolique avait un rendement le plus élevé 12.26 % parmi les extraits étudiés. Le screening phytochimique a montré la présence de différents métabolites secondaires (Alcaloïde, les polyphénols, coumarines, quinones). L'évaluation d'activité antioxydante a révélé que cette plante a des très bonnes propriétés antioxydantes, avec une capacité totale de 201,08 mg EAG/g MS et 44,13 mg EAG/g MS pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux respectivement. Le test de DPPH a montré que l'extrait aqueux est le plus actif comme un piègeur des radicaux libres avec une IC₅₀ de l'ordre de 0,23 mg/ml. Les tests de sensibilité des microorganismes ont révélé que *Candida albicans* ATCC 10231 était la plus sensible à l'extrait méthanolique (37,5 mm) par la méthode de diffusion en milieu solide. Cependant, les concentrations minimales inhibitrices obtenues sont comprises entre 1,56 à 6,25 mg/ml (extrait méthanolique), entre 1,56 et 50 mg/ml (extrait aqueux) et entre 3,125 et 25 mg/ml (huile essentielle). Les extraits de *Mentha pulegium* ont montré des effets cytotoxiques à des concentrations de 0.39, 0.78, 1.56, 3.125 mg/ml vis-à-vis les globules rouges. Enfin, l'étude de l'effet de l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus* a enregistré un effet bactéricide, inhibiteur de la tolérance au sel et inhibiteur aux lipases.

Mots clé : *Mentha pulegium*, phytochimie, antioxydante, antibactérienne, antifongique, cytotoxicité, extrait méthanolique, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Traditional medicine had always a heavy weight in the Algerian traditional medication. This work is a part of the contribution to the study of *Mentha pulegium*'s biological activities. At this term, a survey has been carried out in Saida region in order to highlight the different traditional use of this plant. After that, a phytochemical screening followed the preparation of different extracts. Afterwards, an evaluation of the antioxidant activity (total capacity and DPPH scavenging), in addition to, the antimicrobial activity (agar diffusion and microdilutions), the study of the plant cytotoxicity. Finally a study of methanolic extract effect on *Staphylococcus aureus*.

Three extracts were prepared from the plant; a methanolic extract (macerated), an aqueous extract (infused) and the essential oils. The obtained results claimed that the methanolic extract had the highest yield with 12.26% among the studied extracts. Phytochemical screening revealed the presence of different secondary metabolisms (alkaloid, polyphenols, coumarins, quinones). The evaluation of antioxidant activity showed that this plant has very good antioxidant properties, with a total capacity of 201.08 mg EAG / g MS and 44.13 mg EAG / g MS for the methanolic extract and the aqueous one respectively. The DPPH test showed that the aqueous extract is the most active as a scavenger of free radicals with a CI50 of 0.23 mg / ml. Susceptibility test of microorganisms revealed that *Candida albicans* ATCC 10231 was the most sensitive to the methanolic extract (37.5 mm) by agar diffusion method. However, the minimum inhibitory concentrations obtained are between 1.56 to 6.25 mg / ml for the methanolic extract, and between 1.56 to 50 mg / ml for aqueous extract, and between 3.125 to 25 mg / ml for the essential oils. . The extracts of *Mentha pulegium* showed cytotoxic effects at concentrations of 0.39, 0.78, 1.56, 3.125 mg / ml to the blood cells. Finally, the study of the methanolic extract effect on *Staphylococcus aureus* recorded a bactericidal effect, inhibitor of salt tolerance and lipase inhibitor.

Key words: *Mentha pulegium*, phytochemical screening, antioxidant activity, antibacterial and antifungal activities, cytotoxicity, methanolic extract, *Staphylococcus aureus*.

ملخص

هذا البحث هو جزء من مساهمة في دراسة الأنشطة البيولوجية للنعناع البولوجي، تم إجراء مجموعة من البحوث بهدف تسليط الضوء على الاستخدامات المختلفة للنعناع البولوجي في منطقة سعيدة لتسليط الضوء على الاستخدامات التقليدية المختلفة للنبات الذي تمت دراسته. بعد ذلك، تم إعداد المستخلصات المختلفة متبوعة بفحص كيميائي نباتي. بعد ذلك، تم إجراء تقييم لنشاط مضادات الأكسدة (السعة الكلية وعزل DPPH) ونشاط مضادات الميكروبات (تثاثر الأقراص والميكروميد) ودراسة السمية الخلوية. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء دراسة لتأثير المستخلص الميثانولي على المكورات العنقودية الذهبية.

تم تحضير ثلاثة مستخلصات وهي المستخلص الميثانولي (منقوع)، المستخلص المائي (مسرب) والزيوت الأساسية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مستخلص الميثانول حقق أعلى مردود بنسبة 12.26% بين المستخلصات التي تمت دراستها. أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مستقلبات ثانوية مختلفة (قلويد، بوليفينول، كومارين، كينون). كشف تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن هذا النبات له خصائص مضادة للأكسدة جيدة للغاية، بسعة إجمالية قدرها 201.08 ملغ / EAG جم MS و 44.13 ملغ / EAG غ MS للمستخلص الميثانولي والمستخلص مائي على التوالي. DPPH أن المستخلص المائي هو الأكثر نشاطاً في إيقاف الجذور الحرة في فخ مع IC50 من 0.23 ملغ / مل.

كشفت اختبار الحساسية للكائنات الحية الدقيقة عن طريق طريقة الانتشار الصلبة أن المبيضات البيضاء هي الأكثر حساسية (37.5 ملم) ومع ذلك، فإن الحد الأدنى من التركيزات المثبطة التي يتم الحصول عليها تتراوح بين 1.56 إلى 6.25 ملغ / مل (مستخلص الميثانول)، بين 1.56 و 50 ملغ / مل (مستخلص مائي) وبين 3.125 و 25 ملغ / مل (زيت أساسي). آثار السامة للخلايا بتركيزات 0.39، 0.78، 1.56، 3.125 ملغ / مل ضد خلايا الدم الحمراء. تأثير مستخلصات النعناع البولوجي على كريات الدم الحمراء كان سام بالتركيزات التالية 0.39_0.78_1.56_3.125 مل.

أخيراً، سجلت دراسة تأثير مستخلص الميثانول على المكورات العنقودية الذهبية تأثيراً مبيداً للجراثيم ومثبطاً لتحمل الملح ومثبط الليباز.

الكلمات المفتاحية: النعناع البولوجي، الكيمياء النباتية، مضادات الأكسدة، مضاد للجراثيم، مضاد للفطريات، السمية الخلوية، مستخلص الميثانول، المكورات العنقودية الذهبية.

Sommaire

Résumé.....	(i)
Liste des figures	(ii)
Liste des tableaux	(iii)
Liste d'abréviation	(iv)
Introduction	2

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales et Mentha pulegium

I. Les plantes médicinales	6
II. La phytothérapie.....	7
III. Propriétés et vertus thérapeutiques des plantes médicinales.....	8
IV. Métabolites secondaires.....	8
IV.1 Définition	8
IV.2 Classification	9
IV.2.1 Polyphénols	9
IV.2.2 Alcaloïdes	10
IV.2.3 Terpenoïdes et stéroïdes	11
IV.3 Propriétés pharmacologiques	12
IV.4 Procédés d'extraction	13
V. La plante étudiée : <i>Mentha pulegium</i>	13
V.1 Historique	14
V.2 Classification botanique	14
V.3 Généralités sur la famille et le genre	15
V.3.1 La famille	15
V.3.2 Le genre	15
V.3.3 Description botanique	15
V.3.4 Habitat	16
V.3.5 Origine et distribution	16
V.3.6 Composition chimique	17
V.3.7 Propriétés biologiques	17
V.3.8 Toxicité	18

Chapitre II : Généralités sur les activités biologiques des plantes médicinales

I. Activités antioxydants	20
---------------------------------	----

I.1 Oxydation	20
I.2 Radical libre	21
I.3 Antioxydant	22
I.3.1 Antioxydants primaires (Systèmes de défense enzymatiques)	24
I.3.2 Les antioxydants secondaires (Systèmes de défense non enzymatiques)	25
I.4 Pouvoir antioxydant de <i>Mentha pulegium</i>	25
II. Activités antimicrobiennes	26
II.1 Infection microbienne (bactérienne ou fongique)	26
II.2 Antimicrobiens	27
II.2.1 Antibactérien.....	27
II.3 Antifongique	28
II.4 Pouvoir antimicrobien de <i>Mentha pulegium</i>	28

Chapitres III : Mécanisme d'action des antioxydants et des antimicrobiens

I. Mécanismes d'action des antioxydants	31
II. Mécanismes d'action des antimicrobiens	32
II.1 Mode d'action antibactérien des huiles essentielles.....	33
II.2 Mode d'action antifongique des huiles essentielles.....	35

Chapitre IV : Généralités sur les souches testées

I. Bactéries à Gram positif	38
I.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	38
I.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	39
I.3 <i>Bacillus cereus</i>	40
II. Bactéries à Gram négatif	41
II.1 <i>Escherichia coli</i>	41
II.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
II.3 <i>Salmonella Typhimurium</i>	43
III. Levures	44
III.1 Genre <i>Candida</i>	44

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel	48
1.1. Zone d'étude	48
1.2. Matériel végétale	48

1.3. Matériel biologique	50
2. Méthode	51
2.1. Enquête ethnopharmacologique	51
2.2. Préparation des extraits	52
2.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique)	55
2.4. Evaluation de l'activité antioxydante	61
2.4.1. Capacité antioxydante totale	61
2.4.2. Piégeage du radical libre DPPH'	62
2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne	63
2.5.1. Revivification et repiquage des souches microbiennes	64
2.5.2. Méthode de diffusion en milieu solide	64
2.5.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide	67
2.5.4. Evaluation de l'activité antifongique	70
2.6. Etude de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique sur <i>Staphylococcus aureus</i>	71
2.6.1. Test de la viabilité cellulaire à différentes concentrations	71
2.6.2. Test de viabilité cellulaire en fonction de la durée du traitement (cinétique)	72
2.6.3. Tolérance au sel	72
2.6.4. Activité des lipases	72
2.7. Etude de la cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes	73

Résultats et discussion

1. Enquêtes ethnopharmacologique	75
1.1. Profil des informateurs	75
1.2. Informations générales sur la plante	79
1.3. Information sur la préparation et l'utilisation médicale	80
2. Rendements obtenus des extraits	85
3. Screening phytochimique	87
4. Activité antioxydante des extraits de <i>Mentha pulegium</i>	89
4.1. Capacité antioxydante totale	89
4.2. Activité antiradicalaire (DPPH)	90
5. Activité antimicrobienne	92
5.1. Méthode de diffusion en milieu solide	93
5.2. Méthode de microdilution	97
5.3. Activité antifongique	99

6. Effet antibactérien de l'extrait méthanolique sur <i>Staphylococcus aureus</i>	101
6.1. La viabilité cellulaire	101
6.2. Tolérance au sel	102
6.3. Activité des lipases	103
7. Cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes	104
Conclusion	108
Références bibliographiques	112
Annexes	120

Liste des figures

Figure 01 :	<i>M. pulegium</i>	16
Figure 02 :	Activité principale des polyphénols : le piégeage de radicaux libres	32
Figure 03 :	La position géographique de la zone d'étude	48
Figure 04 :	les parties aériennes de Menthe Pouliot (photos originale).	49
Figure 05 :	les globules rouges utilisées dans cette étude (photo originale).	50
Figure 06 :	schéma de protocole d'extraction (macération et infusion)	53
Figure 07 :	Autocuiseur adapté pour extraire l'huile essentielle par entraînement à la vapeur (photo originale)	54
Figure 08 :	schéma des tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes	56
Figure 09 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols	57
Figure 10 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des coumarines	58
Figure 11 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des quinones	58
Figure 12 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des composés réducteurs	59
Figure 13 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des stéroïdes et triterpènes	59
Figure 14 :	Schéma des tests phytochimiques pour la détection des saponines	60
Figure 15 :	Equation du radical DPPH transformé en DPPHH	62
Figure 16 :	Piégeage du radical libre DPPH [·]	63
Figure 17 :	quelques étapes de la méthode de diffusion en milieu solide	67
Figure 18 :	Préparation de la microplaque	70
Figure 19 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la tranche d'âge	75
Figure 20 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le genre et la situation familiale.	76
Figure 21 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le niveau d'étude	77
Figure 22 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la source de leurs informations	78
Figure 23 :	Répartition des noms, des sources et des natures de la plante étudiée	79
Figure 24 :	Répartition des techniques et saison de récolte de la plante étudiée	80
Figure 25 :	Répartition de l'utilisation de plante étudiée selon leurs parties utilisées	81
Figure 26 :	Répartition de l'utilisation de plante étudiée selon leurs formes utilisées	82

Figure 27 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le mode de préparation	82
Figure 28 :	Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la posologie et la durée d'utilisation	83
Figure 29 :	Pathologies traitées par la plante étudiées dans la région de Saida.	84
Figure 30 :	Rendement (%) des extraits de <i>Mentha pulegium</i>	86
Figure 31 :	courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante	89
Figure 32 :	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH [•] en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique	90
Figure 33 :	Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH [•] de l'extrait méthanolique testé (chaque valeur représente la moyenne de deux essais ± SD).	91
Figure 34 :	Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH [•] de l'extrait aqueux testé (chaque valeur représente la moyenne de deux essais ± SD).	91
Figure 35 :	Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne	94
Figure 36 :	pourcentages d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait méthanolique	100
Figure 37 :	les résultats de test de la viabilité cellulaire à différentes concentrations d'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis les cellules de <i>staphylococcus aureus</i> en milieu neutralisateur.	101
Figure 38 :	Cytotoxicité de l'extrait aqueux d' <i>Mentha Pulegium</i> vis-à-vis les globules rouges humains	102
Figure 39 :	les résultats de test de tolérance au sel à différentes concentrations d'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis les cellules de <i>S. aureus</i> en milieu GN-NaCl	103
Figure 40 :	les résultats de test de l'activité de lipase à différentes concentrations d'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i> vis-à-vis les cellules de <i>S. aureus</i> en milieu AST	104
Figure 41 :	Cytotoxicité de l'extrait méthanolique d' <i>Mentha Pulegium</i> vis-à-vis les globules rouges humains.	105
Figure 42 :	Cytotoxicité de l'extrait aqueux de <i>Mentha Pulegium</i> vis-à-vis les globules rouges humains.	106

Figure 43 : Cytotoxicité de l'huile essentielle d'*Mentha Pulegium* vis-à-vis les globules rouges humains.

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Classifications des composés phénoliques	10
Tableau 2 :	classification des alcaloïdes	11
Tableau 3 :	Composition chimique en huiles essentielles de <i>M. pulegium</i> de différentes origines	17
Tableau 4 :	Principales sources de production des radicaux libres	22
Tableau 5 :	Principaux modes d'action de quelques antioxydants	23
Tableau 6 :	Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes des huiles essentielles	34
Tableau 7 :	Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Tableau 8 :	Taxonomie de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
Tableau 9 :	Taxonomie de <i>Bacillus cereus</i>	40
Tableau 10 :	Taxonomie d' <i>Escherichia coli</i>	41
Tableau 11 :	Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tableau 12 :	Taxonomie de <i>Salmonella Typhimurium</i>	43
Tableau 13 :	Taxonomie de <i>Candida albicans</i>	45
Tableau 14 :	lieu de récolte de la plante et les caractéristiques bioclimatiques de la zone de récolte	49
Tableau 15 :	les différentes souches utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes	51
Tableau 16 :	les concentrations utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante	61
Tableau 17 :	les concentrations utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	65
Tableau 18 :	Caractéristiques et rendement des extraits de la plante de <i>Mentha pulegium</i>	86
Tableau 19 :	Résultat de la phytochimie qualitative des extraits (méthanolique, aqueux) de <i>Mentha pulegium</i>	87
Tableau 20 :	la capacité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de <i>Mentha pulegium</i>	89
Tableau 21 :	le pouvoir antioxydant (exprimé par IC50 (en mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés	92
Tableau 22 :	Diamètres d'inhibition observés avec l'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i>	93
Tableau 23 :	Diamètres d'inhibition observés avec l'extrait aqueux de <i>Mentha pulegium</i>	95

Tableau 24 :	Diamètres d'inhibition observés avec l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	96
Tableau 25 :	CMI et CMB des extraits de <i>Mentha pulegium</i>	98
Tableau 26 :	Effet de différentes concentrations d'extrait méthanolique de <i>Mentha pulegium</i>	99

Liste d'abréviation

PM	: Plante médicinale
HE	: Huile essentielle
BHA	: Hydroxyanisole butylé
BHT	: Hydroxytoluène butylé
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
ADN	: Acide désoxyribonucléique
SOD	: superoxyde Dismutase
GPX	: glutathion peroxydase
MO	: Microorganisme
PAM	: Plante Aromatique médicinale
EAG	: Equivalent d'Acide Gallique
MS	: Matière sèche
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
%	: Pourcentage
µm	: Micromètre
mm	: millimètre
°C	: Degré Celsius
CMI	: concentration minimale inhibitrice
CMB	: concentration minimale bactéricide
CMF	: concentration minimale fongicide
km	: kilomètre
g	: gramme
UV	: ultraviolet
nm	: Nanomètre
I	: Indice de mousse
DPPH	: radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
CAT	: capacité antioxydante totale
µl	: microlitre
mg	: Milligramme
MS	: Matière sèche
IC50	: concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition

BN : Bouillon nutritif
GN : Gélose nutritif
MH : Mueller Hinton
PDA : Potato Dextrose Agar
DMSO : diméthylesulfoxyde
PBS : solution tampon phosphate
AST : Agar Salty Tween
SD : Standard déviation
ATCC : American type culture collection
EM : Extrait méthanolique
ID : Indéterminé
ml : Millilitre
h : Heur
Rdt : Rendement
UFC : Unité formant colonie

Introduction générale

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien-être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels comme « les plantes » pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui la médecine traditionnelle.

Les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. L'utilisation des plantes médicinales a évolué progressivement avec l'évolution des besoins de l'homme (**Zekri, 2017**). La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne (**Benzeggouta, 2005**).

Les menthes font parties de la famille des Labiées (Lamiaceae). Cette famille regroupe des plantes herbacées, répandues dans le monde entier (à l'exception de l'Antarctique). Elles sont pour la plupart aromatiques (basilic, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, serpolet, thym,...), (**Sutour, 2010**).

Mentha Pulegium (également connu comme menthe pouliot) pousse dans les zones humides des plaines et des montagnes jusqu'à 2200 mètres d'altitude. Appartenant à la famille des Lamiaceae, possédant des propriétés antibactérienne, antifongique, antioxydante, antiviral, antiinflammatoire, insecticide (**Chraibi et al., 2018**).

Dans ce contexte, nous sommes intéressées à l'étude de l'espèce médicinale *Mentha pulegium*, appartenant au genre *Mentha*. L'objectif de notre travail s'adresse à la valorisation de la plante aromatique et médicinale utilisée en médecine traditionnelle *Mentha pulegium* et l'évaluation de quelques activités biologiques de ses extraits.

Dans cette perspective la problématique du thème se focalise sur :

- ✓ La caractérisation des composés phytochimique des extraits de *Mentha pulegium*.
- ✓ Evaluation du pouvoir antioxydant pas deux méthodes : capacité antioxydante totale et le test de piégeage du radical DPPH.
- ✓ L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et des huiles essentielles de *Mentha pulegium* par la méthode de diffusion de disques et la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides et fongicides (CMB) et (CMF) vis-à-vis six souches bactériennes et trois espèces fongiques (levures) ainsi que l'évaluation de l'activité fongique contre quatre espèces fongiques (champignons).

- ✓ Etude de la cytotoxicité des extraits de *Mentha pulegium* vis-à-vis les érythrocytes.
- ✓ L'étude de mécanismes d'actions de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* à différentes concentrations vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par les tests de la variabilité cellulaire, tolérance au sel et l'activité des lipases.

Ce manuscrit est divisé en trois parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique. Nous avons entamé cette partie par des généralités sur les plantes médicinales et une présentation et les aspects botaniques et phytochimiques de la plante étudiée, ses activités biologiques, et enfin les mécanismes d'action des antimicrobiens.

Dans la deuxième partie, qui correspond à la méthodologie, nous présenterons nos stations d'études, notre matériel végétal (les parties du végétale traitées) et nous exposerons les différentes méthodes utilisées dans notre partie pratique pour l'extraction et les tests phytochimiques, l'extraction des huiles essentielles ainsi que les tests de pouvoir antioxydant, l'activité antimicrobienne, et la cytotoxicité vis-à-vis les globules rouges et le mécanisme d'action de *Mentha pulegium*,

Nous présenterons et discuterons les résultats obtenus dans la troisième partie de ce travail. Enfin, nous terminerons par une conclusion générale.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Généralités sur les plantes médicinales
et Mentha pulegium

Depuis des milliers d'années, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour subvenir à leurs besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour leurs besoins médicaux. L'utilisation des plantes médicinales a évolué progressivement avec l'évolution des besoins de l'homme (Zekri, 2017). La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne. Alors que se soigner par les plantes est un instinct, qui se retrouve d'ailleurs dans le comportement des animaux (Benzeggouta, 2005).

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir des plantes médicinales (PM) n'a augmenté que durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement (Ghazghazia et al., 2013). Elles produisent des composés actifs phytochimiques ayant un effet pharmacologique sur les organismes vivants (Brahmi et al., 2015).

La phytothérapie c'est une pratique très ancienne, qui consiste à l'utilisation des propriétés pharmacologiques des plantes médicinales grâce aux nombreux et divers principes actifs qu'elles renferment (Iserin et al., 2001).

Les menthes font parties de la famille des Labiées (Lamiaceae), une vaste et importante famille très typique du monde végétal. Près de la moitié (47 %) des plantes médicinales appartiennent à la famille des Lamiaceae. Cette famille regroupe des plantes herbacées, répandues dans le monde entier (à l'exception de l'Antarctique), mais particulièrement présentes dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. Ces espèces sont pour la plupart aromatiques (basilic, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, serpolet, thym,...), partiellement ligneuses et forment des arbustes et très rarement des arbres. Leurs caractéristiques communes sont les suivantes : les fleurs sont hermaphrodites, le calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et présente souvent deux lèvres (Sutour, 2010).

Les plantes médicinales :

Les plantes ont, toujours, fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir et se soigner. Les extraits des plantes étaient, déjà, connus et utilisés par les égyptiens,

les romains et les grecs, pour leurs propriétés odorantes et médicinales [(Cowan, 1999) ; (Fellah et al., 2006) ; (Salhi, 2010)].

La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (Bruneton, 1987).

D'après la Xème édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques (Debuigne, 1974). En d'autres termes, une plante médicinale regroupe l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Parmi les principales plantes médicinales les plus connues figurent, entre autres, l'absinthe qui facilite la digestion, le cacao qui régulent l'humeur ou encore l'eucalyptus très apprécié pour lutter contre la toux (Horde, 2014).

La phytothérapie :

La phytothérapie, vient du mot grec "pluton" plante et "therapeia" traitement, signifie traitement par les plantes (Chabrier, 2010). C'est une pratique très ancienne, qui consiste à l'utilisation des propriétés pharmacologiques des plantes médicinales grâce aux nombreux et divers principes actifs qu'elles renferment (Iserin et al., 2001).

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public à cause des produits pharmaceutique et d'extraction qu'elles fournissent [(Marc, 2001) ; (Diallo, 2005)], et donc l'industrie pharmaceutique, s'appuie largement sur la diversité des métabolites secondaires pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiquement actives. Cette source semble inépuisable puisque seul une petite partie des 400000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plantes médicinales, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann et al., 1998).

La législation française impose que les PM et les médicaments de la phytothérapie ne présentent que peu de risque de surdosage, toxicité et d'associations dangereuses. La phytothérapie est

donc adaptée aux pathologies légères et aux traitements symptomatiques, c'est une thérapeutique familiale, de conseil, souvent préventive (**Azzouz, 2007**)

Propriétés et vertus thérapeutiques des plantes médicinales :

Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent. De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires (**Cardon et Du chatenet, 1990**).

Il est clair que certains de ces composés, au moins à l'état pur et à certaines doses, ont des propriétés médicinales ou peuvent être toxique. Toutefois, il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés sont aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se trouvent dans la plante lorsqu'ils en sont extraits, car il peut y avoir des effets synergiques des composés chimiques dans la plante (**Elbidi, 2016**).

En d'autres termes nous pouvons dire qu'une plante médicinale regroupent l'ensemble des plantes dont un ou plusieurs de leurs organes sont utilisés pour leurs vertus thérapeutiques. Il peut s'agir de la tige, des feuilles, de l'écorce ou encore des racines qui sont employées à des fins curatives (**Hodre, 2014**).

Métabolites secondaires :

Définition :

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas nécessaires à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon. Il s'agit généralement de molécules de taille et de masse faibles par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces (**Sutour, 2010**).

Ces métabolites secondaires se trouvent en général par de faibles concentrations dans les tissus végétaux ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes dévoués (**Zekri, 2017**). Ils sont possiblement des constituants fondamentaux de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (**Krief, 2003**).

Classification :

Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes, il s'agit des composés phénoliques, des terpènes et stéroïdes et des composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (**Krief, 2003**).

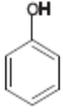
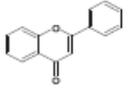
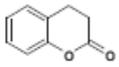
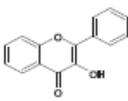
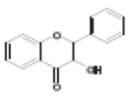
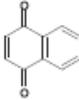
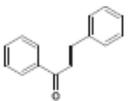
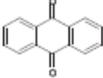
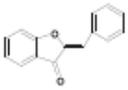
Polyphénols :

Les polyphénols sont des alcools aromatiques. Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux (**Obame Engonga, 2009**). Ce groupe renferme les acides phénoliques, les coumarines, les quinones, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins [(**Obame Engonga, 2009**) ; (**Zekri, 2017**)].

Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (**Kahlouche, 2014**), constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Bien qu'ils n'exercent pas une fonction directe dans l'organisme végétal (croissance ou reproduction) mais ils jouent un rôle fondamental aux niveaux sensoriels (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnels (**Zekri, 2017**). L'élément structurel fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction, éther, ester, hétéroside [(**Obame Engonga, 2009**) ; (**Zekri, 2017**)].

Leurs nombreuses propriétés pharmacologiques in vitro sont généralement liées à leur affinité pour les protéines et à leurs propriétés antioxydantes (**Obame Engonga, 2009**). En effet, leurs rôles d'antioxydants naturels suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et des maladies cardiovasculaires. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Zekri, 2017**).

Tableau 1 : Classifications des composés phénoliques (Aboya Moroh, 2013).

Groupe	Sous-groupe	Structure de base	Groupe	Sous-groupe	Structure de base
Phénol simple			flavonoïdes	Flavone	
Coumarine				Flavonone	
Quinones	Benzoquinone			Flavononol	
	Naphtoquinone			Chalcone	
	Anthraquinone			Aurone	

Alcaloïdes :

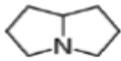
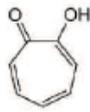
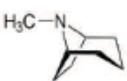
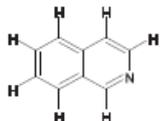
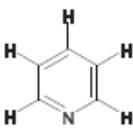
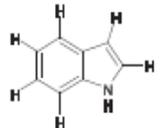
Les alcaloïdes sont des molécules organiques azotées de faibles poids moléculaires d'origine naturelle (Obame Engonga, 2009). Ils possèdent des structures hétérocycliques et se retrouvent dans environ 20% de toutes les espèces de plantes (Kahlouche, 2014). On trouve des alcaloïdes principalement chez les végétaux, les champignons et quelques animaux. Habituellement ce sont des dérivés des acides aminés (Zekri, 2017).

Généralement, ils sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Zekri, 2017).

Les alcaloïdes sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau, facilement solubles dans l'alcool et peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff,etc) (Zekri, 2017).

Les alcaloïdes ont la propriété de former des sels et d'être amers. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation. Leurs propriétés sont généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques par exemple, céphéline (antifongique, antibactérien) et émétine (amoebicide, antiprotozoaire, amibiase) (Zekri, 2017).

Tableau 2 : classification des alcaloïdes (Aboya Moroh, 2013).

Groupe	Structure de base	Groupe	Structure de base
Les pyrrolizidines		Tropolone	
Les tropanes		Les isoquinoléines	
les pyridines		Les indoles	

Terpenoïdes et stéroïdes :

Ils constituent le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux. Tous les terpènes et stéroïdes peuvent être biosynthétisés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonés ramifiés du 2-méthylbutadiène (Zekri, 2017).

Deux de propriétés fondamentales de terpènes sont leurs caractères odoriférants (géranium) et leurs sensibilités à la lumière. Un grand nombre d'entre eux possède des propriétés antiseptiques (Kahlouche, 2014). Les terpenoïdes sont connus comme doués de propriétés antifongiques et antibactériennes (Kahlouche, 2014).

Les stéroïdes ne sont pas des terpènes mais des composés de biodégradation de triterpènes. Ils constituent une classe de composés abondamment présents dans la nature (Zekri, 2017). Les stérols sont des constituants essentiels des membranes cellulaires qui jouent un rôle très important dans la perméabilité de celles-ci et aussi dans la prolifération cellulaire (Kahlouche, 2014). Ils se trouvent aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Ce sont des métabolites secondaires dont l'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel est majeur (Zekri, 2017).

Les terpènes forment une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine, ils sont les plus représentés dans la constitution chimique des huiles essentielles (Kahlouche, 2014). Les huiles essentielles sont des composés complexes, naturels, lipophiles, volatils, incolores ou jaunâtres, plus ou moins fluides et liquides à température ambiante, caractérisés par une forte odeur. Elles sont formées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires (Hajlaoui et al., 2009).

Propriétés pharmacologiques :

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales, antioxydante... [(Harborne, 1998) ; (Bruneton, 1999)]. Chaque métabolite secondaire présente des propriétés particulières comme suit :

- 1) Les flavonoïdes qui sont des composés qui possèdent de fortes propriétés antioxydantes (Rice-Evans, 1995). Ils sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (Dixon et al., 1983), et par conséquent agissent comme substances antimicrobiennes efficaces in vitro contre les microorganismes [(Recio et al., 1989) ; (Cowan, 1999)].
- 2) Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celles des flavonoïdes vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-œdémateuses. Il s'agit, en outre, de composés veinoactifs doués d'une propriété vitaminique (Bruneton, 1999).

- 3) Les acides phénols sont des anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, hépato - protecteurs et des immunostimulants (**Bruneton, 1999**).
- 4) Les coumarines, connues pour leurs propriétés antioedémateuses, ont fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints du cancer tardif, car ils sont rapidement métabolisés au niveau du foie en 7-hydroxycoumarine (**Fujioka et al., 1999**). Il n'est pas exclu que les propriétés antiinflammatoires et analgésiques attribués au frêne soient dues aux coumarines [(**Chen et al., 1995**) ; (**Garcia-Agaezet et al., 2000**)]. L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques (**Resch et al., 1998**), antivirale (**Yoshikawa et al., 1994**) et antimicrobienne (**Kayser et Kolodziej, 1997**).
- 5) Les tanins favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (**Kansole, 2009**).
- 6) Les corps terpéniques sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, antiinflammatoires et analgésiques (**Bruneton, 1999**).
- 7) Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de la phytothérapie, l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles sont utilisées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques (**Boukhebti et al., 2011**).

En générale, les métabolites secondaires ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Amarti, 2009**). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite in vitro ainsi que les activités antispasmodique, diurétique (**Hans, 2007**), antioxydante et anti-inflammatoire et également un fort pouvoir antifongique [(**Giordani et Kaloustian, 2006**) ; (**De Billerbeck, 2007**) ; (**Juhas, 2009**)].

Procédés d'extraction :

Les extraits de plantes sont obtenus après des différents traitements et transformations telles que l'infusion, la décoction et la macération dans une solution aqueuse ou alcoolique pour en tirer les substances biologiquement actives ayant une action spécifique (**Chiej, 1982**). La nature du solvant est choisie en fonction des propriétés physicochimiques de la plante et des composés à extraire. Par opposition aux tisanes, les extraits de plantes offrent une reproductibilité bien plus importante, et permettent d'obtenir une concentration en principes actifs adaptée et standardisée (**Fougère et Wynn, 2007**).

La plante étudiée : *Mentha pulegium*

Historique :

La menthe est l'une des plantes médicinales les plus populaires que l'on connaît depuis l'antiquité. Les feuilles de menthe séchées vieilles d'environ 3000 ans sont retrouvées dans les pyramides égyptiennes (Benayad, 2013). *Mentha pulegium*, qui est l'une des espèces de menthe fréquemment connue sous le nom de menthe pouliot (Pennyroyal) (Abdelli et al., 2016). Cependant que les Grecs, les Hébreux et les Romains étaient couramment utilisés comme herbe de cuisine dans un grand nombre de recettes, ainsi pour aromatisaient leurs vins. Au Moyen Âge, on découvre vraiment ses vertus thérapeutiques soit en calmants, antiseptiques ou encore en anesthésiques, puisqu'elle est prescrite aux personnes souffrantes pour anesthésier la douleur (Hadi et al., 2017).

Classification botanique :

D'après Quézel et Santa (1963) et Bachman (2016), *Mentha pulegium* est classée selon la clé de la détermination botanique suivante (Benabdallah, 2017) :

- ✓ Domaine *Eukaryota* ;
- ✓ Sous-domaine *Bikonta* ;
- ✓ Règne *Plantae* ;
- ✓ Division *Magnoliophyta* ;
- ✓ Embranchement *Phanérogames* ou *Spermaphytes* ;
- ✓ Sous embranchement *Angiospermes* ;
- ✓ Classe *Dicotylidones* ;
- ✓ Ordre *Lamiales* ;
- ✓ Famille *Lamiaceae* ;
- ✓ Genre *Mentha* ;
- ✓ Espèce *Mentha pulegium*.

Le genre *Mentha* appartient à la sous-famille Nepetoideae de la tribu Menthae de la famille des Lamiaceae. Il comprend des herbes aromatiques de classification taxonomique difficile, en raison d'une grande variabilité dans les caractères morphologiques et des hybridations fréquentes qui se produisent, à la fois dans les populations sauvages et dans les cultures. *M. pulegium* L., connu en Algérie sous le nom de «feliou», est utilisé pour le traitement dyspepsie

flatulente et coliques intestinales en raison de ses propriétés carminatives et antispasmodiques (Brahmi et al., 2015).

Généralités sur la famille et le genre :

La famille :

Les *Lamiaceae* (*Labiatae*) font partie des grandes familles de plantes utilisées pour évaluer la présence de certains métabolites secondaires typiques (Hajlaoui et al., 2009). *Lamiaceae*, appartenant à l'ordre des *Lamiales*, avec huit sous-familles (*Ajugoideae*, *Chloranthoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Pogostemonoideae*, *Scutellarioideae*, *Teucroideae* et *Viticoideae*) (Tucker et Naczi, 2007), comprend environ 220 genres et 3300 espèces (Benabdallah, 2017), des angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières, qui regroupent surtout les plantes herbacées et sous-arbustives (Benbouali, 2006). Elles forment une famille exceptionnellement homogène et sont facilement usables. Les espèces de cette famille sont riches en composés phénoliques (Benabdallah, 2017), des terpènes et toute une série d'autres composants, principalement dans les glandes épidermiques des feuilles, des tiges et des structures de reproduction (Hajlaoui et al., 2009).

Le genre :

Au sein de la famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha*, qui regroupe toutes les menthes, du nom latin *Mentha*, sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes. Le genre *Mentha* appartient à la famille des *Lamiaceae* et comprend 61 espèces (Benabdallah, 2017) divisées en cinq sections, *Audibertia*, *Eriodontes*, *Pulegium*, *Preslia* et *Mentha*. (Moja et Jullien, 2014). C'est un genre important composé d'herbes aromatiques distribuées principalement dans les régions tempérées et subtempérées du monde (Agnihotri et al., 2005). Ce genre est l'un des membres importants de la famille des *Lamiaceae*, représenté dans la flore algérienne par 5 espèces principales [*M. rotundifolia* (L.) Huds., *M. pulegium* L., *M. spicata* L., *M. aquatica* L. et *M. longifolia* (L.) L.] (Quezel et Santa, 1962).

Description botanique :

M. pulegium est une plante herbacée (Chraïbi et al., 2018) à fleurs (Hadi et al., 2017). Elle peut atteindre entre 10 et 50 cm de hauteur (Benayad, 2013) (Figure 01).

- ✓ **La tige** : tiges feuillées et fleuries presque à partir de la base, jusqu'au sommet de forme dressées, ramifiées, quadrangulaires et rougeâtres (Benayad, 2013).
- ✓ **Les feuilles** : sont généralement petites, opposées, courtement pétiolées, elliptiques ou presque ovales, légèrement dentelées et légèrement poilues (Zekri, 2017).
- ✓ **Les fleurs** : sont roses lilas, parfois blanches distribuées le long de la tige, qui apparaissent à l'été, à partir de Juillet à la fin de Septembre (Benayad, 2013).
- ✓ **Les fruits** : sont des tétrakènes (4 akènes) chaque akène renfermant une graine brune claire très petite et ovale (Zekri, 2017).



Figure 1: *M. pulegium* (www.google.com)

Habitat :

M. pulegium est une espèce spontanée (Zekri, 2017) pousse dans les zones humides des plaines et des montagnes jusqu'à 2200 mètres d'altitude [(Benayad, 2013) ; (Chraibi et al., 2018)] dans l'ensemble de l'Europe, l'Asie, l'Iran, les pays arabes, l'Éthiopie et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte) [(Zekri, 2017) ; (Uwineza et al., 2018)].

Origine et distribution :

C'est une espèce indigène de l'Europe, de l'Afrique du Nord (y compris l'Algérie), de l'Asie mineure, du Moyen-Orient et du Proche-Orient [(Boukhebt et al., 2011) ; (Brahmi et al., 2017)].

Composition chimique :

Les parties aériennes de *M. pulegium* étaient caractérisées par une grande diversité de composants bioactifs tels que les flavonoïdes. Elles constituent une source importante des huiles essentielles (HE) (80 à 88 %). La composition chimique de l'HE est caractérisée par la prédominance de la pulégone accompagnée d'autres cétones monoterpéniques telles que la menthone, l'isomenthone et la pipériténone, les tanins, les résines, les pectines, les polyphénols et limonène, etc. [(Benayad, 2013) ; (Abdelli et al., 2016)]. C'est un composé toxique varie au sein d'une zone géographique à l'autre et entre les zones climatiques (Mkaddem et al., 2007).

Les différentes phases végétatives de la plante, les conditions environnementales, ainsi les variations saisonnières et géographiques et la composition du sol influence sur la variabilité de leurs composants (Abdelli et al., 2016).

Tableau 3 : Composition chimique en huiles essentielles de *M. pulegium* de différentes origines (Sutour, 2010).

constituants	Maroc	Inde Hymalaya	Egypte	Uruguay	Autriche	Grèce
menthone	0,3	8, 3-8,7	-	3,6	8,0	-
isomenthone	-	3,8-4,0	-	12,9	-	-
cis-isopulégone	-	-	-	1,4	-	-
menthol	0,7	-	-	0,1	-	-
néomenthol	-	-	-	-	-	-
pulégone	80, 3	65,9-83,1	43,5	73,4	-	-
pipéritone	0,9	1,3-3,2	12,2	0,1	70,0	-
pipériténone	-	-	-	0,9	-	83,7-97,2

Propriétés biologiques :

Ces composants bioactifs manifeste des activités biologiques intéressantes antibactérienne (Hadi et al., 2017), antifongique (Uwineza et al., 2018), antioxydante, antileishmanienne (Abdelli et al., 2016), analgésiques, antispasmodiques, antihémorroïdaires, sédatives, hypotensives (Abdelli et al., 2016), antiviral (Chraibi et al., 2018), anti-inflammatoire, insecticide, antimicrobiennes [(Abdelli et al., 2016) ; (Chraibi et al., 2018)].

Ses huiles essentielles et ses parties sèches sont traditionnellement utilisées en médecine traditionnelle (troubles de la digestion, des intoxications alimentaires, du foie et de la vésicule

biliaire, goutte, sinusite, rhumes, affections cutanées, affections rénales, menstruel,...etc.), cuisine (herbe culinaire) où elle est employée comme épice et aromatisant dans différents aliments, en particulier les desserts, aromathérapie et cosmétique [(Boukhebt et al., 2011) ; (Teixeira et al., 2011) ; (Zekri, 2017)].

Toxicité :

L'emploi des parties aérienne de la menthe pouliot aux doses usuelles, ne présente, à notre connaissance, aucun risque ni aigue, ni chronique. L'utilisation de l'huile essentielle de la plante doit être évitée en raison de sa toxicité pour l'homme et les animaux et elle peut provoquer l'avortement à forte dose (Hadi et al., 2017).

Chapitre II :
Généralités sur les activités biologiques des plantes
médicinales

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons). Il possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave (**Rhayour, 2002**).

Outre, l'oxydation et les radicaux libres peuvent également causer des dommages cellulaires. En effet, plusieurs moyens de défense ont évolué pour protéger nos cellules contre ces radicaux. Ils sont omniprésents dans notre corps et sont générés par des processus physiologiques normaux y compris le métabolisme aérobie et de réponses inflammatoires (**Bayala, 2014**).

Les plantes médicinales (PM) ont beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules bioactives, elles ne cessent pas de montrer des activités biologiques intéressantes pour l'homme et son environnement (**Zekri, 2017**). L'utilisation des PM en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale, notamment pour éviter les effets secondaires de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique (**Ghazghazia et al., 2013**).

Les huiles essentielles (HE) et divers extraits de plantes ont suscité l'intérêt en tant que sources de produits naturels. Les activités antimicrobiennes des huiles et des extraits de plantes ont été à la base de nombreuses applications, notamment la conservation des aliments crus et transformés, les produits pharmaceutiques, les médecines douces et les thérapies naturelles. Suite aux questions sur la qualité et la sécurité des aliments, seuls certains additifs alimentaires sont autorisés. En raison des toxicités possibles des antioxydants synthétiques, l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), une attention croissante a été portée sur les antioxydants naturels (**Hajlaoui et al., 2009**).

Activités antioxydants :

Oxydation :

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. C'est un phénomène qui fait (rouiller les métaux, flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses) peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Il modifie le goût et la couleur des aliments (**Rolland, 2004**).

L'oxydation est générée par des ERO qu'on appelle aussi des radicaux libres toxiques pour l'intégrité de la cellule [(**Pincemail et al., 2002**) ; (**Rolland, 2004**)]. L'oxygène, molécule hautement dangereuse pour tout élément vivant, peut entraîner des dommages cellulaires

importants par formation de radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) [(Pincemail et al., 2002) ; (Haleng, 2007)]. La génération des ERO se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire. Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Labioud, 2016).

L'organisme subit également le phénomène, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes de régénération de complexes mettant en jeu par exemple l'acide ascorbique (vitamine C) ou le glutathion. Mais ce système de défense est parfois débordé. Surtout quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil, d'un effort physique intense, etc. Plusieurs cas peuvent engendrer des déséquilibres : soit dans des conditions de stress et alors l'oxydation augmente au point de ne pas pouvoir être régulée ; soit dans des conditions de mauvaise alimentation et alors les quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre. C'est là où il y a des dégâts. [(Rolland, 2004) ; (Leverve, 2009)].

Radical libre :

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) qui possède un ou plusieurs, électrons libres (célibataire) c'est-à-dire non apparié. Cette caractéristique le rend instable et lui procure une grande réactivité vis-à-vis des molécules environnantes. Un radical libre se stabilise au détriment de la molécule voisine qui devient à son tour un radical libre et ainsi de suite (réactions en chaîne). Comme le cas de l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, qu'est très instable avec une très forte tendance à «oxyder» (Leverve, 2009).

Tableau 4. Principales sources de production des radicaux libres (**Pastre, 2005**).

Sources endogènes :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries) ✓ Cellules phagocytaires ✓ Métabolisme de l'acide arachidonique ✓ Système xanthine/Xanthine oxydase
Sources exogènes :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Rayonnement électromagnétique ✓ Métaux de transition ✓ Pesticides ✓ Médicaments...

Antioxydant :

Un antioxydant peut être défini comme étant toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [(**Bayala, 2014**) ; (**Labiod, 2016**)]. En d'autres termes, un antioxydant est une substance qui, en faible concentration comparativement à la quantité des substances oxydables telles les espèces oxygénées réactives (ROS), retarde significativement ou prévient l'oxydation des substrats comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. La production excessive des espèces réactives de l'oxygène est responsable de dégâts cellulaires importants notamment l'induction de ruptures et de mutations de l'ADN, la modification de structures protéiques, la peroxydation des lipides, l'inactivation de diverses enzymes et l'oxydation des sucres (**Bayala, 2014**).

Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi être destructives, les plantes et les animaux créés des systèmes de défense (diminution ou arrêt de l'oxydation de substances chimiques) permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible le phénomène de l'oxydation (**Pincemail et al., 2002**). Ils utilisent et produisent de nombreux antioxydants (des molécules qui empêchent l'oxydation provoquée par les radicaux libres) pour se protéger, tels que le glutathion (GSH), la vitamine C et la vitamine E (**Leverve, 2009**), ou des enzymes telles que la catalase (CAT), la superoxyde Dismutase (SOD) et certaines peroxydases. Une déficience ou une absence de production d'enzymes antioxydantes entraîne un stress oxydatif pouvant endommager ou détruire les cellules (**Haleng, 2007**).

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique (Zekri, 2017). Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules (Tableau 05). Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation ou la médication, et sont donc exogènes (Bouguerne, 2012).

Tableau 5 : Principaux modes d'action de quelques antioxydants [(Pastre, 2005) ; (Haleng, 2007)].

	La nature d'antioxydant	Mode d'action
Défenses enzymatiques	SOD	élimination de l'anion superoxyde.
	CAT	Métabolise H ₂ O ₂
	GPx	Élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidique reflet d'une adaptation au stress oxydant.
Défenses non enzymatiques	Vitamine C	piégeur de radicaux libres marqueurs, valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies.
	vitamines B6, B9 et B12	régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine implication dans la synthèse de l'ubiquinone.
	α – tocophérol	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration).
	γ – tocophérol	valeur plasmatique basse plus prédictive que l'α - tocophérol dans la survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate.
	vitamine A	piégeur des radicaux libres et implication dans la vision.
	β – carotène	piégeur de l'oxygène singulet (--> photoprotecteur) inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense.

Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories (**Pastre, 2005**) :

- ✓ Système de défense primaire : ex : CAT, GSH. Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- ✓ Système de défense secondaire : ex : les tocophérols. Ces molécules sont dites « chainbreaking ». Elles réagissent avec les ROO° et/ou les R°, bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives (O₂⁻) à très réactives (OH°).

Antioxydants primaires (Systèmes de défense enzymatiques) :

Pour contrôler la production permanente des ROS, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages des ROS (des enzymes antioxydants essentielles, endogènes, naturelles). Ces enzymes constituent notre plus puissante défense qui permet de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser [(Haleng, 2007) ; (Bouguerne, 2012)].

La superoxyde dismutase (SOD) : Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn- dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée [(Haleng, 2007) ; (Bouguerne, 2012)].

La catalase : La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie [(Haleng, 2007) ; (Bouguerne, 2012)].

La glutathion peroxydase (GPX) : Les enzymes de cette famille sont Selenium (Se)-dépendante. La GPX est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène [(Haleng, 2007) ; (Bouguerne, 2012)].

Les antioxydants secondaires (Systèmes de défense non enzymatiques) :

Les antioxydants secondaires (exogènes), parmi lesquels les Vitamines C et E, les minéraux (Sélénium, Zinc, Cuivre, Manganèse), les caroténoïdes et les flavonoïdes, sont apportés uniquement par l'alimentation. Qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres [(Pincemail et al., 2002) ; (Leverve, 2009)]. Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories :

Antioxydants endogènes :

Ce sont des molécules issues de la biosynthèse (Glutathion, Acide Urique, Les protéines de stockage des métaux de transition) (Bouguerne, 2012).

Antioxydants exogènes :

Ce sont des vitamines, oligoéléments, ou antioxydants de synthèse (La vitamine E ou α -tocophérol et La vitamine C ou acide ascorbique) (Bouguerne, 2012).

Les acides phénoliques (benzoïque ou cinnamique), les flavonoides, et les tanins (Bouguerne, 2012). Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng, 2007).

Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels. Le but de ces synthèses est l'amélioration de l'activité antioxydante, la biodisponibilité et le coût des molécules (Bouguerne, 2012).

Pouvoir antioxydant de *Mentha pulegium* :

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques (Haleng, 2007). La distribution des composés phénoliques dans leur extrait a montré une variation parmi les plantes étudiées du genre *Mentha*. *Mentha pulegium* peut être considéré comme une source de gallocatéchine. Le solvant le mieux

adapté à l'extraction d'antioxydants a été étudié et une corrélation existait entre le stade de croissance de la plante et sa capacité antioxydante. L'extrait d'eau était plus puissant que l'extrait de méthanol. L'huile essentielle n'a pas montré d'effet antioxydant important. Il semble que l'extrait aqueux de *M. pulegium* soit un puissant antioxydant qui en fait un antioxydant potentiel pour les huiles et les produits contenant de l'huile pendant le stockage [(**Ghazghazia et al., 2013**) ; (**Hadi et al., 2017**)].

Activités antimicrobiennes :

Un microbe, ou micro-organisme (MO), fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes. Ces organismes sont regroupés sur la base d'une seule propriété : ils sont si petits qu'ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope. Les microorganismes sont indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments ainsi que des composants pharmaceutiques et industriels. D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires. Enfin les microorganismes sont largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires (**Labioud, 2016**).

Les MO et/ou de leurs produits peuvent causer des pathologies chez l'hôte, parmi les maladies d'origine microbienne, certaines sont dues à des champignons, virus, d'autres à des protozoaires, ou des bactéries (**Hadi et al., 2017**).

Un antimicrobien est une substance chimique, naturelle ou synthétique qui tue les micro-organismes ou inhibe leur croissance. Son activité dépend de paramètres tels que la concentration dans le substrat et sa typologie, la température, le pH, le type de microbe à combattre, ainsi que la présence d'humidité et d'oxygène (**Hajlaoui et al., 2009**).

Les huiles essentielles (HE) et les extraits des différentes espèces des PM se caractérisent par une forte activité antimicrobienne (**Benayad, 2013**).

Infection microbienne (bactérienne ou fongique)

Une infection bactérienne est un ensemble de troubles qui résultent de la pénétration d'une bactérie pathogène dans un organisme. Elle peut être :

- ✓ locale, lorsqu'elle se manifeste uniquement au niveau où les germes ont pénétré ;

- ✓ générale, lorsqu'un germe franchit les barrières opposées par l'organisme à son entrée (peau, muqueuses) ou au niveau des ganglions, il pénètre dans le sang et se dissémine par celui-ci dans tout l'organisme (**Kahlouche, 2014**).

Les affections fongiques représentent actuellement un véritable problème de santé publique et constituent l'une des principales causes de décès surtout chez les immunodéprimés à travers le monde (**Yanisse, 2013**).

Dans la pathologie fongique ou mycosique, trois types de mycoses humaines sont fréquentes et universelles : les dermatophytoses, le Pityriasis versicolor et les candidoses cutanéomuqueuses. D'autres sont plus rares mais profondes et sévères. Les infections à levures ont vu leur incidence augmenter et leur localisation se diversifier. Parmi le genre *Candida*, le *Candida albicans* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée (**Ouraini et al., 2007**).

Antimicrobiens :

Antibactérien

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multirésistantes (**Kahlouche, 2014**), ils ont montré aussi des inconvénients et des limites d'utilisation : les effets secondaires, toxicité des molécules antimicrobiennes pour l'organisme traité (**Zekri, 2017**). Les recherches orientées vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (**Labioud, 2016**) pour remplacer les produits chimiques de synthèse nocifs par des produits naturels (**Abdelli et al., 2016**). L'activité antibactérienne des PM a été la plus étudiée. Leurs HE et extraits peuvent exercer deux sortes d'effets sur les MO : un effet bactéricide exerçant une activité létale et un effet bactériostatique entraînant une inhibition de la croissance (**Zekri, 2017**).

Effet bactériostatique : C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît (**Hmiri et al., 2011**). En limitant la croissance bactérienne, la molécule permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées. L'effet bactériostatique d'une molécule est évalué par la concentration minimale inhibitrice (**Labioud, 2016**). Selon leur application, il est possible de distinguer les

antibiotiques bactériostatiques, les désinfectants, les antiseptiques et les conservateurs (Zekri, 2017).

Effet bactéricide : C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries (Labioud, 2016). Les propriétés bactéricides varient d'une substance à l'autre, en termes de spectres d'action, d'efficacité, de durée d'action... Un bactéricide est un type d'antimicrobien. Il a été démontré que certains constituants chimiques des HE ont des propriétés bactéricides (Zekri, 2017).

Antifongique :

Les antifongiques sont des substances capables de traiter les mycoses et les infections provoquées par des champignons microscopiques. Soit en s'attaquant directement à la paroi fongique qui provoque la mort de la cellule (action fongicide) ; ou en bloquant la division cellulaire, arrêtant ainsi la reproduction des champignons (action fongistatique) (Harrison et al., 2006).

Les médicaments antifongiques sont principalement utilisés pour traiter les pathologies dues aux infections fongiques. Il existe 4 classes principales d'agents antifongiques qui agissent soit au niveau de la paroi fongique, soit sur la membrane fongique ou soit au niveau de l'acide nucléique (polyènes, azolés, échinocandines, griséofulvine) (Aoun, 2013).

Bien qu'on dispose aujourd'hui de médicaments antifongiques, le traitement des mycoses reste difficile d'une part du fait du nombre limité de principes réellement efficaces et de leur coût très élevé et d'autre part lié à l'émergence de souches résistantes à certains antimycosiques usuels. La découverte de nouvelles molécules permettrait à défaut d'éliminer les facteurs pathogéniques, d'améliorer l'état de santé des malades. Le règne végétal, base de notre médecine traditionnelle est susceptible de fournir un grand nombre de molécules douées de propriétés antifongiques (Yanisse, 2013).

Pouvoir antimicrobien de *Mentha pulegium* :

Les huiles essentielles, les extraits méthanoïques et aqueux peuvent être utilisés potentiellement comme des agents naturels antimicrobiens contre des maladies infectieuses chez l'homme et pour la conservation des produits alimentaires (Obame Engonga, 2009).

Les avantages et les composés phytochimiques de *Mentha pulegium* ont montré similairement que *Mentha pulegium* constituaient un important réservoir de composés phytochimiques à

capacité antibactérienne (**Hadi et al., 2017**). Elle est dominée par la pulégone qui est une cétone. Des travaux antérieurs ont montré que les cétones sont plus actives contre les agents microbiens (**Hmiri et al., 2011**). Ils pourraient donc être utilisés à titre préventif ou en association avec un traitement pharmaceutique et antibiotique contre des bactéries pathogènes, en outre, les huiles essentielles extraites des parties aériennes florifères de *Mentha pulegium* ont montré une activité antimicrobienne très puissante contre des différents micro-organismes (**Hadi et al., 2017**).

Les HE et les extraits de nombreuses plantes sont devenues populaires ces dernières années et leurs principes bioactifs ont conquis récemment plusieurs secteurs industriels et pharmaceutiques (**Ismail et al., 1990**).

Les HE de la partie aérienne de *Mentha pulegium* de la Tunisie montrent une activité antifongique très puissante contre les champignons infectieux et phytopagènes (**Hajlaoui et al., 2009**). Dans une différente étude faite au centre des recherches d'Iran révèle que les HE de *Mentha pulegium* ont la capacité d'inhiber la germination des spores (**Mahboubi et Haghi, 2008**).

Chapitre III :
Mécanisme d'action
Des antioxydants et des antimicrobiens

L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale ; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. À côté des substances antimicrobiennes (des antibiotiques connus), Il existe aussi de nombreux antioxydants synthétiques [(Rhayour, 2002) ; (Bouguerne, 2012) ; (Ghazghazia et al., 2013)].

Les PAM ont beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules bioactives, elles ne cessent de prouver des activités biologiques intéressantes pour l'homme et pour son environnement [(Brahmi et al., 2015) ; (Zekri, 2017)].

Bon nombre de travaux ont été consacré ces dernières années aux propriétés médicales des plantes aromatiques et en particulier aux propriétés antimicrobiennes de leurs extraits odorants dont le composé majoritaire est de nature phénolique, ont un large spectre d'inhibition, comprenant des bactéries à Gram positif, et à Gram négatif, des champignons et même des virus, qu'ils sont connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire. Mais les travaux qui s'intéressent au mécanisme d'action de cette activité sont en nombre extrêmement faible (Rhayour, 2002).

Mécanismes d'action des antioxydants :

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux capacités antioxydantes de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture (Pastre, 2005). Les défenses exogènes semblent les plus faciles à conforter puisqu'elles pourraient être renforcées par l'alimentation et la médecine à travers lesquelles des petites molécules sont consommées se forme de compléments alimentaires. Ce sont les vitamines, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones, les alcaloïdes. Les parties les plus actives de ces molécules sont les hydroxyles libres, les noyaux aromatiques, les doubles liaisons éthyléniques souvent conjuguées, qui permettent de donner des électrons et de rester stables par mémorisation [(Pastre, 2005) ; (Bayala, 2014)]. Cela pourrait être très intéressant de les utiliser, par exemple, chez l'individu vieillissant. En effet, avec l'âge, les individus sont plus sensibles au stress oxydant. Leur capacité d'absorption intestinale de molécules antioxydantes d'origine

alimentaire est moins efficace. Les mécanismes de défenses endogènes de l'organisme s'essouffant avec l'âge, les espèces radicalaires se multiplient (**Pastre, 2005**).

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques [(**Rhayour, 2002**) ; (**Aoun, 2013**)].

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes (**Zekri, 2017**).

- ✓ ils sont capables de piéger des radicaux libres ;
- ✓ d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy ;
- ✓ Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**Pastre, 2005**).

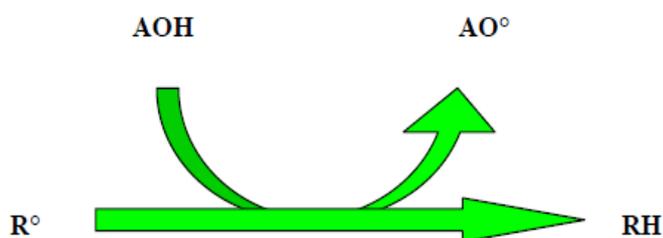


Figure 2 : Activité principale des polyphénols : le piégeage de radicaux libres (**Pastre, 2005**).

Le polyphénol (AOH) cède un atome H aux radicaux libres. Sa forme oxydée (AO°) est stabilisée ensuite par résonance ou dimérisation (**Pastre, 2005**).

Mécanismes d'action des antimicrobiens :

Le mode d'action des extraits et des huiles essentielles sur les cellules microbienne n'est pas clairement élucidé. Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des extraits et des HE, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez

complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action [(Labioud, 2016) ; (Zekri, 2017)].

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne. Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/mL et 1 000 µg/mL. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0,01 µg/mL à 10 µg/mL, suffisent à générer une activité inhibitrice. Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. Les plantes ont développé plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Elle semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules (Guinoiseau, 2010).

Les mécanismes d'action les plus étudiés sont ceux des huiles essentielles qui seront détaillés dans le suivant.

Mode d'action antibactérien des huiles essentielles

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires. Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire (Guinoiseau, 2010).

Tableau 6 : Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes des huiles essentielles

Molécules	La plante	Souches sensibles	Mécanismes d'action	Références
Carvacrol	<i>Satureja hortensis</i> L.	<i>Bacillus cereus</i>	Déstabilisation de la membrane cellulaire Effondrement des forces proton-motrice Abaissement du pool d'ATP, Inhibition des toxines	[(Guinoiseau, 2010) ; (Bouyahya et al, 2017) ; (Christine, 2002) ; (Aboya Moroh, 2013)]
Thymol	Origan	<i>Salmonella</i>	Effet sur les protéines impliquées dans la division cellulaire, une altération de la membrane plasmique, une perte du matériel intracellulaire, une altération de la paroi bactérienne, une agrégation du cytoplasme.	[(Guinoiseau, 2010) ; (Bouyahya et al, 2017) ; (Rhayour, 2002)]
Eugénol	Clou de Girofle	<i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	Altérations de la paroi, ces altérations se présentent sous forme de déformations cellulaires diverses avec présence de cellules renflées et turgescents, entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases	[(Guinoiseau, 2010) ; (Christine, 2002); (Rhayour, 2002)]
Cinnamaldéhyde	Cannelle (<i>Cinnamomum cassia</i>).	<i>Vibrio harveyi</i> BB886 <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i>	Réduction de la bioluminescence, inhibition de l'ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire, fixation aux protéines intracytoplasmiques par une inactivation des aminoacides décarboxylases, ou interférence avec les mécanismes de régulation	[(Guinoiseau, 2010) ; (Bouyahya et al, 2017)]
Terpinène-4-ol	<i>Melaleuca alternifolia</i> (arbre à thé)	<i>Escherichia coli</i>	Perméabilise des liposomes modèles, perméabiliser les membranes plasmiques une perte d'ions potassium, une perte de matériel cytoplasmique et la formation de structures ressemblant à des mésosomes Coagulation du matériel cytoplasmique	[(Guinoiseau, 2010) ; (Bouyahya et al, 2017)]
Carvacrol et eugénol		<i>Escherichia coli</i> et <i>Listeria monocytogenes</i>	Inhibition de la mobilité Rupture de la membrane	(Bouyahya et al, 2017)
Carvacrol et thymol		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	Augmentation de la perméabilité cellulaire aux colorants nucléaires, dissipation du gradient	(Bouyahya et al, 2017)
Eugénol, thymol et carvacrol		<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Altérations dans les compositions des acides gras et la morphologie cellulaire	(Bouyahya et al, 2017)

Mode d'action antifongique des huiles essentielles

La stratégie de lutte contre les champignons et l'occurrence des mycotoxines en utilisant des fongicides semble être la méthode la plus séduisante du point de vue efficacité et vitesse d'action. L'application de certains fongicides peut induire une augmentation des taux des mycotoxines même s'ils sont capables de réduire la croissance fongique. L'usage des fongicides qui dépasse les normes recommandées provoque des dégâts environnementaux et sanitaires vis-à-vis de la sécurité alimentaire et la santé des organismes consommateurs (El Khoury, 2017).

Blair (1989) a déclaré qu'une substance chimique modérément inoffensive à de faibles doses, pourra devenir toxique à de plus fortes doses. Ainsi, la toxicité aiguë des fongicides envers les êtres humains est faible, causant des dermatites allergiques et des irritations de la peau et des muqueuses. Quant à la toxicité chronique de ces produits, leurs conséquences sur la santé pourront être graves (effets carcinogènes et mutagènes) suite à une exposition prolongée. Les plantes produisent naturellement divers métabolites secondaires tels que les composés. Ces composés ont montré au cours des années leur utilité contre les contaminations fongiques et/ou mycotoxiques. Les HE sont amplement utilisées dans les applications bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires et insecticides. Leur propriété antifongique s'est largement développée au cours des années. En effet, des études approfondies sont réalisées sur leur pouvoir inhibiteur de la croissance fongique et de mycotoxine produite par des champignons. Effectivement, les composants actifs des HE responsables de leur activité antifongique sont de natures chimiques différentes, tels que les composés phénoliques (eugénol, anethole, carvacrol), les terpènes (carvone), les aldéhydes (cinnamaldéhyde) et les éthers (thymol) (El Khoury, 2017).

Malgré leurs caractères fongicides et inhibiteurs des mycotoxines, le mode d'action des HE est pauvrement décrit. Pourtant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été élucidées. Grâce à leur richesse en molécules bioactives, les HE sont capables d'agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires.

- ✓ Leurs actions peuvent être situées au niveau de la membrane plasmique des champignons, au niveau des enzymes intracellulaires impliquées dans la respiration cellulaire et la synthèse des protéines structurales, ou bien au niveau de la répression de l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de mycotoxine
- ✓ Grâce à leur nature lipophile, les HE peuvent traverser les membranes plasmiques et celles des organites cellulaires, surtout la mitochondrie. Cette incorporation cause un

déséquilibre dans la composition lipidique membranaire et une diminution des taux d'ergostérol (lipide membranaire essentiel au développement fongique et l'intégrité de la membrane cellulaire fongique).

- ✓ Les HE peuvent aussi agir sur les polysaccharides membranaires, tels que le galactose et le galactosamine. Ces déséquilibres membranaires induisent des fuites des organites et des ions nécessaires à la survie des champignons.
- ✓ L'action antifongique des HE peut se produire au niveau des enzymes responsables de la production des mycotoxines tels que le catabolisme du glucose et la peroxydation lipidique [(Hmiri et *al.*, 2011) ; (El Khoury, 2017)].

Chapitre IV :
Généralités sur les souches testées

Bactéries à Gram positif :

Staphylococcus aureus :

Classification (Lays, 2012) :

Tableau 7: Taxonomie de *Staphylococcus aureus*

Règne :	Bacteria
Division :	Firmicutes
Classe :	Baccilli
Ordre :	Bacillales
Famille :	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre :	<i>Staphylococcus</i>
Espèce :	<i>aureus</i>

Caractéristiques [(Lays, 2012) ; (Kahlouche, 2014) ; (Zekri, 2017)] :

- ✓ Coque à Gram positive, de forme sphérique, avec un diamètre de 0,5 à 1 µm. Ils sont regroupés en diplocoques ou en petits amas réguliers ou irréguliers (grappe de raisin)
- ✓ Immobiles, asporulés, habituellement sans capsule.
- ✓ Aéro-anaérobie facultatif, catalase positive et oxydase négative. De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré.
- ✓ Opportuniste, commensale de la peau et des muqueuses (fosses nasales, périnée, tractus gastro-intestinal et pharynx) de l'homme et de nombreuses espèces animales.

Pouvoir pathogène :

Staphylococcus aureus est responsable de nombreuses infections nosocomiales et communautaires. Son pouvoir pathogène résulte de la sécrétion d'enzymes (catalase, coagulase, désoxyribonucléases, etc.) et de toxines (hémolysines, leucocidines, entérotoxines, etc.) qui lui confèrent respectivement son pouvoir invasif et toxinogène [(Lays, 2012) ; (Kahlouche, 2014) ; (Zekri, 2017)].

Listeria monocytogenes* :*Classification [(Commeau, 2012) ; (Dumas, 2007)] :****Tableau 8 :** Taxonomie de *Listeria monocytogenes*

Règne :	Bacteria
Division :	Firmicutes
Classe :	Baccilli
Ordre :	Bacillales
Famille :	Listeriaceae
Genre :	<i>Listeria</i>
Espèce :	<i>monocytogenes</i>

Caractéristiques [(Commeau, 2012) ; (Pasquier et Chuard, 2017)] :

- ✓ Bacille de 0,4 à 0,5 µm sur 0,5 à 2,5 µm, Gram positif, non capsulé, isolé ou en chaînettes, mobile à 20-25 °C, non sporulé.
- ✓ Cette bactérie se multiplie à température ambiante et corporelle et survit à la réfrigération. Elle croît si le pH est compris entre 4,39 et 9,4, une activité de l'eau supérieure à 0,92 et une température comprise entre -2°C et 45°C, la température optimale de croissance se situant entre 30°C et 37°C.
- ✓ Catalase positive, oxydase négative, fermente de nombreux glucides sans production de gaz.
- ✓ Ubiquiste, tellurique, largement présent dans l'environnement (lacs, rivières, sol, végétation...). Il peut se retrouver dans presque tous les aliments.

Pouvoir pathogène :

Les infections à *Listeria monocytogenes* sont d'origine alimentaire, transmises non seulement par les produits animaux mais aussi par des fruits et légumes secondairement contaminés (Pasquier et Chuard, 2017), peut provoquer une maladie appelée listériose. On peut classer cette maladie en deux classes : non-invasive et invasive (Commeau, 2012).

Bacillus cereus* :*Classification (Laouami, 2012) :****Tableau 9 :** Taxonomie de *Bacillus cereus*

Règne :	Bacteria
Division :	Firmicutes
Classe :	Baccilli
Ordre :	Bacillales
Famille :	Bacillaceae
Genre :	<i>Bacillus</i>
Espèce :	<i>cereus</i>

Caractéristiques (Laouami, 2012) :

- ✓ Bacilles de grande taille (>1.0 µm) à Gram positif, sporulée, aéro-anaérobie facultative, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche.
- ✓ Thermorésistante les températures de croissance de cette bactérie peuvent varier en fonction des souches et s'étend de 5 à 50 °C.
- ✓ La capacité à produire des spores leur permet de résister à des environnements extrêmes tels que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac.
- ✓ Ils sont très répandus dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments.

Pouvoir pathogène :

Les infections à *B. cereus* peuvent être classées en deux catégories. D'une part les toxi-infections alimentaires et d'autre part les infections locales, systémiques ou respiratoires. Elle peut produire deux types de toxines, une toxine émétique préformée dans les aliments et résistante à une large gamme de températures et de pH, et des toxines diarrhéiques produites pendant la croissance dans l'intestin grêle après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante. Le syndrome émétique est caractérisé par des nausées, des vomissements et des crampes abdominales (Laouami, 2012).

Bactéries à Gram négatif :

Escherichia coli :

Classification [(Miszczycha, 2013) ; (Balière, 2016)] :

Le genre *Escherichia* appartient, ainsi que *Salmonella* ou encore *Shigella*, à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante (Kahlouche, 2014).

Tableau 10 : Taxonomie d'*Escherichia coli*

Règne :	Bacteria
Division :	Firmicutes
Classe :	Proteobactéries
Ordre :	Enterobacterales
Famille :	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre :	<i>Escherichia</i>
Espèce :	<i>coli</i>

Caractéristiques [(Miszczycha, 2013) ; (Balière, 2016) ; (Zekri, 2017)]:

- ✓ Bacille à gram négatif, non sporulée, immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche, varie de 2 à 6 µm et de 1,1 à 1,5 µm.
- ✓ Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires. *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole.
- ✓ Les *Escherichia coli* sont des aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates, catalase positives, oxydase négatif et non halophile.
- ✓ On trouve *E. coli* de façon commensale dans la flore intestinale et fécale, tant chez les humains que chez certains animaux. La flore intestinale est colonisée peu après la naissance. La bactérie et l'hôte coexistent sans impact sur leur santé respective. Cette coexistence entraîne des bénéfices mutuels.

Pouvoir pathogène :

E. coli peut non seulement être une bactérie commensale, mais aussi un pathogène. La pathogénèse de ces bactéries se fait par étapes. Tout d'abord elles colonisent une muqueuse. Puis elles se multiplient et causent des dommages à l'hôte tout en essayant d'évader ses défenses. On peut séparer les *E. coli* pathogènes en deux catégories, les *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC) et les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) [(Kahlouche, 2014) ; (Zekri, 2017)].

Pseudomonas aeruginosa* :*Classification (Elmeskini, 2011) :****Tableau 11** : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*

Règne :	Bacteria
Division :	Proteobacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille :	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>aeruginosa</i>

Caractéristiques [(Elmeskini, 2011) ; (Kahlouche, 2014) ; (Zekri, 2017)] :

- ✓ Bacilles à Gram négatif, de 1 à 5 µm et de 0,5 à 1 µm, aérobies strictes, mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche, ne forme ni spores ni sphéroplastes, métabolisme oxydatif, non fermentaire, catalase positive et oxydase positive. Mésophile capable de se multiplier de 4 à 45°C. La température optimale de croissance entre 30 et 37°C.
- ✓ Ubiquitaire, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques.

Pouvoir pathogène :

Pseudomonas aeruginosa, l'espèce type, Fréquemment isolé sur la peau et les muqueuses de l'homme ou de l'animal, il est aussi particulièrement résistant aux antibiotiques et même aux antiseptiques. En milieu hospitalier il est à l'origine de surinfections et de suppurations locales

ou profondes, isolé essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience locale ou générale (brûlés, cancéreux, etc.), et très fréquemment impliqué dans les infections nosocomiales (infections pulmonaires, cutanées...). De même qu'il est phytopathogène avec beaucoup d'autres espèces du même genre [(Ben Haj Khalifa, 2010) ; (Kahlouche, 2014)].

Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3ème rang après E. coli et S. aureus, mais le premier rang pour les infections pulmonaires basses et le 3ème rang pour les infections urinaires (Zekri, 2017).

***Salmonella Typhimurium* :**

Le genre *Salmonella* fait partie de la famille des Enterobacteriaceae et se divise en deux espèces *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* est l'espèce la plus représentée. Elle est elle-même divisée en 6 sous espèces (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae*, *indica*) et en de nombreux sérovars (plus de 2000) tels que Enteritidis, Typhi, Typhimurium... Etc (Boukoucha, 2014).

Classification :

Tableau 12 : Taxonomie de *Salmonella Typhimurium*

Règne :	Bacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Enterobacteriales
Famille :	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre :	<i>Salmonella</i>
Espèce :	<i>Salmonella enterica</i>
Sous-espèce :	<i>Enterica</i>
Serovar :	<i>Typhimurium</i>

Caractéristiques (Boukoucha, 2014) :

- ✓ bacilles à Gram négatif de 2 à 5 µm et de 0,7 à 1.5 µm. non sporulés, mobiles à ciliature péritriche, nitrate réductase, oxydase négatif. Elles sont capables de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz et sont aéro-anaérobies facultatives.
- ✓ Mésophile, son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La limite de croissance inférieure se situe aux environs de 5°C.

- ✓ supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9 avec un optimum entre 6,5 et 7,5.

Pouvoir pathogène :

Le premier bacille de Salmonella agent de la fièvre typhoïde fut observé en 1880 par Eberth dans des coupes de rate et de ganglions lymphatiques. Ils sont responsables de gastro-entérites, de toxi-infections alimentaires et de fièvres typhoïdes. Elles pénètrent dans l'organisme par voie orale après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La plupart des animaux constituent un réservoir à salmonelles (**Boukoucha, 2014**).

Levures :

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires se multipliant par bourgeonnement ou scissiparité. Les champignons lévuriques ont une forme arrondie ou ovale. Certaines levures peuvent donner des filaments issus d'une levure mère. La levure est la forme végétative et, dans la plupart des cas, la forme de résistance et de dissémination de l'espèce (**Chambard, 2009**).

Genre Candida :

Le genre *Candida* regroupe des levures dont la majorité des caractères est retrouvée chez les Ascomycètes (**Chambard, 2009**).

Classification (Yanisse, 2013) :

Tableau 13 : Taxonomie de *Candida albicans*.

Règne :	Fungi
Division :	Ascomycota
Classe :	Hemiascomycètes
Ordre :	Saccharomycétales
Famille :	Candidaceae
Genre :	<i>Candida</i>
Espèce :	<i>albicans</i>

Caractéristique [(Chambard, 2009) ; (Labioud, 2016)]:

- ✓ *Candida albicans* est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie, diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore), formant ainsi des colonies blanches crémeuses, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm.
- ✓ se nourrissant par absorption et dont la paroi contient des polysaccharides tels que la chitine, les glucanes et les mannanes.
- ✓ Les *Candida* sont des levures ubiquitaires dont certaines sont présentes dans l'environnement. Elles n'ont pas de répartition géographique particulière de part de leur commensalisme chez l'homme.

Pouvoir pathogène :

Les candidoses sont les mycoses les plus rencontrées dans le monde, elles sont incriminées dans 80 % des infections à levure. L'espèce la plus fréquente, *C. albicans*, représente plus de 60 % de toutes les levures isolées chez l'Homme. Il s'agit d'un saprophyte du tube digestif qui est à l'origine de la plupart des candidoses cutanées, muqueuses, phanériennes, septicémiques ou viscérales. Ces infections sont souvent mortelles pour les sujets dont l'immunodéficience est très accentuée (Yanisse, 2013).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel :

1.1. Zone d'étude :

La wilaya de Saïda est située à l'ouest algérien (**Figure 03**), elle s'étend sur une superficie de 6 613 km². Elle est délimitée comme suit (**Terras, 2010**) :

- ✓ Au nord par la wilaya de Mascara ;
- ✓ À l'ouest par la wilaya de Sidi-Bel Abbés ;
- ✓ Au sud par la wilaya d'El-Bayadh ;
- ✓ À l'est par la wilaya de Tiaret.

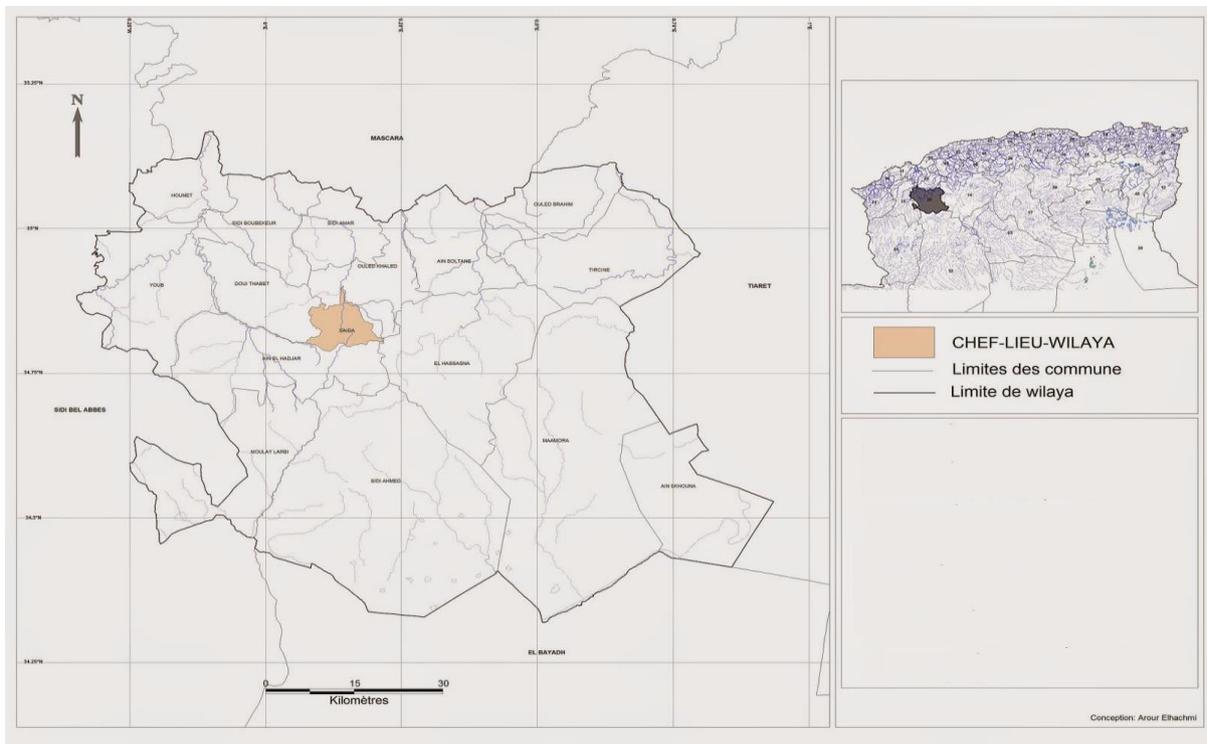


Figure 03 : Position géographique de la zone d'étude (**Elhachmi, 2018**).

1.2. Matériel végétale :

L'espèce étudiée est *Mentha pulegium* (Menthe Pouliot) (**figure 04**) qui est disponible dans la région de Saïda. Nous avons acheté la matière végétale sous forme séchée devant un herboriste (**Tableau14**).



Figure 04 : les parties aériennes de Menthe Pouliot (photos originale).

Tableau 14 : lieu de récolte de la plante et les caractéristiques bioclimatiques de la zone de récolte.

La plante	<i>Mentha pulegium</i> (Menthe pouliot, فليو)
La quantité du matériel végétal traité	1000 à 1500 g
Etat	Sec
Lieu de récolte	Commune d'Ain El Sultane
Période de récolte	La fin d'Août 2018
Nature de la plante	Spontanée
Lieu d'achat	Rebahia (Saïda)
Date d'achat	25 novembre 2018
Etage bioclimatique	Semi-aride

Le choix de notre plante est basé sur une recherche approfondie dans la littérature et une enquête ethnopharmacologique, au cours de laquelle plusieurs personnes ayant une vaste connaissance de la façon d'utiliser cette plante ont été interrogées (**Labioud, 2016**).

Le choix de la plante étudiée est basé sur les critères suivants :

- ✓ Valorisation de la flore algérienne ;
- ✓ Disponibilité de la plante ;
- ✓ Son utilisation dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies d'origine microbienne ;
- ✓ La présence de substances aromatiques (huiles essentielles) avec un rendement satisfaisant ;
- ✓ La recherche de nouvelles molécules bioactives.

1.3. Matériel biologique :

1.3.1. Microorganismes (souches testées) :

Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, six (06) souches bactériennes et sept (07) souches fongiques (trois (03) levure et quatre (04) moisissures) (**Tableau15**) ont été testées vis à vis les extraits de la menthe pouliot. Les souches sont de références ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont obtenues à partir du laboratoire de recherche Aboubakr-Belkaid à l'université de Tlemcen.

Globule rouge :

Le globule rouge humain (modèle universel de cellules animales), provenant d'un donneur unique sain de rhésus (O+) (**Figure05**).

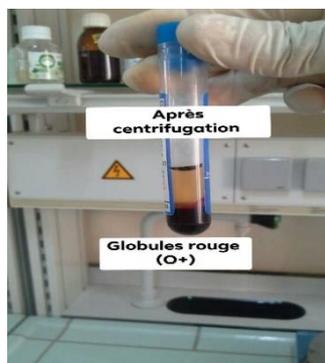


Figure 05 : les globules rouges utilisées dans cette étude (photo originale).

Tableau 15 : Différentes souches utilisées pour l'évaluation des activités antimicrobiennes

Nom de la souche	Référence	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	+
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 13311	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC 26790	/
<i>Candida albicans</i>	ATCC IP444	/
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	/
<i>Endosporium spp</i>	Isolées	
<i>Penicillium spp</i>		
<i>phytophthora spp</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		

2. Méthode :

2.1. Enquête ethnopharmacologique :

L'enquête ethnopharmacologique de la plante *Mentha pulegium* est basée sur la collecte d'information sur son utilisation traditionnelle en utilisant un questionnaire préétabli (**Annexe I**) soumis à 50 personnes, au cours d'un entretien individuel, d'une durée d'environ 10 minute chacun, qui s'est déroulé pendant deux mois. Durant chaque entretien, les informations sur les personnes questionnées (âge, niveau scolaire, situation familiale et profession) sur la plante médicinale étudiées (caractères et usages) sont collectées. Les données inscrites sur des fiches brutes ont été transférées dans une base de données et traitées par le logiciel de traitement statistique IBM SPSS version 21.

2.2. Préparation des extraits :

Les parties aériennes de la plante séchée ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre résultante est conservée dans un bocal en verre à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière. Il existe différentes méthodes d'extraction qui sont particulièrement adaptées à l'extraction des composés naturels. Les extraits (méthanolique, aqueux, huile essentielle) des parties aériennes de *Mentha Pulegium* sont obtenus par trois méthodes d'extraction différentes :

a. Extraction par macération :

Suivant le protocole d'extraction décrit par **Harborne (1998)** ; le matériel végétal broyé est soumis à une extraction par macération dans le méthanol pendant 24 heures sous agitation. Les macérats sont filtrés sur papier filtre, les filtrats sont concentrés à sec sous pression réduite et à une température 60°C au moyen d'un évaporateur rotatif (**figure 06**), puis conservées à 4°C.

b. Extraction par infusion :

Pour l'extrait aqueux, l'extraction est réalisée par infusion dans l'eau distillée bouillante. La poudre de la plante a été additionnée à l'eau distillée bouillante. On laisse 30 minutes pour infusion avec agitation magnétique. L'extrait aqueux obtenu est filtré sur papier filtre. Les filtrats sont concentrés à sec à une température 50°C au moyen d'une étuve (**figure 06**), puis conservées à 4°C (**Benayad, 2013**).

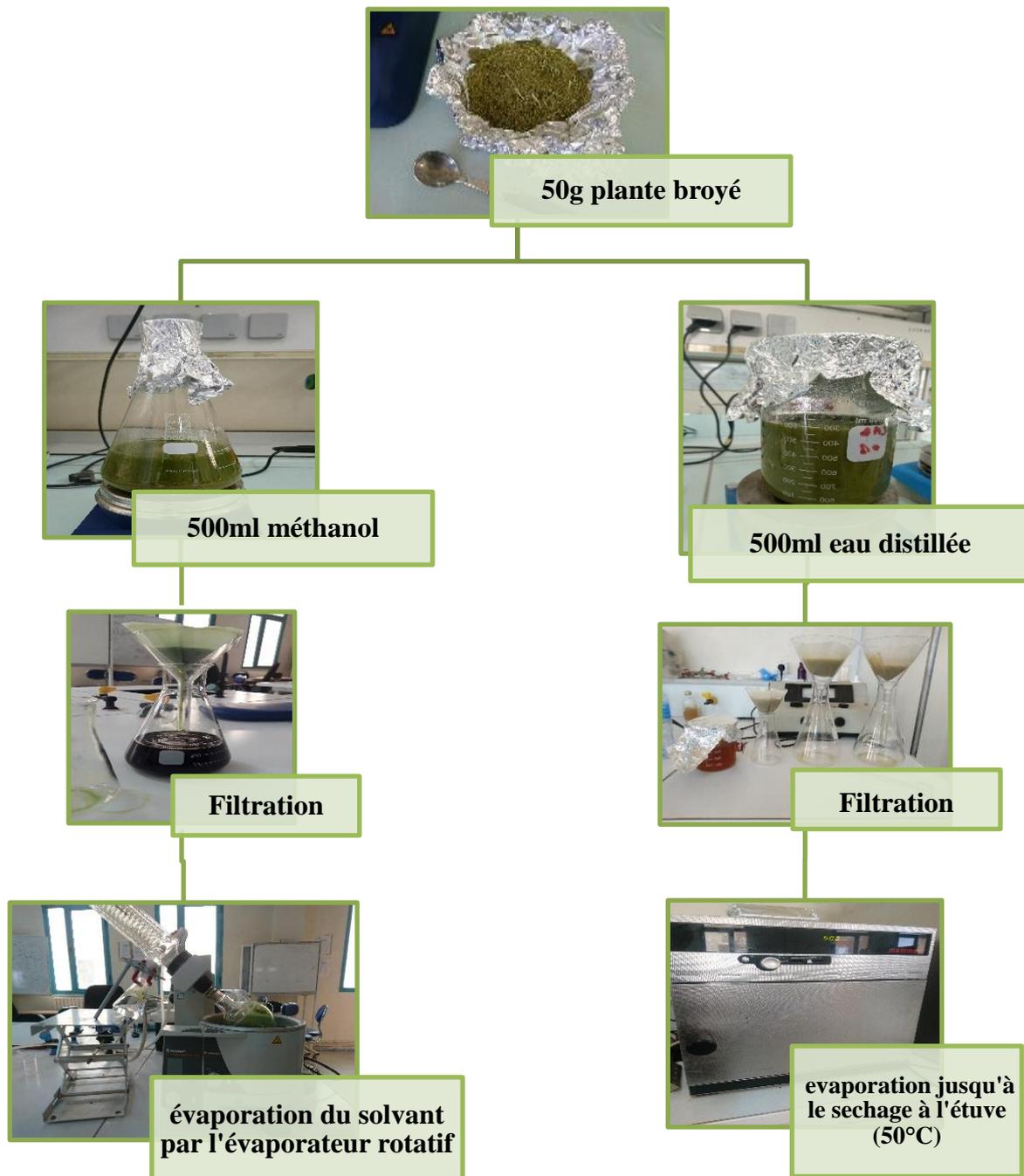


Figure 06 : schéma de protocole d'extraction (macération et infusion)

b. Hydrodistillation :

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur ascendant car l'injection de la vapeur se fait à la base de l'extracteur (alambic). Les vapeurs contenant les composés volatils sont condensées, puis les liquides (distillat + huile essentielle) sont décantés dans un vase florentin (**Rabehaja, 2013**).

La plante a été distillée par entraînement à la vapeur d'eau. Nous avons utilisé un montage avec un autocuiseur et un essencier pour réaliser l'entraînement à la vapeur (**Figure 07**). Une quantité de 380g de *Mentha pulegium* située au-dessus d'une grille et subit un passage de la vapeur d'eau bouillante à travers le matériel pendant une durée de deux (02) heures. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans un tube en verre à 4°C à l'abri de la lumière (emballé avec l'aluminium) (**Sutour, 2010**).



Figure 07 : Autocuiseur adapté pour extraire l'huile essentielle par entraînement à la vapeur

Calcul de rendement :

Pour les extraits : Le pourcentage en extrait (méthanolique ou aqueux) de la plante est calculé par la formule suivante (**Labioud, 2016**) : $Rdt\% = (P/P_0) \times 100$

- ✓ **Rdt%** : Rendement exprimé en %.
- ✓ **P** : Poids en gramme de l'extrait sec résultant.
- ✓ **P₀** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

Pour l'HE : Le rendement en huile essentielle (R) est le rapport entre le poids de l'huile extraite (P') et le poids de la plante traitée (P). Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante (**Labioud, 2016**) :

$$Rdt\% = (P'/P) \times 100$$

- ✓ **R%** : Rendement de l'huile en (%).
- ✓ **P'** : Poids de l'huile en (g).
- ✓ **P** : Poids de la plante en (g).

2.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique) :

Nous allons caractériser la présence des métabolites secondaires (saponosides, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, coumarines, composés réducteurs et autres). Les tests phytochimiques ont été effectués sur les extraits méthanolique et aqueux de *Mentha pulegium*, en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation. Ces tests phytochimiques sont représentés par :

- ✓ Des réactions de coloration et de précipitation ;
- ✓ Des essais de solubilité des constituants présents dans la plante ;
- ✓ Des examens sous la lumière ultraviolette.

a. Alcaloïdes :

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer, de Wagner et Dragendorff. (**Annexe III**) 6 ml de chaque extrait sont évaporés à sec, le résidu est repris par 5 ml d'acide chlorhydrique (HCL) 2N. Dans trois tubes à essai contenant 1 ml du filtrat, nous avons ajouté 5 gouttes de réactif de Mayer (M) dans le premier tube, 5 gouttes du réactif de Wagner (W) dans le second tube et 5 gouttes du réactif de Dragendorff (D) dans le troisième tube (**Figure 08**), l'apparition d'un précipité blanc, brun et orange, respectivement, révèle la présence d'alcaloïdes (**Karumi et al., 2004**).

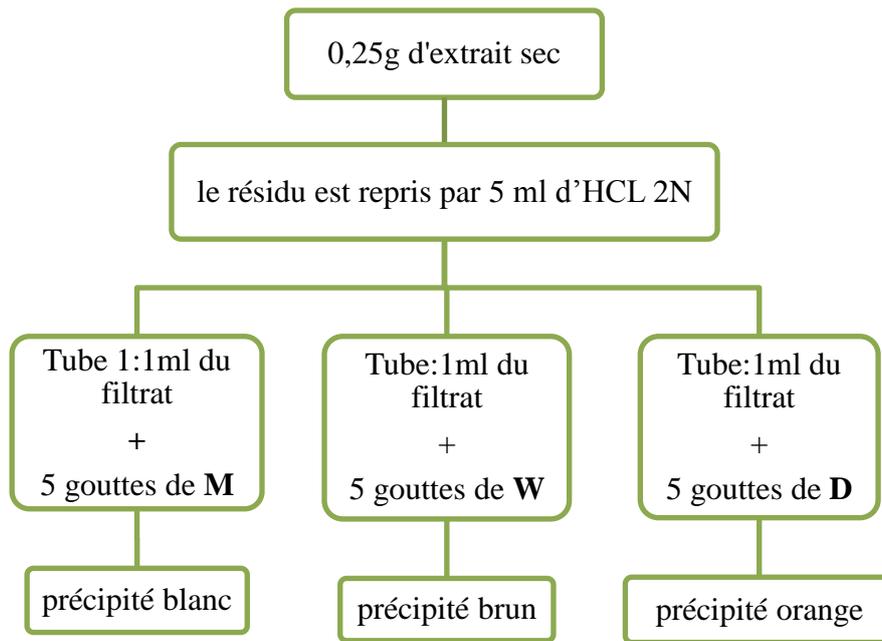


Figure 08 : schéma des tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes

b. Substances polyphénoliques :

Tanins : Dans un tube à essai, introduire 5 ml d'extrait à analyser, ajouter 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution aqueuse de chlorure ferrique (FeCl_3) diluée à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre (Figure 09). L'apparition d'un précipité rouge indique la présence des tanins catéchiques, cependant, L'apparition de la coloration bleue-noirâtre indique la présence des tanins galliques (Zekri, 2017).

Flavonoïdes : A 5 ml d'extrait à tester, ajouté 1 ml d'alcool iso amylique, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'HCl (Figure 09), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence des flavonoïdes (Kahlouche, 2014).

Anthocyanes : A 1mL de l'extrait, nous avons ajouté 5 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 10% puis de l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) à 25% (Figure 09). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée en milieu basique, cela permet de conclure la présence des anthocyanes (Zekri, 2017).

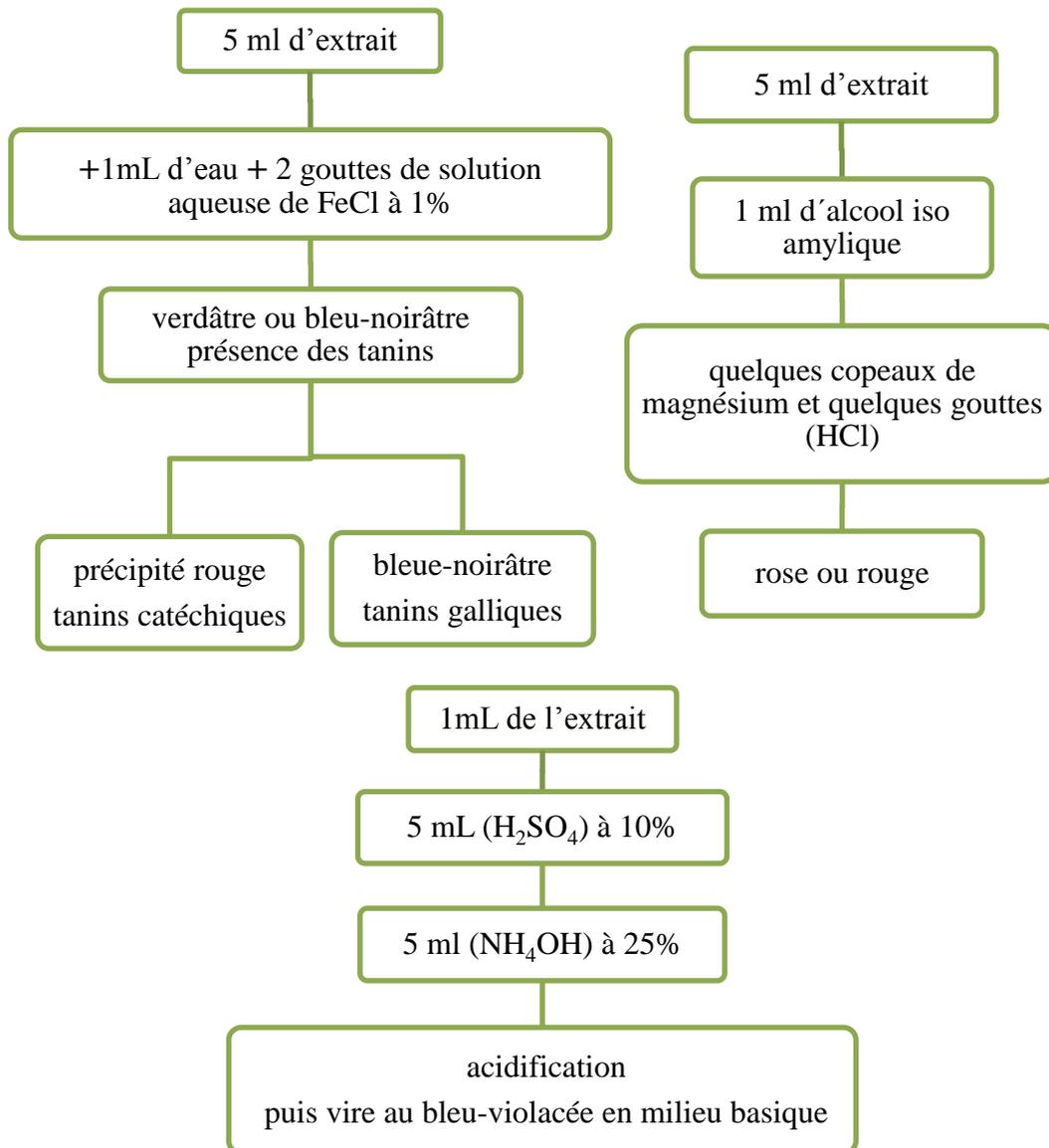


Figure 09 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols

Coumarines : Fluorescence UV

5 ml de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu ainsi obtenu est repris dans l'eau chaude. Un volume de cette phase aqueuse est additionné d'une solution d'ammoniaque (NH₄OH) à 10% et un autre volume est gardé comme témoin (**Figure10**). L'apparition de fluorescence après observation sous UV à 366 nm indique la présence de coumarines (**Kahlouche, 2014**).

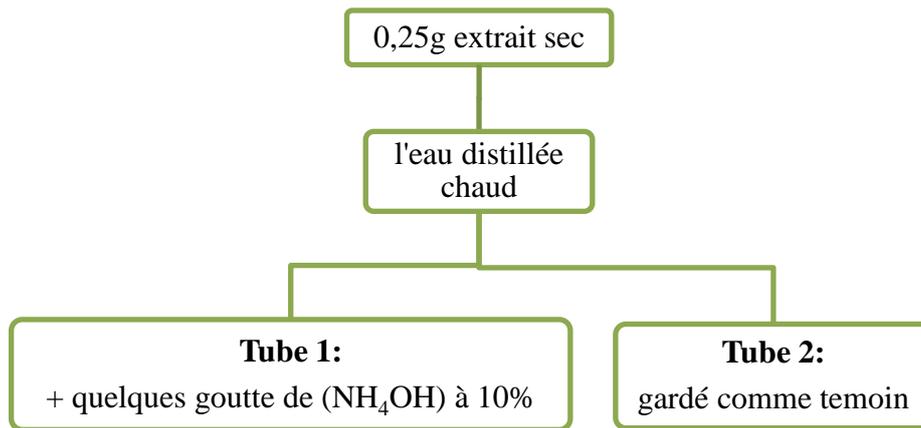


Figure 10 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des coumarines

c. Quinones :

Les substances quinoniques sont recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 2 ml de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est trituré dans 5 ml d'HCL 37% au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essai et porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 2 ml de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (1 ml) est ajouté à la solution chloroformique (**Figure 11**). Une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones (**Oloyede, 2005**).

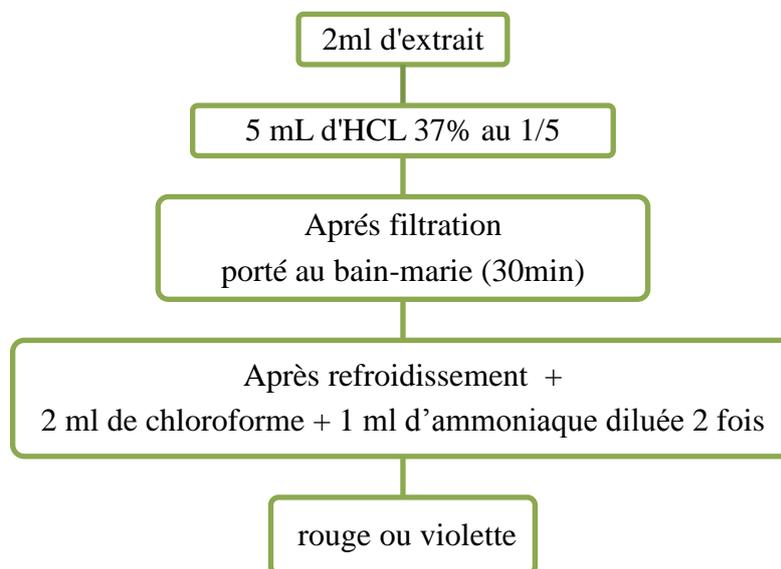


Figure 11 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des quinones

d. Composés réducteurs :

Introduire 2 ml d'extrait dans un tube, ajouter 2 ml de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B) et incuber l'ensemble 8 min dans un bain marie bouillant (**Figure 12**). L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (**Trease et Evans, 1987**).

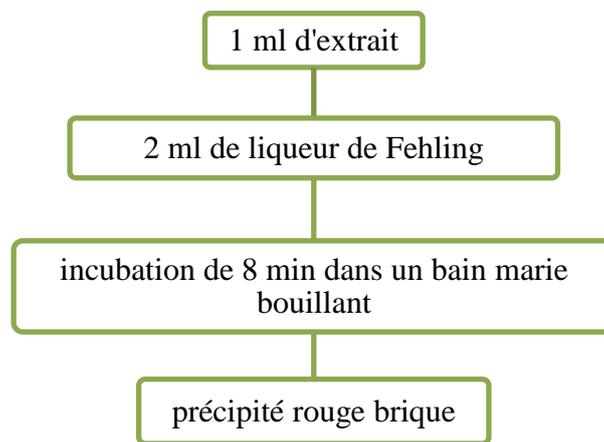


Figure 12 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des composés réducteurs

e. Stérols et triterpènes : La réaction de Liebermann Buchard.

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H₂SO₄ concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes (**Figure13**). La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes (**Kahlouche, 2014**).

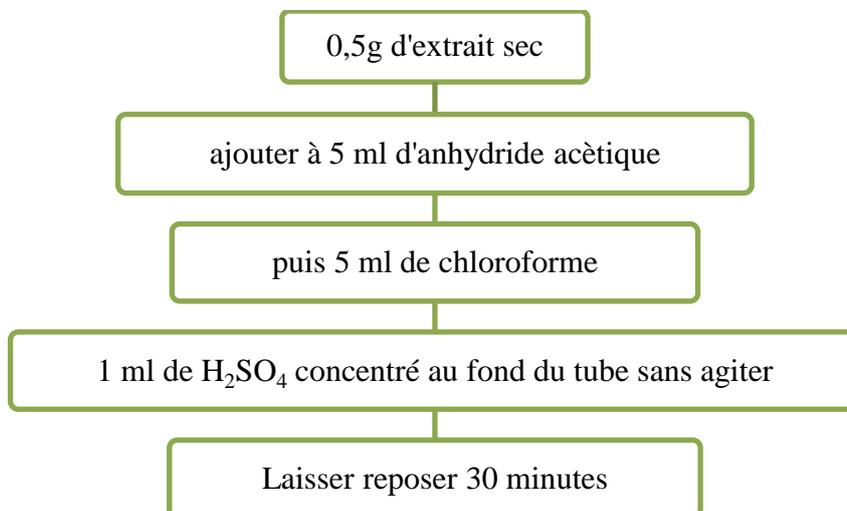


Figure 13 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des stérols et triterpènes

f. Saponines : Indice de mousse :

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3, ..., 10 ml de la solution à analyser. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde (**Figure 14**). Laisser reposer 15 min et mesurer la hauteur de la mousse produite (**Zekri, 2017**).

- ✓ L'indice de mousse (**I**) est calculée par la formule suivante : $I = 1000 / N$

N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

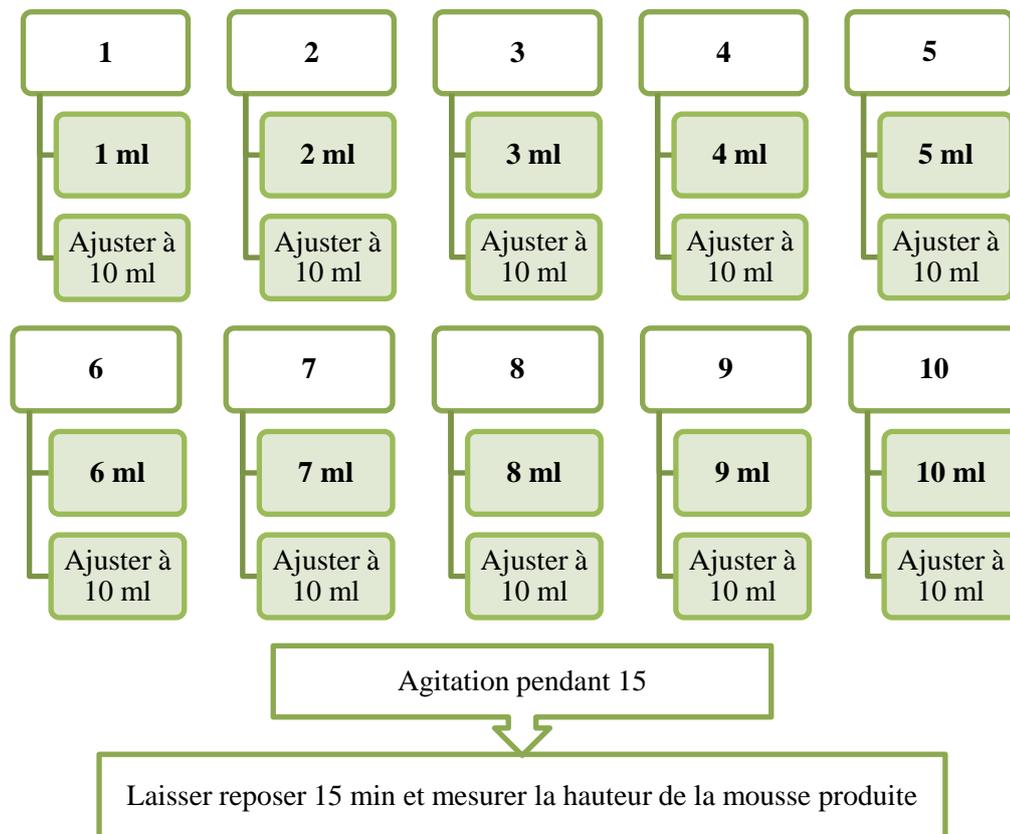


Figure 14 : Schéma des tests phytochimiques pour la détection des saponines

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante :

La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro*, des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux (Prior *et al.*, 2005). Notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux tests chimiques : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]).

La gamme de concentration des extraits (méthanolique et aqueux) a été préparée dans douze tubes à essais numérotés de 1 à 12 par la méthode de la double dilution selon une progression géométrique de raison 1/2. Cette dilution a été réalisée à partir des solutions mères de la concentration 500mg/ml : l'extrait méthanolique diluée dans le méthanol et l'extrait aqueux diluée dans l'eau distillée.

Tableau 16 : les concentrations utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
mg/ml	500	250	125	62,5	31,5	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97	0,48	0,24

2.4.1. Capacité antioxydante totale :

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (Mo⁶⁺) en molybdène (Mo⁵⁺) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo⁵⁺ de couleur verte (Prieto *et al.*, 1999). La méthode consiste à introduire dans un tube 300 µl de chaque extrait à différentes concentrations mélangés à 3000µl d'un réactif composé de (H₂SO₄ 0,6 N), de phosphate de sodium (Na₃PO₄, 28 mM) et de molybdate d'ammonium ((NH₄)₆ Mo₇O₂₄. 4H₂O, 4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300 µl de méthanol mélangé avec 3000 µl du réactif.

Les échantillons et le témoin sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g-1 MS) (Prieto et al., 1999).

2.4.2. Piégeage du radical libre DPPH[•] :

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH[•] comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm (Figure 15). Le test consiste à mettre le radical DPPH[•] (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (Masuda et al., 1999).

Notons que compte tenu de la solubilité en milieu organique du DPPH, cette méthode est plus adaptée pour les dosages qui se déroulent en milieu alcoolique (méthanol et éthanol).

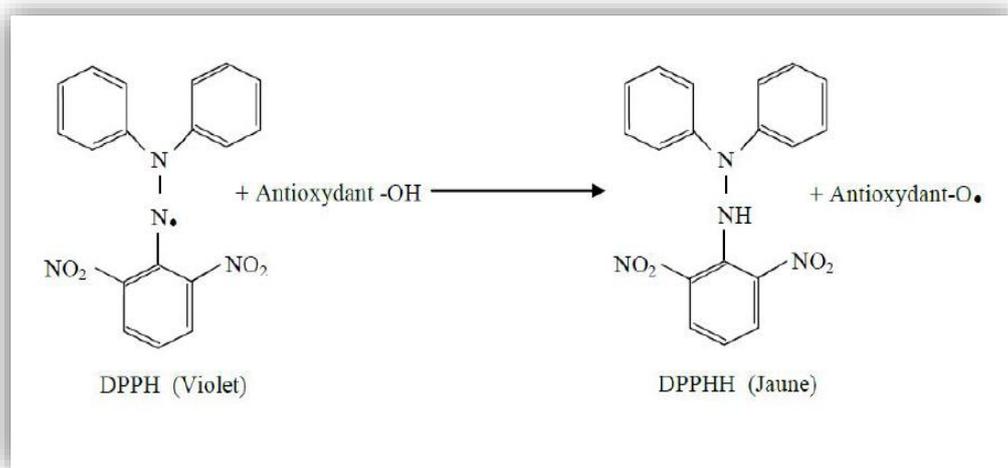


Figure 15 : Equation du radical DPPH transformé en DPPHH (Masuda et al., 1999)

Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 500 μ l d'extrait à différentes concentrations des deux extraits (extrait méthanolique et aqueux) est mise en présence de 1500 μ l d'une solution de DPPH[•] (0.2mM, préparée dans le méthanol) (Figure 16). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif composé de 1ml de la solution de DPPH et de 1ml de méthanol (sans extrait). L'antioxydant de synthèse utilisé est l'acide ascorbique. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition,

calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule (DO densité optique) :

$$PI = (DO_{\text{témoin}} - DO_{\text{extrait}} / DO_{\text{témoin}}) \times 100$$

- ✓ **PI** : pourcentage d'inhibition.
- ✓ **DO témoin** : absorbance du témoin négatif.
- ✓ **DO extrait** : absorbance de l'extrait

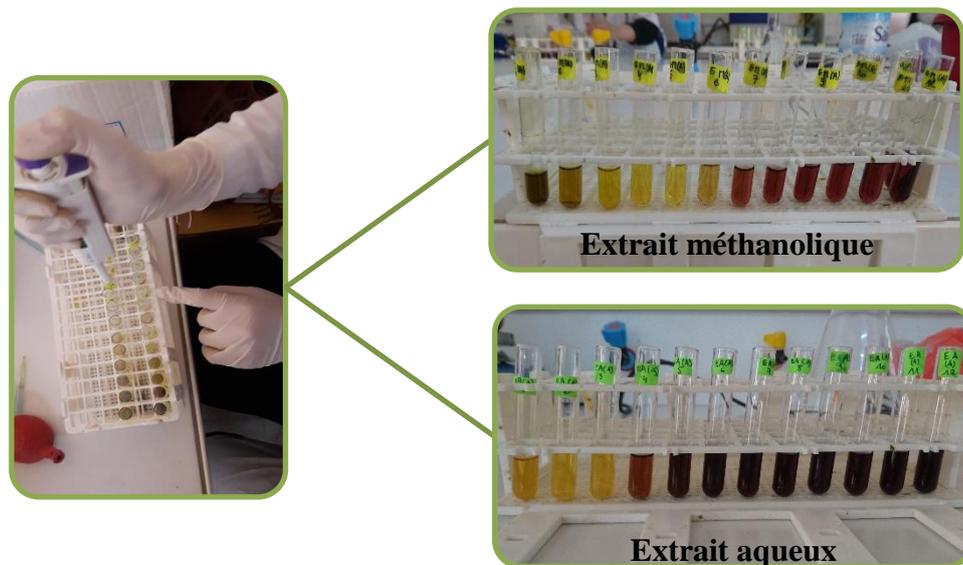


Figure 16 : Piégeage du radical libre DPPH

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC_{50}) ; la valeur d' IC_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l' IC_{50} est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ (3 répétitions pour chaque concentration) (Zekri, 2017).

Les IC_{50} sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (Obame Engonga, 2009).

2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Le test de susceptibilité des extraits méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *Mentha pulegium* est effectué selon deux méthodes différentes: la méthode de diffusion sur disque en milieu solide de Mueller-Hinton comme un test préliminaire et qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et la méthode des micro-dilutions qui a pour but de déterminer la

concentration inhibitrice minimale (CMI) à partir d'une gamme de concentrations dans des milieux de culture convenables

2.5.1. Revivification et repiquage des souches microbiennes :

La revivification des souches, une étape nécessaire avant leur utilisation car leur activité biologique est nulle à l'état conservé. Cette revivification a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. Elle se fait en réalisant un repiquage sur milieu solide (Solbi, 2013) :

- ✓ En premier, la souche de référence a été sortie du réfrigérateur et déposée sur la paillasse pour revenir à la température ambiante.
- ✓ Pour les bactéries et les levures on a prélevé 1ml du milieu de conservation de la bactérie. Ensuite, nous avons les mis dans 10ml de bouillon nutritif (BN) (Annexe II) et incubé à 37°C pendant 24 heures. 0,1ml de cette dernière solution a été ensemencé en surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu Gélose Nutritive (GN) (Annexe II) (Bactéries) et sur Gélose Sabouraud (Annexe II) (Levures). Incubation à 37 C pendant 24 heures et 35°C pendant 48 heures respectivement.
- ✓ Pour les champignons on a prélevé des disques de moisissure et déposer sur gélose Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe II) acidifié, incubé à 25°C pendant 3 à 5 jours.

Le repiquage se fait sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos, on ensemence le tube avec une colonie bien isolée de la souche purifiée en utilisant une anse de platine préalablement flambée et en faisant des stries sur la surface inclinée, puis le tube est incubé à 37°C pendant 18-24 heures. Après récupération, le tube est conservé à une température de 4 à 6°C. Le repiquage doit se renouveler en continu chaque mois (Saker, 2015).

2.5.2. Méthode de diffusion en milieu solide :

C'est une méthode d'évaluation de la sensibilité des microorganismes (évaluation qualitative) vis-à-vis des substances antimicrobienne. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé à effet antimicrobienne en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'activité antimicrobienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. Elle a été proposée et standardisée en 2004 par *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-M44-A 2004)*.

Préparation de la gamme de concentration des extraits :

Les extraits (méthanolique, aqueux et l'HE) ont été dissouts dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution mère de 100 mg/ml, pour préparer les différentes dilutions (1/2). Cette gamme (**Tableau 17**) a été préparée dans des 9 tubes en verre (**Meddour et al., 2013**).

Tableau 17 : les concentrations utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

N°	SM	1	2	3	4	5	6	7
mg/ml	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78

Préparation des suspensions bactériennes et fongiques :

Les tests antimicrobiens sont effectués à partir de colonies jeunes (bactéries 18 à 24 h et levure 48 h) en phase de croissance exponentielle. L'obtention de l'inoculum pour les bactéries s'effectue comme suit : à partir de la préculture bactérienne en milieu solide GN de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies (5 colonies de même taille, aspect et de diamètre) que nous avons resuspendues dans le BN. L'inoculum est ajusté à 10^8 cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la DO à une longueur d'onde de 625 nm (**Figure 17**). Concernant les levures, la préculture en milieu solide (sabouraud) de 48 h à 35 °C et l'inoculum est ajustée à 10^6 cellules/ml (une DO de 0,06 à 0,08) par lecture de la DO à une longueur d'onde de 530nm (**Halla, 2010**).

Ensemencement des boîtes :

Les boîtes de Pétri contenant de Mueller Hinton gélosé (MH) (**Annexe II**) sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage (**Figure 17**). Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min).

- ✓ Tremper un écouvillon sec stérile dans l'inoculum.
- ✓ Eliminer l'excès d'inoculum en pressant l'écouvillon et en le faisant roulet contre les parois du tube au-dessus du niveau de liquide.
- ✓ Ensemencer en stries sur toute la surface des boîtes à trois reprises et passer enfin l'écouvillon sur le bord de la gélose.
- ✓ Recharger l'écouvillon chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche (**Daouadji, 2010**).

Préparation des disques :

La préparation des disques se fait à partir du papier Wattman qui est découpé en disques de 06 mm de diamètre. Les disques sont chargés de principe actif à testés 10 µl à différentes dilutions de chaque extrait de *Mentha pulegium* (extrait méthanolique, aqueux et l'HE) (**Figure17**). Finalement, on prépare des disques imprégnés de DMSO. Cette dernière catégorie de disques servira de contrôle négatif. Différents disques d'antibiotiques et d'antifongiques standards ont également été utilisés comme contrôle positif (le choix des antibiotiques est fait selon le genre de la bactérie.) (**Kahlouche, 2014**).

Application :

Les disques sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu gélosé, préalablement ensemencé (**Figure17**). Ils doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être incubées. Les boites sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C pour les bactéries et pendant 48 heures à 35 °C pour les levures (**Figure17**). Le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques est alors mesuré (**Labioud, 2016**).

Lecture :

Selon **Barros et al., 2007**, l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- ✓ Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (–)
- ✓ Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+)
- ✓ Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (+ +)
- ✓ Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+ + +)
- ✓ Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (+ + + +)



Figure 17 : quelques étapes de la méthode de diffusion en milieu solide

2.5.3. Méthode des micro-dilutions en milieu liquide :

La méthode de micro-dilution est une méthode quantitative qui permet de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CMI). Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne, dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations décroissantes des extraits et des HE (CLSI-M7-A7 2006).

Préparation de la gamme de concentration des extraits :

La gamme de concentration des extraits a été préparée à partir d'une solution mère de la concentration 100mg/ml dans 10 tubes à essais par la méthode de la double dilution (1/2) comme nous avons déjà mentionnée dans le tableau 17 plus la 10^{ème} dilution. On a dilué les extraits dans les milieux de culture liquide utilisée, concernant l'HE l'ajout de tween 80 dans la solution mère c'est nécessaire.

Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI :**a. Bactéries :**

La technique utilisée a été décrite par **CLSI** en **2006**. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antibactériennes et de déterminer les CMI et les CMB correspondantes (**CLSI-M7-A7 2006**). Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes. Le Bouillon MH (**Annexe II**) (pH de 7,2 à 7) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. A partir d'une préculture bactérienne, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendues dans du bouillon nutritif. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à 10^8 cellules/ml (une DO de 0.08 à 0.1, $\lambda = 625\text{nm}$) (**Mohapatra et al., 2011**).

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50 μl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement le bouillon de MH comme témoin positif (100 μl).

Nous avons ensuite ajouté 50 μl de la solution de l'extrait dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans extrait) (**Figure 18**). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures (**CLSI-M27-A2, 2002**).

b. Levures :

Nous avons utilisé la méthode décrite en **2002** par *Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 (CLSI)*. C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (**CLSI-M27-A2 2002**).

Pour les souches de *Candida albicans*, l'inoculum doit être préparé à partir d'un prélèvement de 5 colonies de même diamètre que nous avons placé dans un tube à essai contenant 5 ml sabourad liquide. La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à 10^6 cellules/ml (une DO de 0.06 à 0.1, $\lambda = 580\text{nm}$).

Il s'agit de la même méthode que pour les bactéries (**Figure 18**) mais le milieu de culture utilisé est le sabourad (**Annexe II**) et une incubation de 35°C pendant 24 heures.

Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) et fongicide (CMF) :**a. Bactéries :**

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en extrait et HE strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (**Prescott et al., 1995**).

b. Levures :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par **Canton et al., 2003**. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI (**Espinelgroff et Canton, 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), Il s'agit de la même méthode que pour les bactéries. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h.

L'interprétation des résultats est effectuée en fonction de l'absence ou de la présence de turbidité dans chaque cupule. La CMI est donc la plus petite concentration où le fluide a été trop clair. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la CMI, elle est confirmée par la recherche de la CMB. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3.

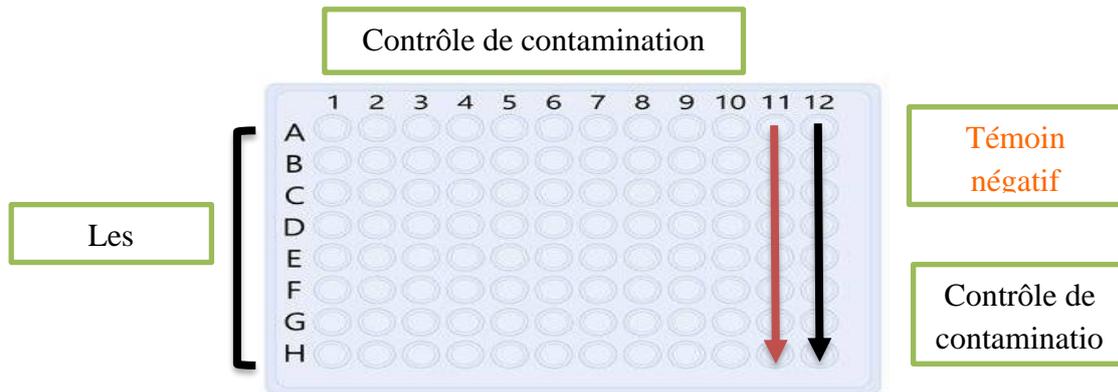
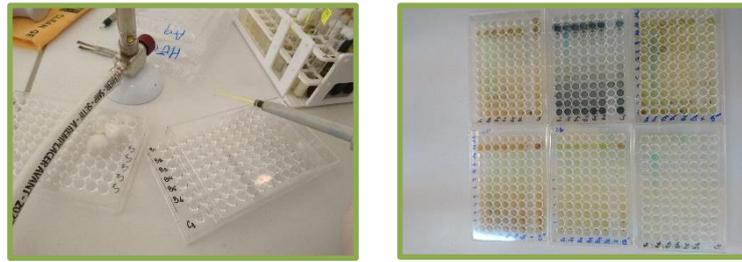


Figure 18 : Préparation de la microplaque

2.5.4. Evaluation de l'activité antifongique :

Selon les résultats de la méthode de diffusion en milieu solide l'extrait méthanolique a été le plus active et surtout sur les levures, c'est pour ça nous avons réalisé l'activité antifongique de l'extrait méthanolique et testé sur des champignons mycéliens (moisissures).

Avec le concours du Docteur Adli Djalal-Eddine, Maître de conférences A au département de biologie université de Saïda, nous avons choisi quatre souches isolées de moisissures (**Tableau 15**).

Des quantités d'extraits variables (20-50-100-150 et 200 μ l) avec la concentration mère égale à 250mg/ml sont additionnées à 20 ml de milieu PDA acidifiée. Les mélanges sont coulés sur des boîtes de Pétri. Après solidification, on inocule avec des disques de mycélium de la souche (de 6 mm de diamètre) prélevés d'une culture de 7 jours qu'on dépose au centre des boîtes, et les boîtes de témoin incubées sans addition d'extrait. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 03 à 05 jours à 28°C ce qui leur permet de coloniser toute la surface de la boîte (**Touhami, 2017**).

Les résultats sont exprimés par la mesure des diamètres des zones de croissance de l'hyphe par rapport au témoin selon l'application de la formule suivante (Soliman et Badeaa, 2002).

$$T = (dC - dE / dC) \times 100$$

Avec :

- ✓ **T (%)** : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.
- ✓ **dE** : Le diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (mm).
- ✓ **dC** : Le diamètre de témoin (mm).

2.6. Mécanisme d'action de l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus* :

Les concentrations de l'extrait méthanolique ont été choisies selon les CMI précédemment déterminées. La gamme de ces concentrations est de : 1/2 CMI, CMI, CMB et CMBx2. La solution tampon utilisée pour ces tests est la solution tampon phosphate (PBS).

La suspension bactérienne (la phase exponentielle de croissance) a été préparée par inoculation de cinq colonies d'une culture jeune de bactéries dans 50 ml de bouillon MH. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 4 à 5 h sous agitations. Après l'incubation, les bactéries ont été séparées au milieu de culture par centrifugation à 5000 tr/min durant 20 min à 4°C, ensuite suspendu le culot bactérien dans la solution PBS (pH 7.4) (Annexe III) après lavage de deux fois par cette solution (Carson et al., 2002).

La solution mère de CMBx2 (3,125mg/ml) a été diluée dans la solution PBS pour l'obtention de la gamme de concentration CMB (1,56mg/ml), CMI (0,78mg/ml) et CMI/2 (0,93mg/ml).

Après l'ajustement de la suspension des bactéries lavées à 10^6 cellules/ml (une DO de 0.06 à 0.08, $\lambda = 625\text{nm}$). Des volumes 10 μl de la suspension ont été traitée par les concentrations croissantes d'extrait méthanolique (990 μl). Le contact extrait /bactéries lavées dure 60 min à 37°C au bain marie sous agitation.

2.6.1. Test de la viabilité cellulaire à différentes concentrations :

Les tests de la viabilité cellulaire ont été réalisés par un comptage des cellules viables sur milieu solide. Pour cela, Des volumes de la suspension traitée (pour chaque concentration) ont été prélevés, diluée dans l'eau peptonée stérile (Annexe III). Puis versés sur des boîtes coulées par un neutraliseur stérile (Annexe II), suivie d'ensemencement par inondation et une boîte

ensemencée seulement en suspension des bactéries lavée réservée comme un essai de contrôle (**De Barros et al, 2009**). Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies ont été comptées et le nombre de cellules viables rapporté comme unités formant des colonies (UFC) par ml et les résultats le nombre d'UFC/ml sur chaque boîte ont été comparés à ceux obtenus pour l'essai de contrôle, et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies.

2.6.2. Test de viabilité cellulaire en fonction de la durée du traitement (cinétique) :

Le test a consisté à dénombrer dans le temps l'évolution des nombre de colonie (UFC) des micro-organismes en présence de la concentration CMB d'extrait. Le contact extrait/bactéries lavées à 37°C au bain marie sous agitation est réalisé pendant des durées variables (0,10, 20, 30, 40, 600, 900, 1200, 3600, 5400 seconde), A intervalles réguliers de temps, chaque prélèvement a été diluée et ensemencée de même façons de test de viabilité. Les résultats ont été exprimés en Log d'UFC/ ml (**De Barros et al, 2009**).

2.6.3. Tolérance au sel :

La capacité des cellules de *S. aureus* traités avec l'extrait méthanolique à croître sur un milieu de culture solide additionné de NaCl a été étudiée. Une quantité de cultures qui a été déjà diluée dans l'eau peptonée stérile a été ensuite étalée sur GN-NaCl (**Annexe II**). Le tube de contrôle sans extrait méthanolique a été testé de la même façon. Après 24 h d'incubation, le nombre d'UFC/ml sur chaque boîte GN-NaCl ont été comparés à ceux obtenus pour l'essai de contrôle, et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies (**Carson et al, 2002**).

2.6.4. Activité des lipases :

L'activité de la lipase a été évaluée sur le milieu de culture Agar Salty Tween – AST (**Annexe II**) (**Nostro et al. 2001**) à pH 7,2. Des cultures cellulaires diluée dans de l'eau peptonée stérile ont été étalées sur l'AST, suivie à incubation à 37 ° C pendant 24 h. Après la période d'incubation, le nombre de colonies (UFC/ml) présentant une activité de lipase positif sur chaque boîte AST ont été comptées, et les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies (**De Barros et al. 2009**).

2.7. Etude de la cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes :

Le test d'activité hémolytique des extraits de la plante *Mentha pulegium* a été réalisé in vitro sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le tampon phosphate buffered saline. (PBS). Le sang est prélevé sur des tubes héparine à partir d'un donneur unique et sain. Le sang est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec la solution de lavage de chlorure de magnésium MgCl₂ (2mM) (**Annexe III**) et chlorure de sodium NaCl (150mM), puis suspendu à nouveau dans le tampon phosphate salé de sodium PBS (100mM, pH 7,4) (**Annexe III**) contenant aussi NaCl (150mM) (**I'Okokoet, 2012**).

Différentes concentrations d'extraits ont été choisies pour ce travail selon les concentrations de CMI et CMB précédemment déterminées. La gamme de ces concentrations est de : 1/2 CMI, CMI, CMB et CMBx2. Les solutions ont été préparées par l'eau distillée pour l'extrait aqueux, le méthanol pour l'extrait méthanolique et le DMSO avec le tween 80 concernant l'HE.

Afin d'étudier l'effet hémolytique de la plante, nous avons suivi le protocole de **Halla (2010)**.

- ✓ Les globules rouges sont suspendus dans du tampon PBS pH 7,4 (100mM), à raison de 4000 cellules/ml. La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 60 minutes. Dès l'addition de la solution d'extrait qui correspond au temps zéro de la réaction,
- ✓ Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalles réguliers auxquels nous avons ajouté 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM).
- ✓ Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 05 minutes, nous avons récupéré le surnageant sur lequel nous avons dosée la fuite de l'hémoglobine par la densité optique à une longueur d'onde de 548nm.
- ✓ Pour le contrôle positif, l'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges avec l'eau distillée. Le tampon avec DMSO sont utilisé comme contrôle négatif.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse dans les échantillons témoins et les échantillons traités avec les différents extraits comme suit :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(\text{DO Contrôle positif} - \text{DO extrait}) / \text{DO Contrôle positif}] \times 100$$

Résultats et discussion

1. Enquêtes ethnopharmacologique :

Les sources indigènes de connaissances médicales sont en train de disparaître et il existe une perte importante des connaissances médicales traditionnelles d'une génération à l'autre, en particulier en ce qui concerne les traditions orales du monde. De plus, la documentation des connaissances traditionnelles joue un rôle clé dans la bio-prospection de nouveaux médicaments issus des plantes médicinales et dans la conservation in situ de plantes médicinales. Cette étude a pour objectif d'examiner l'utilisation traditionnelle de la plante étudiée (*Mentha pulegium*). Elle se fonde généralement sur des questionnaires permettant la collecte de l'information sur cette plante. Afin de réaliser une telle étude sur la plante *Mentha pulegium*, nous avons mené à une enquête approfondie dont les résultats sont interprétés dans les sections suivant.

1.1. Profil des informateurs :

a. Age, genre et situation familiale :

Nous avons interrogé 50 personnes sur l'utilisation de la plante d'*Mentha pulegium* dont l'âge varie entre 20 et 60. Les résultats sont illustrés dans la **Figure 19**.

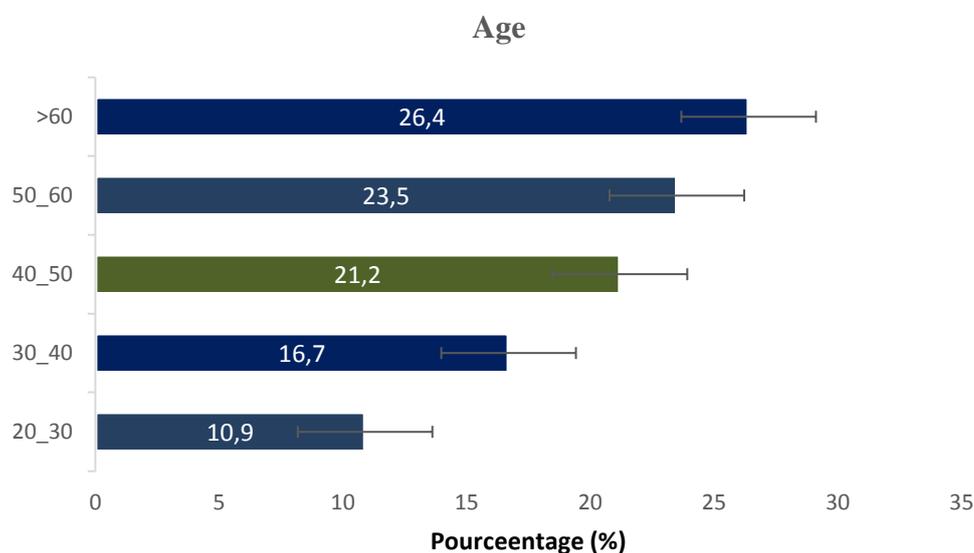


Figure 19 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la tranche d'âge

Ces résultats montrent clairement que notre enquête a touché pratiquement toutes les tranches d'âge. Nous remarquons également que l'utilisation de la plante étudiée est globalement

répandue chez l'ensemble des personnes que nous avons enquêtés avec un pourcentage plus élevé chez les personnes de plus de 60 ans (26,4%). Cette plante est bien utilisée ainsi pour les personnes âgées entre 50 à 60 ans avec un pourcentage de 23,5%. Pour la tranche d'âge de 40 à 50 respectivement la tranche d'âge de 30 à 40 nous avons eu un taux d'utilisation de 21,2% respectivement de 16,7%. Le mauvais taux est obtenu chez les personnes de 20 à 30 ans. Ces résultats montrent lisiblement que dans de la région de Saïda les personnes les plus âgées et plus expérimentés sont eux qui ont tendance à utiliser fréquemment ce type de plantes.

Le pourcentage d'utilisation de la plante *Mentha Pulegium* selon le sexe ainsi que la situation familiale est présenté dans la **figure 20**.

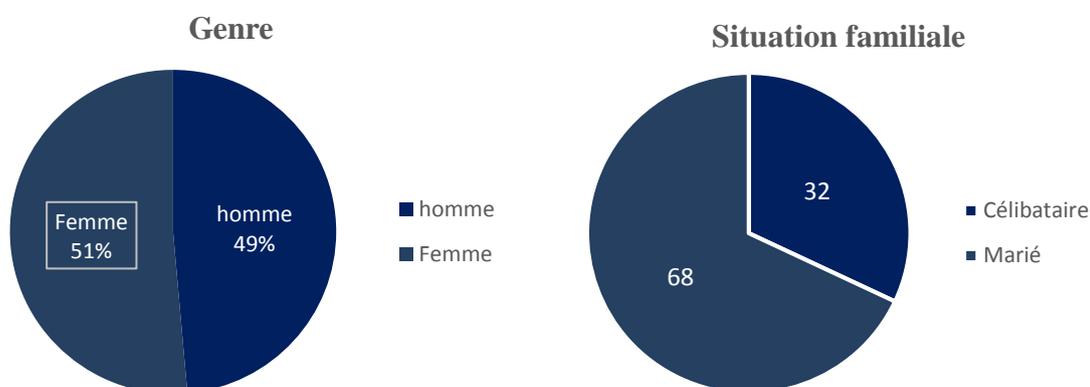


Figure 20 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le genre et la situation familiale.

En outre, notre étude a montré également que l'utilisation de la plante l'objet de cette étude ne concerne pas un sexe particulier, par conséquent, 49% des utilisateurs sont des hommes et 51% sont des femmes. Cette analyse a montré que, ceux qui sont mariés, sont ceux qui connaissent le mieux l'utilisation de cette plante (68%) par rapport aux célibataires (32%). Cela peut se justifier par le fait que ces personnes utilisent cette plante pour économiser sur leurs dépenses destinées à l'achat des médicaments.

b. Niveau d'étude :

Dans cette section, nous comparons le niveau d'étude d'enquêteurs de la zone étudiée. Rappelons que la zone d'étude est située dans le nord-ouest de l'Algérie. Dans la **Figure 21** nous présentons les résultats obtenus selon le niveau d'étude des participants de l'enquête.

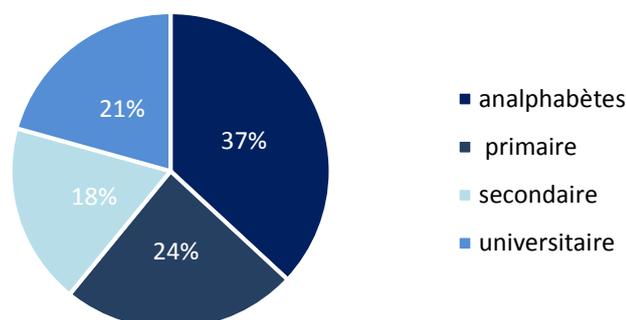


Figure 21 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le niveau d'étude

L'idée de cette étude est de savoir ce que l'utilisation *Mentha Pulegium* nécessite des acquis intellectuels ou pas. Les résultats obtenus nous permettent de constater que 63% des utilisateurs de la plante *Mentha Pulegium* ayant un niveau intellectuel dont 24% provenant de primaire, 21% de secondaire et 18% de l'université. Nous constatons également qu'un pourcentage élevé des personnes analphabètes (37%) utilise cette plante. Ce dernier résultat nous permet de noter que l'utilisation de cette plante ne nécessite pas des acquis intellectuels.

Le niveau d'éducation est reflété par le niveau culturel et les personnes ayant un niveau d'études élevé possèdent plus d'informations sur les soins de santé primaires et la médecine moderne. Néanmoins, cette constatation ne signifiait pas que cette catégorie de société possédait plus de connaissances liées à la médecine traditionnelle ou à la botanique. Au contraire, plusieurs études antérieures ont montré que les personnes ayant un faible niveau d'instruction possédaient une plus grande expertise dans ce domaine de la médecine traditionnelle et de la botanique populaire médicale (Fajardo et al., 2008).

c. Source d'informations :

Nous voulons savoir d'où les participants de l'enquête ont eu de l'information concernant l'utilisation de la plante étudiée. Par conséquent, nous avons définis les critères suivants :

- **Héritage** : dans le cas où les connaissances acquièrent provient des partants des participants.
- **Apprentissage** : dans le cas où l'information a été obtenue par études spécialisé sur les plantes médicinales ou bien en consultant des livres de la médecine traditionnelle.

- **Expérience personnelle** : dans le cas où l'information a été obtenue à travers une personnelle expérience grâce à l'existence de nombreuses plantes médicinales dans leur entourage ou à partir de la télévision, l'Internet, le livre, etc.
- **Autre** : dans d'autre cas

La **Figure 22** montre la répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la source de leurs informations.

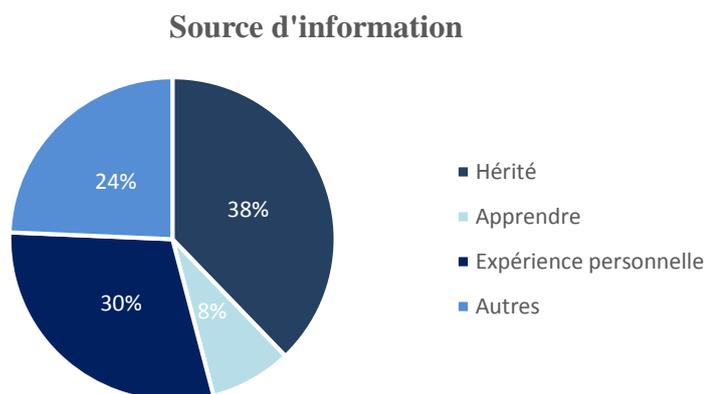


Figure 22 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la source de leurs informations

Nous remarquons en analysant les résultats que dans la majorité des cas, l'information acquise provient des partants (Héritage) avec 38%. Nous remarquons également que 30% de participant développé leurs connaissances sur la plante *Mentha pulegium* à travers des expériences personnelles. En outre, nous constatons que 24% de personnes ont fait des études sur les plantes médicinales ou ont l'habitude de consulter les livres de la médecine traditionnelle.

Le patrimoine représente un outil essentiel pour transférer les connaissances qui ne sont pas écrites dans les livres d'une génération à l'autre (Fajardo et al., 2008). La famille, les amis et les voisins jouent également un rôle crucial dans le transfert des informations selon les informateurs. La littérature est un moyen intéressant d'acquérir des connaissances dans tous les domaines. Ainsi, la littérature est une source d'information puissante sur les utilisations culturelles passées et contemporaines des plantes (De Carvalho, 2011).

1.2. Informations générales sur la plante :

a. Nom, source et nature :

Dans ce qui suit, nous présentons nos expériences réalisées sur l'utilisation de la plante *Mentha pulegium* dans la région l'objet de notre étude. Par conséquent, dans la **Figure 23** nous donnons trois diagrammes en secteurs. Dans le premier, nous illustrons le nom d'usage de la plante dans la région de Saïda. Dans le deuxième et le troisième nous montrons si la plante est importée ou non et comment elle a été cultivée.

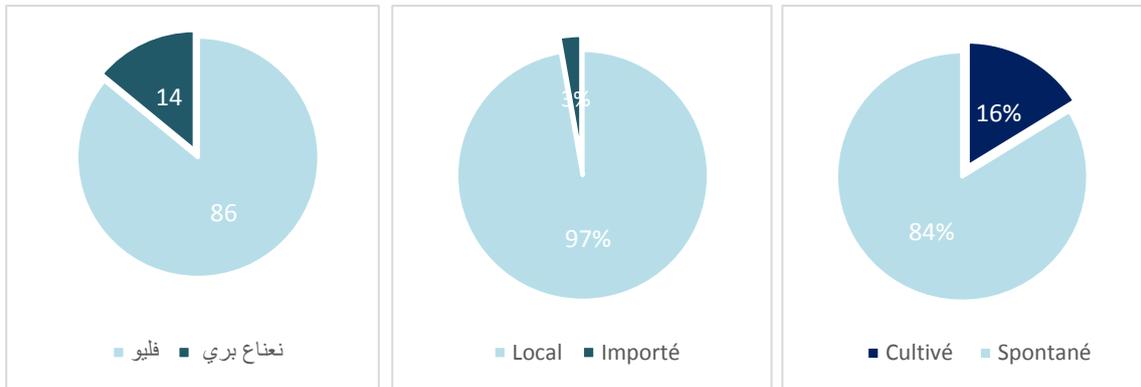


Figure 23 : Répartition des noms, des sources et des natures de la plante étudiée.

La **Figure 23** montre que la plante *Mentha pulegium* est connue sous le nom « فليو » par 86% des participants de l'enquête et seulement 14% connaissent le nom « نعناع بري ». La **Figure 23** montre également que la plante *Mentha pulegium* est une plante régionale (97%) et elle pousse naturellement (84 %).

b. Technique et saison de récolte :

Dans cette section nous présentons une autre étude concernant les techniques de récolte adaptée dans la région de Saïda ainsi que la saison de l'année où la plante *Mentha pulegium* pousse-elle. Dans la **Figure 24** nous donnons les résultats obtenus concernant cette étude.

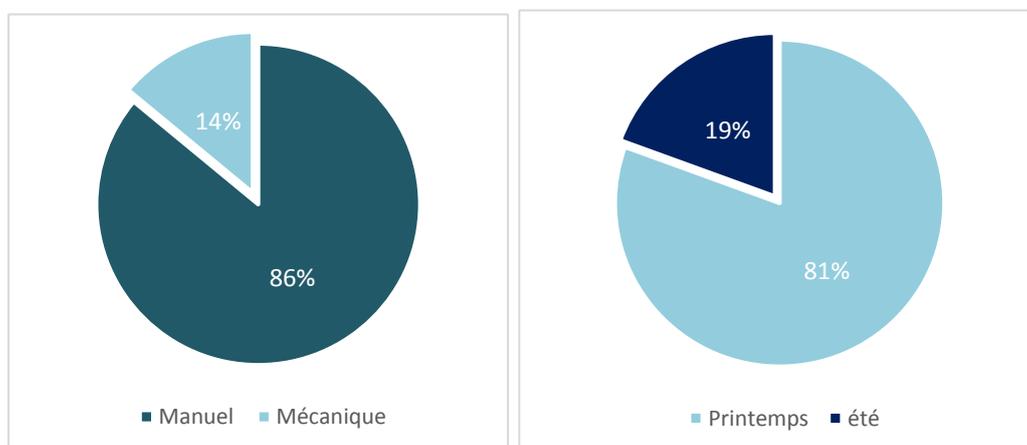


Figure 24 : Répartition des techniques et saison de récolte de la plante étudiée.

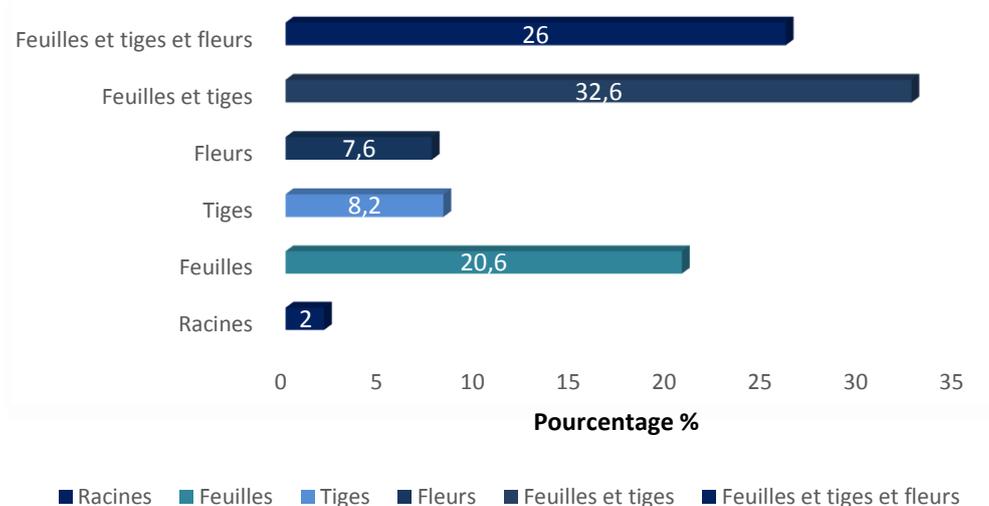
Le premier diagramme en secteur de la **Figure 24** montre clairement que la technique de la récolte adaptée par la population de la région est bien manuelle avec un pourcentage très élevé égale à 86%. Seulement 14% de la population utilisent des techniques mécaniques. Nous constatons, en analysant le deuxième diagramme, que la plante concernée par notre étude pousse pendant le printemps.

1.3. Information sur la préparation et l'utilisation médicale :

Dans cette partie, nous cherchons quelles sont les parties de la plante *Mentha pulegium* appropriées à l'utilisation en médecine traditionnelle dans la région d'étude.

a. Parties utilisées :

Les résultats sont présentés dans la **Figure 25**.

**Figure 25** : Répartition de l'utilisation de plante étudiée selon leurs parties utilisées

Les résultats montrent que 32.6% de personne utilisent que les feuilles et les tiges de la plante. Les personnes combinant les feuilles, les tiges et les fleurs sont estimés à 26%. De surcroît, 20.6% de personnes utilisent que les feuilles. Les résultats nous permettent de constater également que peu de personnes utilisent des fleurs ou des tiges seules. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'utilité de cette plante est dans les parties aériennes combinées.

Cela pourrait s'expliquer par la rapidité et la facilité de récolte des plantes médicinales et par le fait que les parties aériennes des plantes sont au centre du phénomène photosynthétique. En outre, il a été signalé que les matières végétales à base de racines et d'écorce ne sont pas durables pour le développement de médicaments traditionnels ou pour la découverte de médicaments (Geoffrey, 2015).

b. Formes utilisées :

Dans ce qui suit, nous présentons une autre étude liée à la manière d'utilisation de la plante l'objet de notre étude. Dans la **Figure26** nous donnons les résultats obtenus. Ces résultats montrent que 59.5% de personne utilisée la plante à leur état frais. Seulement 37.8% de personnes se basent sur l'utilisation à l'état sec.

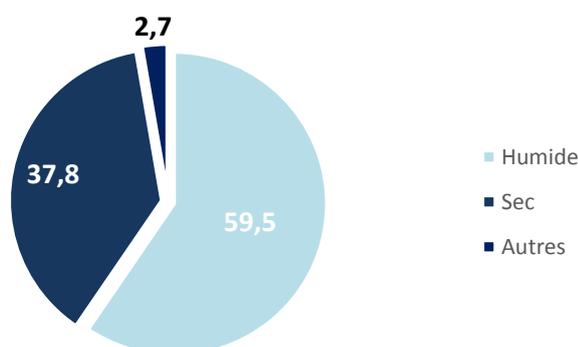


Figure 26 : Répartition de l'utilisation de plante étudiée selon leurs formes utilisées.

c. Mode de préparation :

Dans la **Figure27** nous étudions comment les personnes prendre la plante *Mentha pulegium*. Autrement dit, le dosage de l'eau et la plante qu'il faut prendre pour guérir.

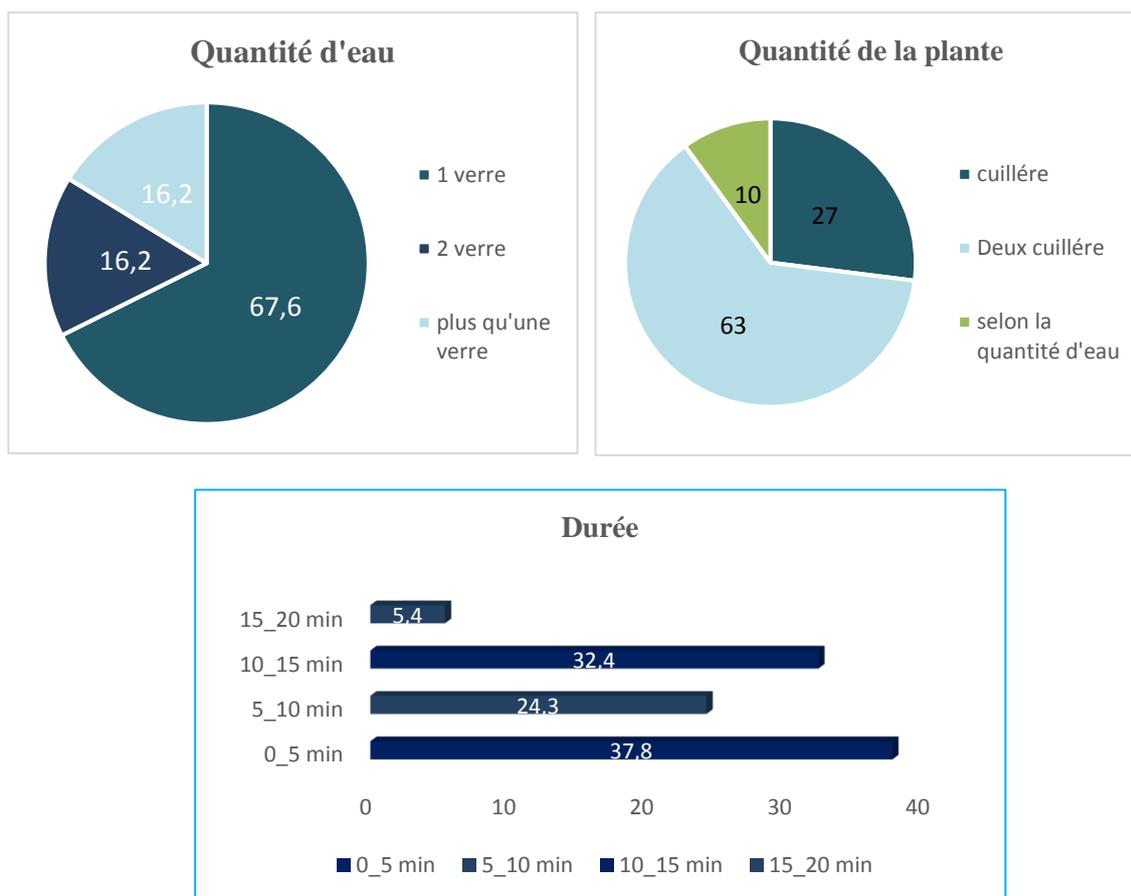


Figure 27 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon le mode de préparation

La **figure 27** montre clairement que 67.6% de personnes prennent la plante avec un verre d'eau. Un nombre similaire de personnes qui prennent la plante avec deux verres d'eau ou plus qu'un verre. Le deuxième diagramme à droite, illustre le dosage de plante utilisé par les personnes. Nous constatons à partir les résultats obtenus que 63% de personne prend deux cuillères de plante et 27% de personnes prend une seule cuillère. Cependant, 10% de personnes préfère de la prendre en fonction de quantité d'eau. Le troisième diagramme consiste à étudier la durée utilisée pour préparer la tisane à base de la plante étudiée. Ce dernier montre que 40% de personne la laisser cuire pendant 5min. Presque 35% de personne préfère de la préparer dans un intervalle de 10 à 15 min. Environ de 25% de personnes se basent sur une durée de 5 min à 10 min. Peu de gens utilisent une durée de 20 min.

d. Dose utilisée, durée d'utilisation et les catégories autorisées :

Dans cette partie nous étudions le mode d'administration (posologie) de la plante dans la zone de Saïda. La figure 28 résume les résultats de cette partie.

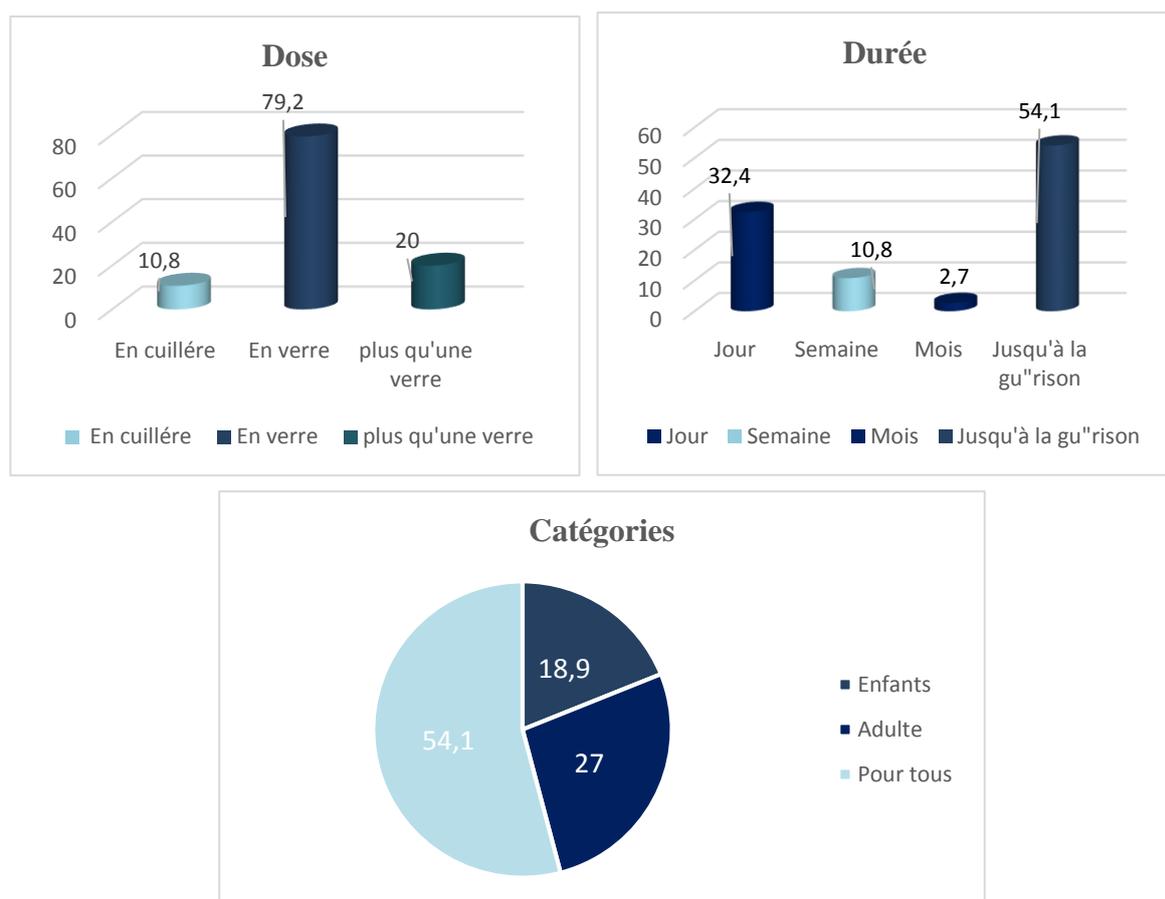


Figure 28 : Répartition des utilisateurs de plante étudiée selon la posologie et la durée d'utilisation

Nous remarquons globalement que dans la région étudiée les personnes prennent la plante avec une dose non précises et dans une période aléatoire. Par conséquent, 50% personnes prennent la plante jusqu'à la guérison. Environ de 30% personnes prennent la plante pendant un jour. D'autres personne préfère de la prendre pendant une semaine (9%). Pour la dose, dans la quasi-totalité des cas la dose prise est un verre (environ 78%). D'autres personnes préfèrent de prendre plus qu'un verre (19%). Dans le troisième diagramme nous étudions les catégories autorisées pour prendre la plante l'objet de notre étude.

La figure 28 montre clairement que la plante étudiée peut être consommée par toute personne à n'importe quel âge avec un pourcentage de 54,1%. D'autre personne estime que cette plante est destinée pour les adultes avec un pourcentage de 27%. Peu de personne utilise la plante pour des enfants (18,9%).

Il est important de mentionner que plusieurs personnes on dit que cette plante est interdite pour les femmes enceintes.

e. Maladies traitées :

Dans cette section nous décrirons les maladies traitées avec la plante *Mentha pulegium* (Figure 29).

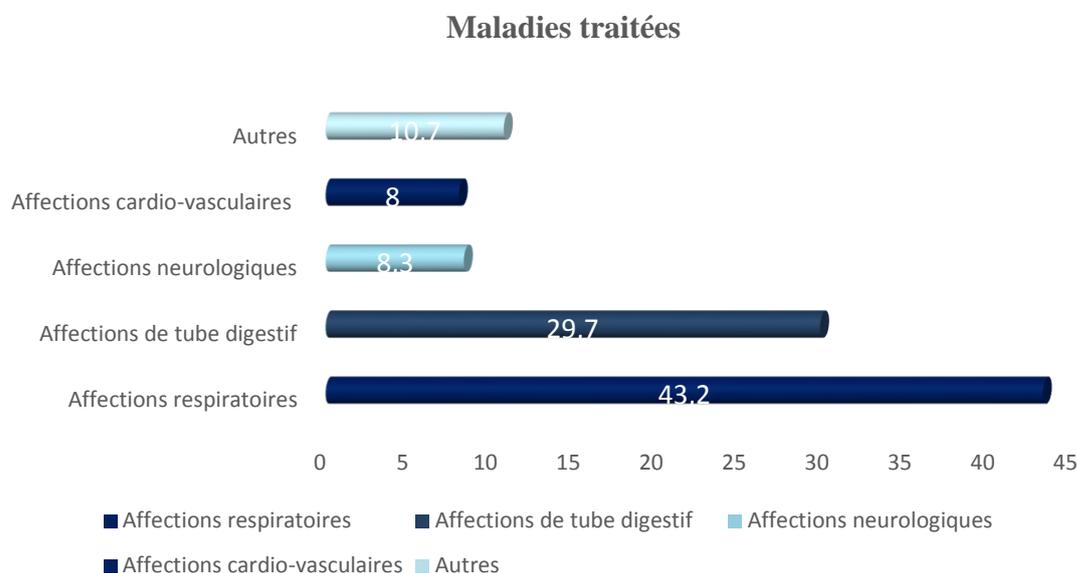


Figure 29 : Pathologies traitées par la plante étudiées dans la région de Saïda.

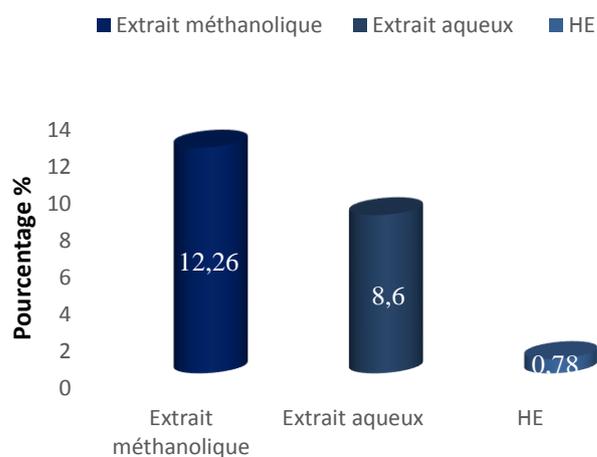
Les résultats de cette étude nous permis de noter que la plante est utilisée principalement pour le traitement des maladies respiratoires avec un pourcentage de 43.2% (voir Figure 29). Elle est également exploitée contre les affections du tube digestif dans 29.7% des cas. Le pourcentage d'utilisation de la plante pour le traitement de l'affection neurologique est estimé à 8.3%. Dans 8% des cas la plante est utilisée pour des affections cardio-vasculaires. Nous constatons également que la plante a d'autre cas d'utilisation dans la région de Saïda (10.7%).

2. Rendements obtenus des extraits :

Les parties aériennes de *Mentha pulegium* sont soumises à une extraction par macération pour l'extrait méthanolique, infusion pour l'extrait aqueux et hydrodistillation par entraînement à la vapeur pour l'obtention de l'huile essentielle. Après l'évaporation à sec des extraits (méthanolique, aqueux) et la séparation de la phase huileuse nous avons pu caractériser ces extraits. La couleur, l'aspect et le rendement de chaque extrait par rapport au poids de la matière sèche sont présentés dans le **tableau18**.

Tableau 18 : Caractéristiques et rendement des extraits de la plante de *Mentha pulegium*

Extrait	Couleur	Aspect	Poids	Rendement (%)
Extrait méthanolique	verdâtre	visqueux	50g	12,26%
Extrait aqueux	Marron foncé	Pâteux	50g	8,6%
Huile essentielle	pâle	fluide	380g	0,789%

**Figure 30** : Rendement (%) des extraits de *Mentha pulegium*

Les résultats dans la figure 30 montrent que le rendement de l'extrait méthanolique est le plus élevé par un pourcentage de l'ordre de 12.26%. Ce rendement est similaire au rendement trouvé par **Brahmi et al. (2017)** et il est faible avec celui obtenu par **Bouhaddouda (2015)** qui égale à 24.87%. Nous avons eu rendement de 8,6% pour l'extrait aqueux qui est faible par rapport au rendement obtenu par **Medjekal (2016)** (16,8%). Nos résultats pour HE sont meilleurs par rapport avec ceux obtenus par **Sutour (2010)** (0,62%) et très faibles par rapport celui obtenu par **Abdelli et ses collaborateurs, (2016)** avec un rendement de 1,45%, **Agnihotri et al. (2005)** (2,6%), **Hmiri et al. (2011)** (3,30 %), et **Zekri et al. (2013)** (6,2%).

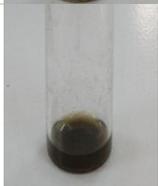
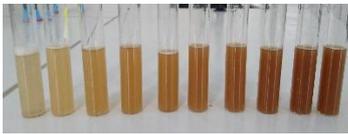
Cette différence pourrait s'expliquer par la différence entre l'origine de la plante (lieu et date de récolte et mode de séchage... etc).

3. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique au moyen des tests de coloration a permis de mettre en évidence les familles chimiques que renferme l'espèce étudiée. Nous résumons dans le **Tableau 19** les résultats obtenus. Ce tableau révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Tableau 19 : Résultat de la phytochimie qualitative des extraits (methanolique, aqueux) de *Mentha pulegium*

		Extrait methanolique	Extrait aqueux
Alcaloïde	Wagner	(+)	(+)
	Mayer	(+)	(+)
	Dragendrouf	(+)	(+)
Polyphénolique	Tanins	(+) tanins galliques	(+) tanins galliques
	Flavonoïde	(-)	(+)
	Anthocyane	(+)	(-)
Coumarines	(+)	(+)	

Quinone	(+)		(+)	
Composés Réducteur	(-)		(+)	
Stérols et triterpènes	(+)		(+)	
Saponine	(-)		(-)	

Le signe “+” traduit la présence du groupe de composés chimiques et le signe “-” l’absence du groupe de composés.

L’apparition du précipité indique l’existence des alcaloïdes dans la menthe pouliot. La coloration bleu-noirâtre bien marquée a prouvé la richesse de l’espèce en tanins galliques et l’absence du précipité rouge soluble indique que l’espèce est dépourvue des tanins catéchiques. La coloration rose orangée obtenue confirme la présence des flavonoïdes seulement dans l’extrait aqueux et l’acidification puis le virage de couleur à la couleur bleu en milieu basique, qui prouve la présence des anthocyanes, n’est obtenu que pour l’extrait méthanolique. La fluorescence marquée indique la présence des coumarines et les réactions étaient positives pour détecter des quinones, des composés réducteurs, des stérols et des triterpènes. Cependant, elle est dépourvue de saponine

Ces résultats sont en accord avec l’étude de **Kamkar et al. (2010)** concernant la présence des composés flavonoïdes, terpénoïdes et phénoliques à l’exception des saponines, et similaire à l’étude de **Zekri et al. (2013)**. Cette différence pourrait s’expliquer par la différence entre les méthodes d’extractions et la nature des solvants utilisées pour l’extraction.

4. Activité antioxydante des extraits de *Mentha pulegium* :

L'étude du pouvoir antioxydant a été réalisée par deux tests, la capacité antioxydante totale et l'activité antiradicalaire (piégeage du DPPH), dans le but de déterminer l'activité antioxydante des extraits méthanolique et aqueux de *Mentha pulegium*.

4.1. Capacité antioxydante totale :

La capacité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux est exprimée en nombre d'équivalents d'acide gallique à partir d'une courbe d'étalonnage ($Y = 0,0007x + 0,004$; $R^2 = 0,982$), établie en utilisant l'acide gallique comme référence (**Figure31**) (**Tableau 20**).

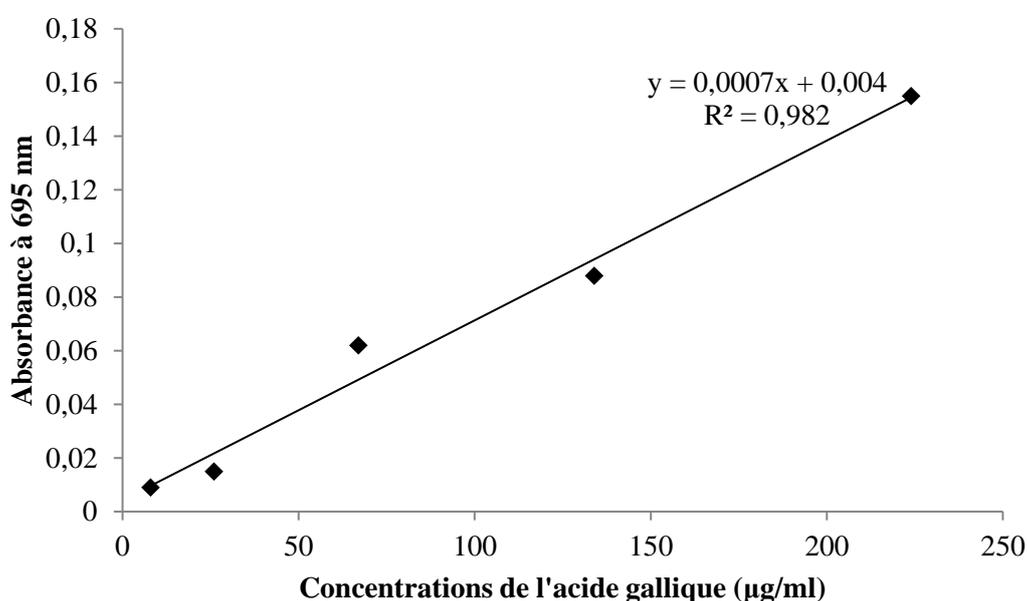


Figure 31 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour la mesure de la capacité antioxydante

Tableau 20 : Capacité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de *Mentha pulegium*

Extrait	Concentration	Capacité antioxydante totale
Extrait méthanolique	500mg/ml	201,08 mg EAG/g MS
Extrait aqueux	500mg/ml	44,13 mg EAG/g MS

D'après les résultats obtenus dans le **tableau 20**, l'estimation de la capacité antioxydante totale des extraits a montré une variabilité en fonction de la nature de l'extrait.

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante totale des extraits méthanolique et aqueux de cette espèce. Pour celle il est difficile, voire impossible de comparer nos résultats avec les travaux antérieurs.

4.2. Activité antiradicalaire (DPPH) :

L'activité antioxydante des différents extraits de la plante et de l'acide ascorbique vis-à-vis le radical DPPH[•] a été évaluée par spectrométrie UV-visible en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires.

Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait. D'après les résultats représentés dans la **figure 33** et la **figure 34**, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le standard (l'acide ascorbique) **figure32** ou pour les différents extraits de la plante.

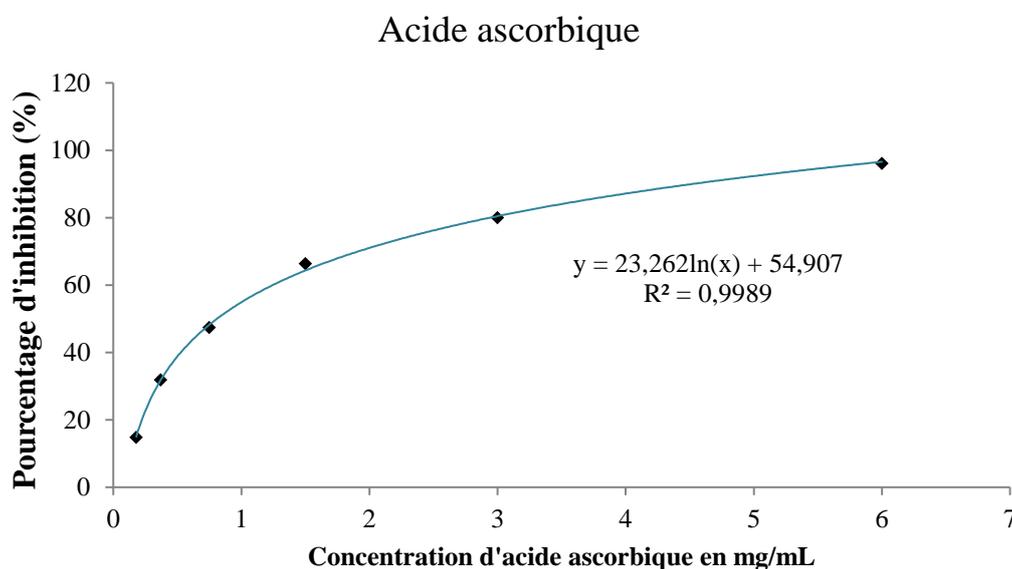


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH[•] en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique

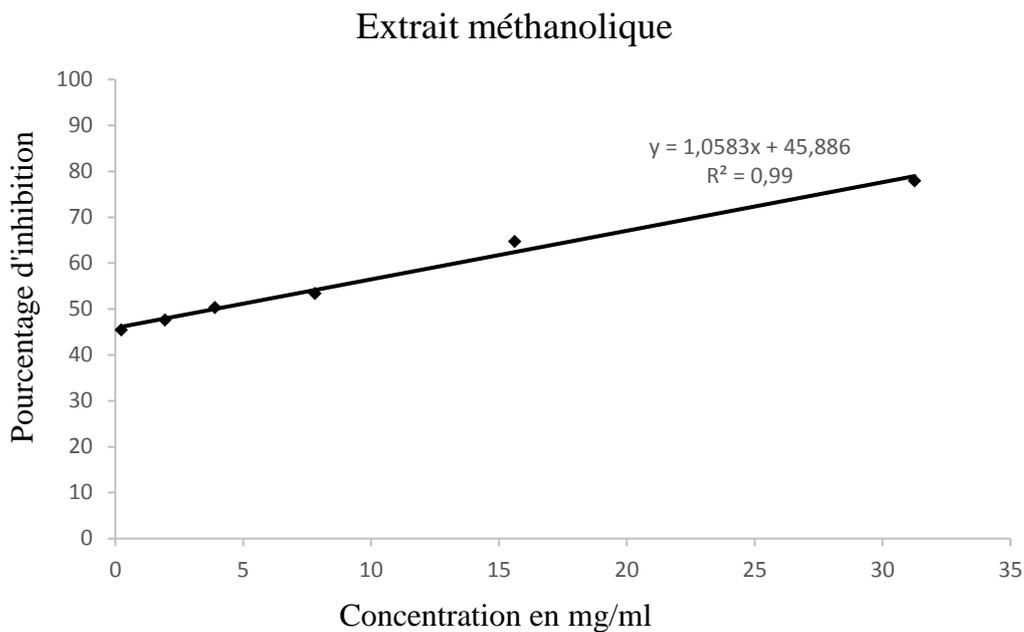


Figure 33 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• de l'extrait méthanolique testé (chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD).

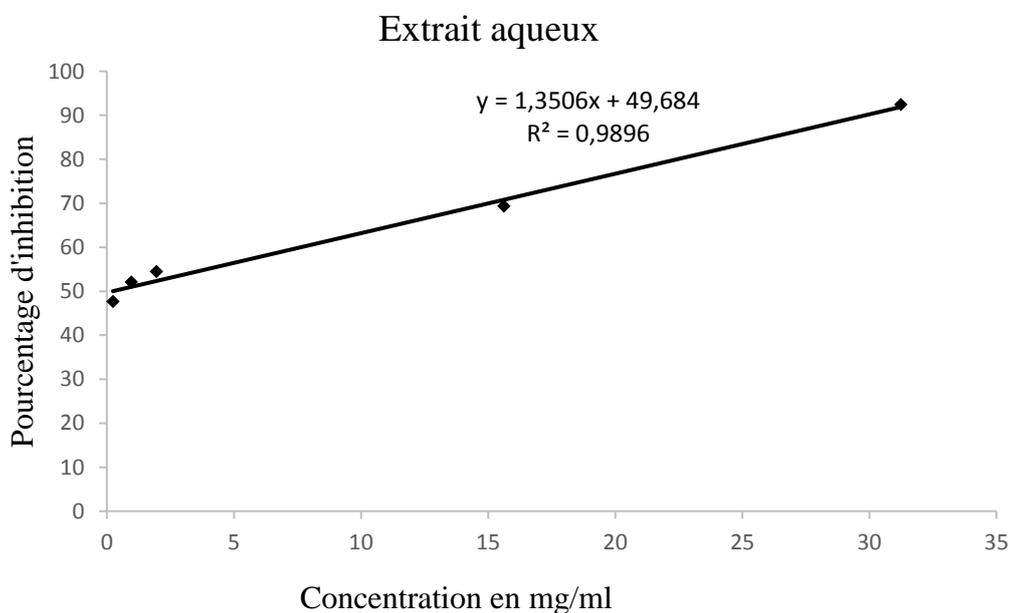


Figure 34 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• de l'extrait aqueux testé (chaque valeur représente la moyenne de deux essais \pm SD).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité anti-radicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC_{50} , qui est défini comme la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Dans notre travail, nous avons utilisé le paramètre IC_{50} pour déterminer le pouvoir antioxydant de nos extraits. En plus, l'acide ascorbique est utilisé comme référence puisqu'il est connu par son activité antioxydante la plus élevée. Les résultats sont représentés dans le **Tableau 21** ci-dessous. Plus la valeur de la IC_{50} est basse plus l'activité antioxydante est élevée.

Tableau 21 : le pouvoir antioxydant (exprimé par IC_{50} (en mg /ml)) des antioxydants de références et des extraits testés

	IC_{50} en mg/ml
Acide ascorbique	0,81
Extrait méthanolique	3,88
Extrait aqueux	0,23

Le témoin utilisé (acide ascorbique) montre un pouvoir antioxydant élevé avec une valeur d' IC_{50} de 0,81 mg/ml. Parmi les deux extraits de notre plante, la valeur de la concentration moyenne d'inhibition à 50% de l'extrait aqueux est la plus faible (0,23 mg/ml), correspondant à la capacité antiradicalaire la plus importante. L'extrait méthanolique (3,88 mg/ml) présente la valeur d' IC_{50} la plus élevée, ce qui correspond à l'activité antiradicalaire la moins importante.

Les résultats de l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique montrent une activité antioxydante supérieure par rapport à celle de **kamkar et al. (2010)** (5,5 ; 6,1 mg/ml). **Bouhaddouda (2015)** a trouvé une valeur d' IC_{50} de l'extrait aqueux (0,22 mg/ml) similaire avec le résultat de notre travail. Concernant l'extrait méthanolique notre résultat est très faible par rapport aux résultats de **Bouhaddouda, (2015)** (0,24 mg/ml) et de **Benabdallah, (2017)** (0,25 mg/ml).

Cette différence pourrait s'expliquer par la différence entre les méthodes d'extractions et de la différence entre l'origine de la plante (lieu et date de récolte et mode de séchage...etc).

5. Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et les extraits (méthanolique et aqueux) de *Mentha pulegium* vis-à-vis des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et des levures a été

évaluée qualitativement et quantitativement par l'apparition des zones d'inhibition, de la CMI et de la CMB. Les résultats sont présentés dans les **tableaux 22, 23, 24 et 25**. Les diamètres des zones d'inhibition formées par ces extraits indiquent qu'ils présentaient une activité considérable contre les microorganismes enquêtés (**Tableau 15**).

5.1. Méthode de diffusion en milieu solide :

L'étude de pouvoir antimicrobien a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose. C'est un test préliminaire et qualitatif.

Le tableau suivant **tableau 22** représente les résultats de l'extrait méthanolique.

Tableau 22 : Diamètres d'inhibition obtenus par l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium*

Diamètre des zones d'inhibition en mm									
Concentration (mg/ml)	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	T
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	10	9	8	7	6	6	6	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	10	9	8	8	7	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10	7	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	10	8	7	7	6	-	-	-
<i>Salmonella Typhimirium</i>	11	10	7	7	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	32,5	20	20	25	-	-	10	16,2	-
<i>Candida albicans</i> ATCC IP444	15	14	12	10	8	6	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	37,5	12,5	20	25	15	20	20	15	-

(-) : aucune inhibition

Les diamètres des zones obtenus de l'extrait méthanolique varient de 06 mm jusqu'à 37,5 mm. Les deux souches *C. albicans* ATCC 10231 (37,5 à 15mm) et *C. albicans* ATCC 26790 (32,5 à 16,2mm) étaient les plus sensibles (de 100 mg/ml à 0,78 mg/ml) par l'extrait méthanolique

de la menthe pouliot, suivie de *C. albicans* ATCC IP444 (15 à 6 mm) (de 100 mg/ml à 3,12 mg/ml).

Cependant, l'activité antimicrobienne a montré une sensibilité de *S. aureus* (11 à 6 mm) (100 mg/ml à 0,78mg/ml), *S. Typhimirium* (11 à 7 mm) (100mg/ml à 12,5mg/ml), *B. cereus* (10 à 7 mm) (100mg/ml à 6,25mg/ml), *E. coli* (10 et 7 mm) (100mg/ml et 50mg/ml) et *P. aeruginosa* (9 à 6 mm) (100mg/ml à 3,12mg/ml). Cependant, il n'a aucun effet sur la souche *L. monocytogenes*.

Les photos de la Figures35 illustrent les zones d'inhibition pour l'extrait méthanolique.

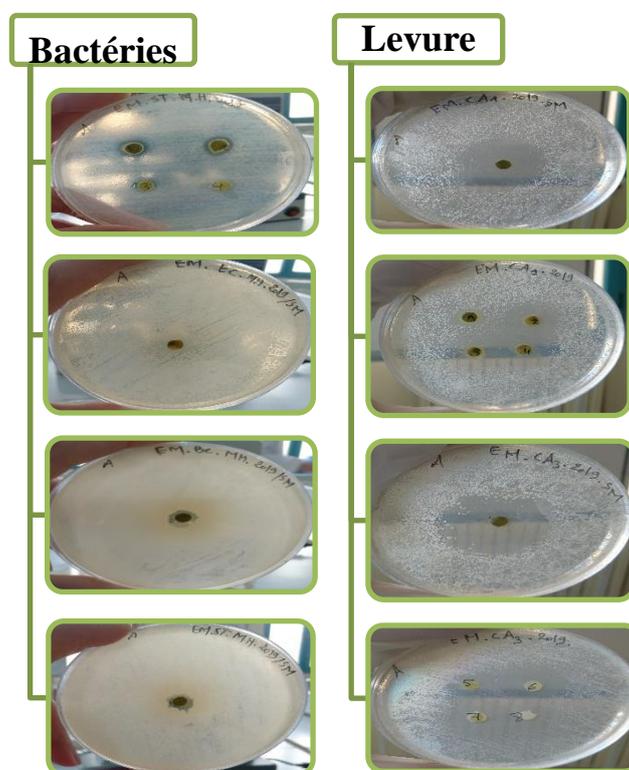


Figure 35 : Photos montrant des zones d'inhibition de la croissance bactérienne

Les résultats de l'extrait aqueux sont représentés dans le **tableau 23**.

Tableau 23 : Diamètres d'inhibition obtenus par l'extrait aqueux de *Mentha pulegium*

Concentration (mg/ml)	Diamètre des zones d'inhibition en mm								
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	T
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	8	8	7	8	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC IP444	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : aucune inhibition

Pour notre extrait aqueux nous avons constaté pratiquement une absence totale d'inhibition pour toutes les souches bactériennes et les levures sauf la souche *S. aureus* qui était la seule souche sensible à l'extrait aqueux avec une faible activité.

Le **Tableau 24** représente les résultats obtenus des huiles essentielles de *Mentha pulegium*.

Tableau 24 : Diamètres d'inhibition obtenus par l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

Concentration (mg/ml)	Diamètre des zones d'inhibition en mm								
	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	T
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	8	10	7	7	7	7	8	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10	7	8	7	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	8	7	7	7	7	-	-	-
<i>Salmonella Typhimirium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	9	8	7	7	7	9	7	8	-
<i>Candida albicans</i> ATCC IP444	8	10	8	11	8	7	7	10	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11	10	9	8	8	7	8	7	-

(-) : aucune inhibition

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour l'HE varient de 07 mm jusqu'à 11mm. La souche *C. albicans* ATCC 10231 (7 à 11mm) était la plus sensible aux concentrations de 100mg/ml à 0,78mg/ml, suivit par *S. aureus* et *E. coli* (7 à 10 mm) aux concentrations de 100mg/ml à 12,5mg/ml, puis *P. aeruginosa* (7 à 8) (100mg/ml à 6,25mg/ml). Nous avons remarqué une absence totale d'un effet de l'HE vis-à-vis *L. monocytogenes* et *S. Typhimirium* à la concentration 100 mg/ml. La souche *E. coli* présente une sensibilité traduite par une zone d'inhibition de 7mm.

Nous pouvons conclure que l'extrait méthanolique de notre plante a une forte activité antimicrobienne vis-à-vis les levures et les souches bactériennes avec un diamètre d'inhibition considérable, suivi par l'HE avec une modeste activité. En revanche, l'extrait aqueux n'a aucun

effet. On trouve toujours pour chaque essai que le diamètre d'inhibition est proportionnel à la concentration en extraits.

Les résultats obtenus par l'extrait méthanolique peut être expliqués par la présence des flavonoïdes dans cet extrait (**Schroeter et al., 2002**).

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *M. pulegium* a été évaluée par **Hajlaoui et al. (2009)**, où aucune activité antibactérienne n'a été notée pour l'extrait. Contrairement à nos résultats qui être en accord aux résultats de **Barchan et al. (2015)**.

Nos résultats concordent avec ceux rapportés par **Barchan et al. (2015)** et **Teixeira et al. (2011)** pour l'absence de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux.

Ces résultats sont en accord avec les précédents rapports de **Boukhebt et al. (2011)** sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la menthe pouliot. Cependant cette huile n'a présenté aucune activité sur *Pseudomonas aeruginosa*, contrairement à nos résultats. **Hajlaoui et al. (2009)** ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* de Tunisie présentait une grande activité antibactérienne avec des diamètres d'inhibition de 10 à 31 mm. Aussi dans l'étude d'**Abdelli et al. (2016)**, l'huile essentielle générant une inhibition importante contre une gamme de bactéries, à l'exception de *P. aeruginosa*.

Selon les résultats obtenus, il est possible de conclure que l'extrait méthanoliques de *M. pulegium* a un grand spectre d'activité antibactérienne, contrairement aux huiles essentielles et l'extrait aqueux.

5.2. Méthode de microdilution :

La CMI et la CMB, CMF des extraits de *Mentha pulegium* sont déterminées grâce à la technique de dilution en série en milieu liquide vis-à-vis de 06 souches de bactéries et 03 souches de levures. Les résultats montrent que les CMI de la plante *Mentha pulegium* sont variables selon l'extrait utilisé.

Les résultats de l'évaluation des CMI et CMB sont résumés dans le **tableau 25**.

Selon les valeurs de la CMI exprimé en mg/ml, les résultats ont été appréciés comme suit :

- ✓ Pas sensible (-) pour une valeur comprise entre 50.0 et 25.0 mg/ml,
- ✓ Moyennement sensible (+) pour une valeur comprise entre 12.5 et 3.0 mg/ml,
- ✓ Sensible (++) pour une valeur comprise entre 2 et 0.4 mg/ml
- ✓ Et extrêmement sensible (+++) pour une valeur égale ou inférieure à 0.2 mg/ml (**Bouhaddouda, 2015**).

Tableau 25 : CMI et CMB des extraits de *Mentha pulegium*

	CMI		CMB	
	EM	HE	EM	HE
Les souches	EM	HE	EM	HE
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,78	3,125	1,56	ID
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,25	50	6,25	ID
<i>Bacillus cereus</i>	3,125	12,5	6,25	25
<i>Escherichia coli</i>	1,56	50	3,125	ID
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,25	ID	ID	ID
<i>Salmonella Typhimirium</i>	1,56	50	1,56	ID
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	6,25	6,25	6,25	12,5
<i>Candida albicans</i> ATCC IP444	ID	1,56	ID	3,125
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6,25	6,25	6,25	12,5

EM : extrait méthanolique, HE : huile essentielle, ID : indéterminé

Ces résultats indiquent que l'utilisation de la méthode de microdilution pour déterminer la CMI pourrait révéler des valeurs plus faibles, car les concentrations obtenues avec la méthode de diffusion sur disque permettaient de réduire la population bactérienne

La souche la plus sensible à l'extrait méthanolique est *S. aureus* avec une CMI de 0,78 mg/ml et une CMB de 1,56 mg/ml, suivis par *S. Typhimirium* avec une CMI de 1,56 mg/ml et une CMB de 3,125 mg/ml et *E. coli* avec une CMI équivalente de CMB (1,56 mg/ml).

L'extrait méthanolique a révélé une activité modérée contre *L. monocytogenes* (CMI égal CMB : 6,25 mg/ml) et *B. cereus* (CMI : 3,125 mg/ml et CMB : 6,25 mg/ml). Alors que *P. aeruginosa* (CMI : 6,25 mg/ml et CMB : indéterminé), *C. albicans* ATCC 26790 et *C. albicans*

ATCC 10231 (CMI similaire à CMB : 6,25 mg/ml) sont moyennement sensibles. Par contre *C. albicans* ATCC IP444 est résistante.

Aussi, l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* ATCC IP444 était la plus sensible avec une CMI de l'ordre de 1,56 mg/ml et une CMB de 3,125 mg/ml, suivi par *S. aureus* avec une CMI de 3,125 mg/ml et une CMB indéterminé. Nous avons remarqué une activité modérée pour *C. albicans* ATCC 26790 et *C. albicans* ATCC 10231 ont la même CMI (6,25 mg/ml) et la même CMB (12,5 mg/ml). En revanche *L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. Typhimurium* sont pas sensibles et *P. aeruginosa* est résistante.

Selon **Hajlaoui et al. (2009)** les valeurs de CMI et de MBC des souches bactériennes sensibles à l'huile essentielle de *Mentha pulegium* à des concentrations de (0,625–2,5 mg / ml) et (0,078–0,625 mg / ml) nos résultats sont des concentrations faibles par rapport aux ces résultats. Les concentrations minimales inhibitrices obtenues varient selon l'espèce testée et le microorganisme traité (**Zekri, 2017**).

5.3. Activité antifongique :

Les résultats de l'activité antifongique d'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* testés sur quatre moisissures (**Tableau 15**) sont représentés dans le **Tableau 26** et la **Figure 36**. Ces résultats sont enregistrés par le pourcentage d'inhibition antifongique noté pour chaque concentration d'extrait.

Tableau 26 : pourcentage d'inhibition de différentes concentrations d'extrait méthanolique de *Mentha pulegium*

Concentration µl/ml	1	2,5	5	7,5	10
<i>Endosporium spp</i>	10,00	20,00	30,00	30,00	50,00
<i>Phytophthora infestans</i>	38,10	42,86	52,38	52,38	61,90
<i>Aspergillus niger</i>	0,00	20,00	40,00	40,00	52,00
<i>Penicillium spp</i>	4,00	12,00	24,00	44,00	48,00

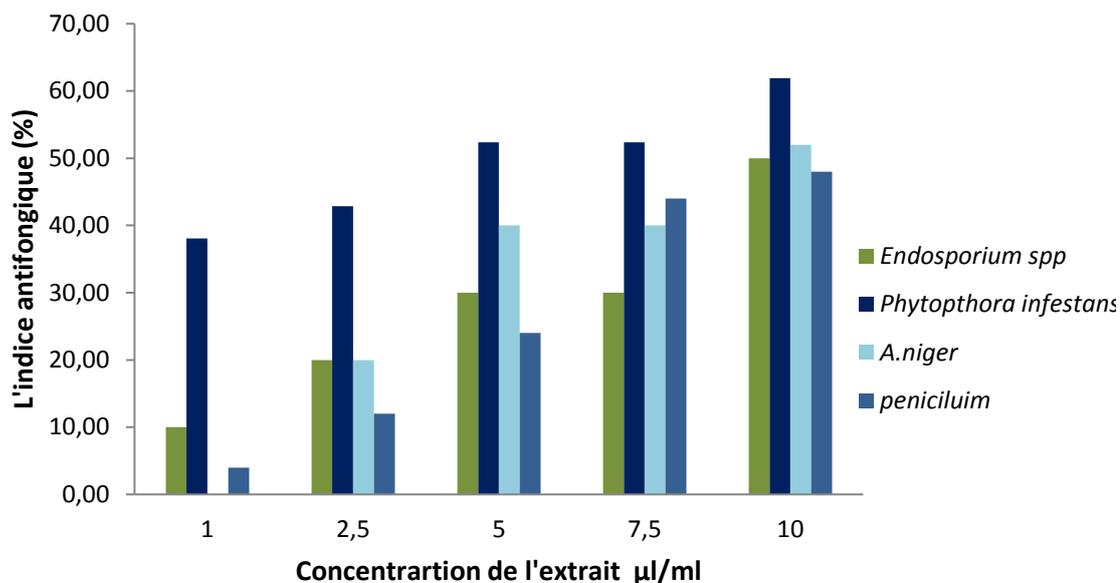


Figure 36 : Pourcentages d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* à 1 µl/ml est inefficace contre la souche *Aspergillus niger*. Par contre, la concentration 10 µl/ml a réduit significativement la croissance des souches fongiques, notamment *Phytophthora infestans* avec un pourcentage d'inhibition de 61.90% suivi par *Aspergillus niger* avec 52%.

Endosporium spp et *Penicillium spp* ont été moins sensibles à l'extrait avec un maximum d'inhibition de 50% et 48% pour la concentration de 10µl/ml, respectivement.

Notant qu'en général, le diamètre des mycéliums diminue considérablement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique.

L'extrait méthanolique de la menthe pouliot a été étudié par **Bouhaddouda, (2015)**, et son activité sur la souche *Aspergillus sp* a montré un fort pouvoir antifongique avec un pourcentage d'inhibition égal à 100% aux concentrations de 2 mg/ml et 1.5 mg/ml, *Fusarium sp* a été moins sensible à l'extrait. D'après **Hajlaoui et al., (2009)** l'huile essentielle a un spectre d'activité antifongique plus large que celui de l'extrait de méthanol de *Mentha pulegium* mais avec une faible activité vis-à-vis des moisissures.

6. Mécanisme d'action de l'extrait méthanolique sur

Staphylococcus aureus :

6.1. La viabilité cellulaire :

Un test préliminaire nous a permis de choisir une durée de contact d'une heure pour l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium*. Le traitement de *S. aureus* par l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* à différentes concentrations, montré une réduction de pourcentage de nombre de colonie de 7,5% à 1,7% en fonction de la concentration.

A toutes les concentrations utilisées, l'extrait méthanolique a donné un nombre limité de cellules viables de la souche *S. aureus* par rapport au témoin. Les résultats de cette vérification (**Figure 37**) confirment l'effet bactéricide de cet extrait.

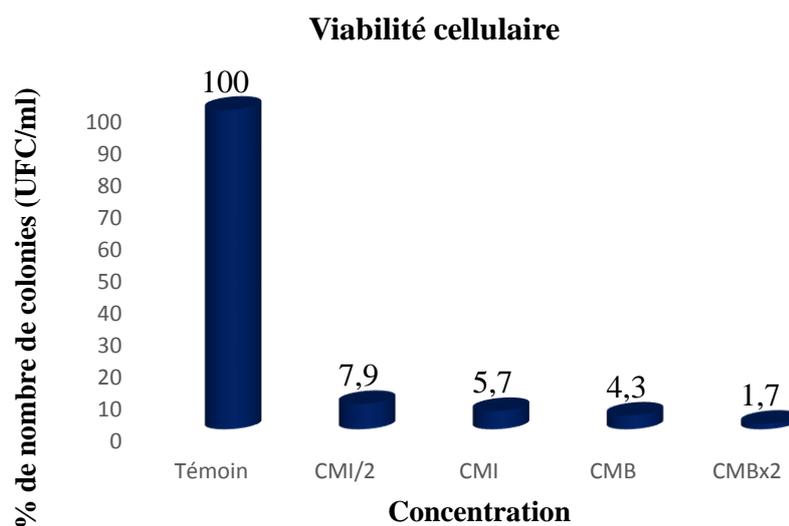


Figure 37 : les résultats de test de la viabilité cellulaire à différentes concentrations d'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* vis-à-vis les cellules de *staphylococcus aureus* en milieu neutralisateur.

Le traitement de *S. aureus* par l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* à la concentration de 1,56 mg/ml pendant 20 minutes, Cet effet a été évalué par la mesure du la réduction de nombre UFC par millilitre au cours de temps, ces résultats sont indiqués dans la **Figure 38**.

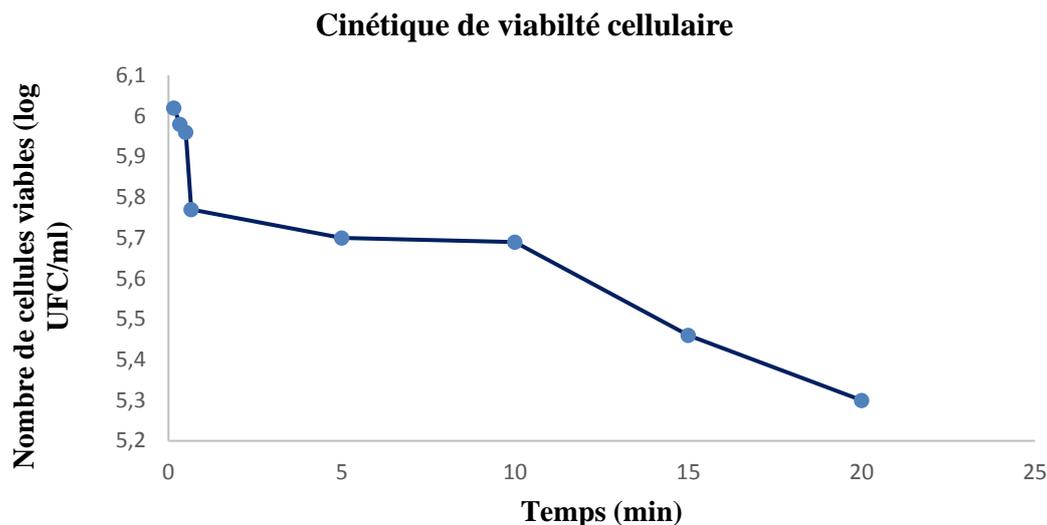


Figure 38 : Effet de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* à la CMB sur la viabilité cellulaire chez *S. aureus* pendant 20 minutes

Ces résultats montrent un effet inhibiteur intéressant de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* sur la viabilité des cellules de *S. aureus* durant 0 minutes et jusqu'à 20 minutes.

En ce qui concerne l'effet bactéricide, il y a une perte de la viabilité des bactéries dès les premières minutes de contact avec l'extrait et augmenter au cours de temps. La courbe de la viabilité cellulaire a également montré une relation claire entre le taux d'inhibition, la concentration de l'extrait et la durée d'exposition.

6.2. Tolérance au sel :

Les résultats de test de tolérance au sel de la souche *S. aureus* après l'exposition aux concentrations de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* est révéler dans la **Figure 39**.

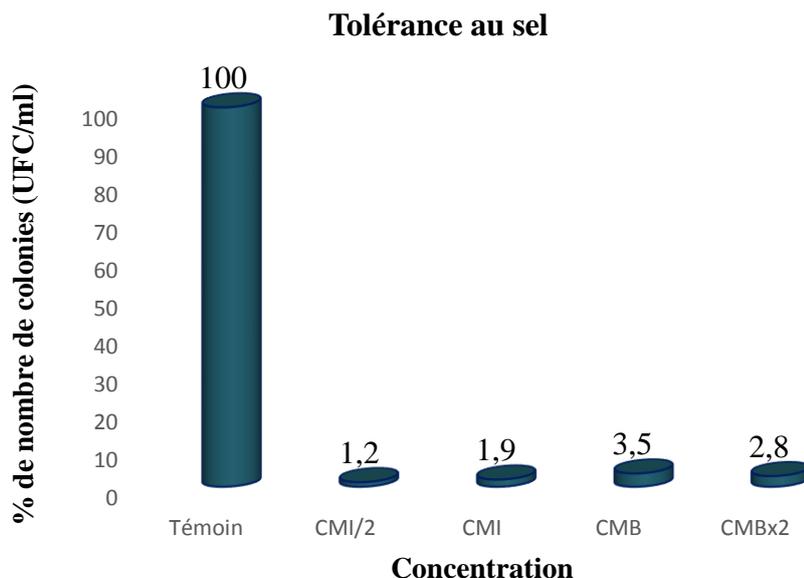


Figure 39 : les résultats de test de tolérance au sel à différentes concentrations d'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* vis-à-vis les cellules de *S. aureus* en milieu GN-NaCl

Nos résultats montrent que l'addition de l'extrait diminue la capacité des cellules traitées de former des colonies. Les propositions des cellules capables de former des colonies sur GN-NaCl ont été déterminées après 60 minutes d'incubation. Dans ce traitement nous avons observé une réduction de la capacité de cette souche à former des colonies rappelant que *S. aureus* est une souche halophile. On constate que l'extrait méthanolique a inhibé la résistance de cette souche au sel. La perte de la tolérance révèle des dommages à la membrane dans les cellules.

6.3. Activité des lipases :

L'incubation des cellules avec des concentrations différentes de l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* durant de 60 minutes sur le milieu de Agar Salty Tween (AST), ce milieu est riche en acides gras et les lipides, *S. aureus* pour croître dans ce milieu il faut sécréter les lipases pour dégrader les acides gras et les lipides. Donc l'effet de l'extrait méthanolique de la plante *Mentha pulegium* sur l'activité de lipases de la souche *S. aureus* est exprimé par l'absence des colonies sur le milieu. Ces résultats sont présentés dans la **Figure 40**.

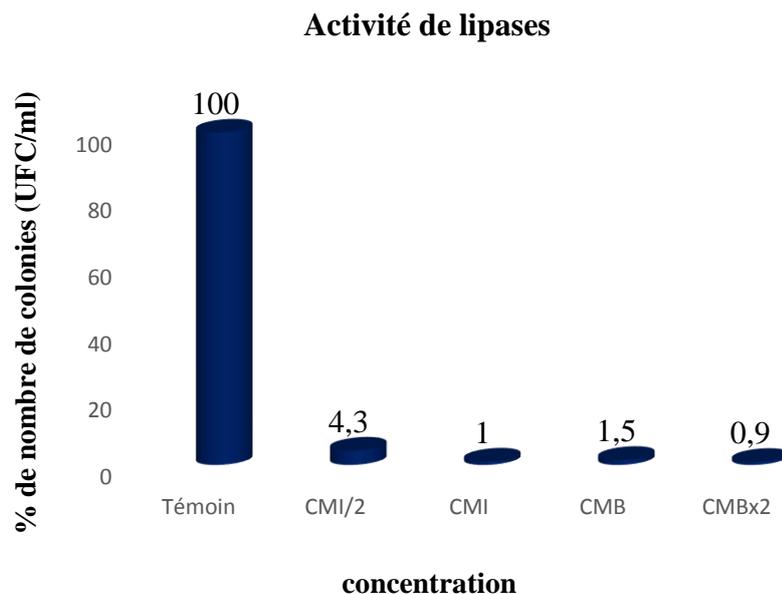


Figure 40 : les résultats de test de l'activité de lipase à différentes concentrations d'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* vis-à-vis les cellules de *S. aureus* en milieu AST

L'extrait méthanolique à la concentration 3,125 mg/ml a induit une inhibition de la croissance de la souche *S. aureus* dans cette concentration on observe seulement 0,9% de nombre de colonie, qui exprime la forte activité de cet extrait, et avec la décroissance des concentrations nous avons remarqué une augmentation dans la croissance. Pour cela nous avons pu conclure que cet extrait a un effet sur l'inhibition de la synthèse des lipases ou l'inhibition de leur activités.

Les résultats obtenus par cette étude montrent le potentiel biologique élevé d'extrait méthanolique de la plante *Mentha pulegium*, en particulier l'antibactérien, spécifiquement contre la souche *Staphylococcus aureus*.

7. Cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes :

Le pouvoir hémolytique a été évalué en utilisant les globules rouges humains comme modèle universel et les résultats obtenus sont exprimés en terme de pourcentages d'hémolyse ; fuite d'hémoglobine intracellulaire, en fonction de temps, et les résultats rapporté dans les **Figure 41, 42, 43**. Les concentrations finales sont choisies selon les CMI obtenues par la méthode des micro-dilutions vis-à-vis les souches testées.

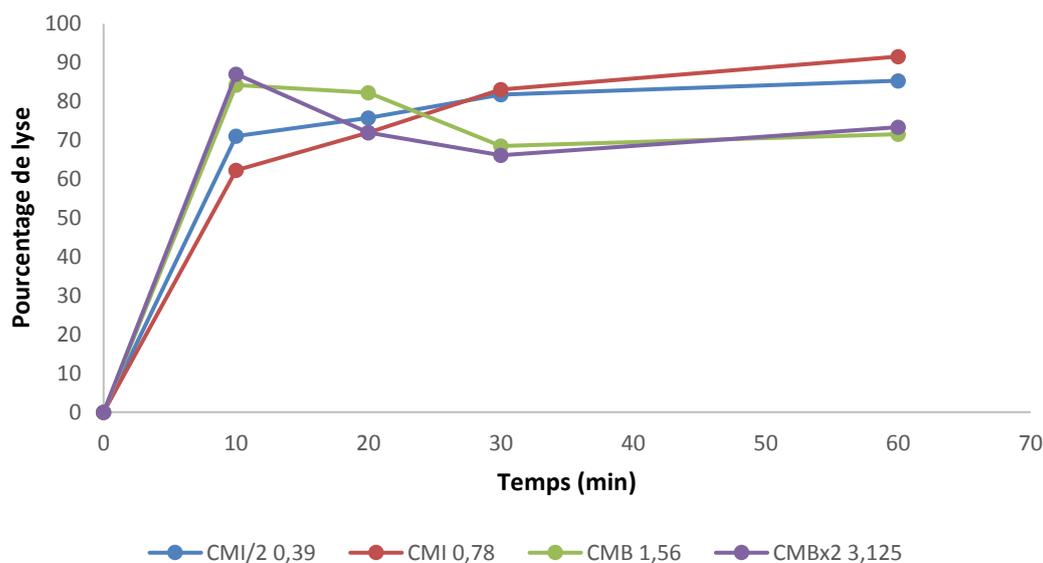


Figure 41 : Cytotoxicité de l'extrait méthanolique d'*Mentha Pulegium* vis-à-vis les globules rouges humains.

En examinant les résultats illustrés dans la courbe de la **Figure 41**, nous constatons que l'hémolyse maximale (87,05%) est obtenue à la concentration (3,25 mg/ml) après 10 min, cette concentration est considérée comme étant la plus toxique vis-à-vis des globules rouges. En revanche, l'hémolyse minimale (62,26%) est obtenue à la concentration de 0,78 mg/ml au même temps de l'hémolyse maximale. Le pourcentage d'hémolyse à 10 min d'incubation est signalé de 84,22% et 71,04% pour les concentrations 1,56 et 0,39 mg/ml respectivement.

Les résultats d'extrait aqueux vis-à-vis les érythrocytes sont représentés dans **figure 42**.

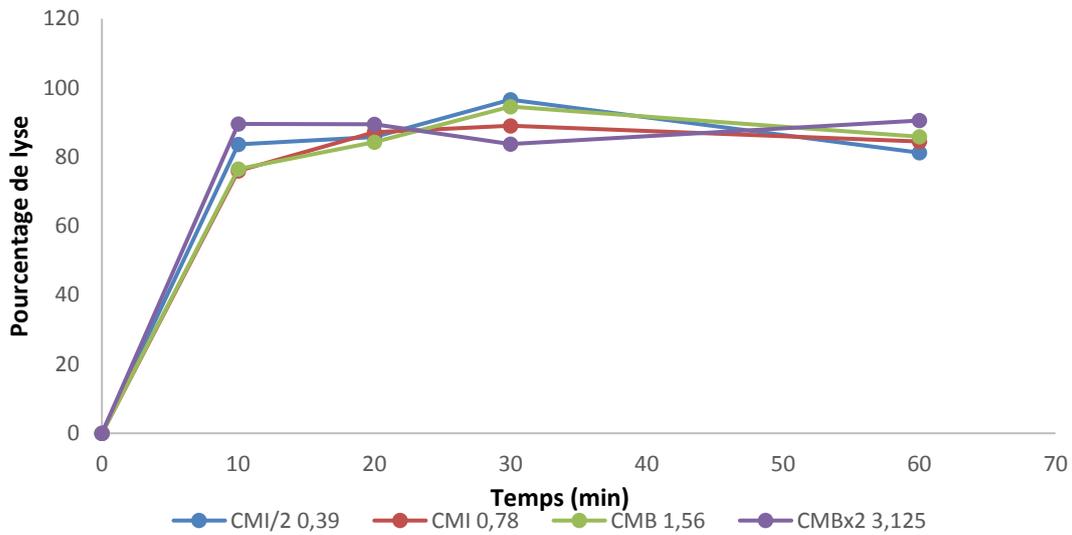


Figure 42 : Cytotoxicité de l'extrait aqueux de *Mentha Pulegium* vis-à-vis les globules rouges humains.

La courbe mentionnée dans la **Figure 42** nous a montré que le pouvoir hémolytique de l'extrait aqueux à 10 min d'incubation est estimé par un taux d'hémolyse d'environ 90% (83,61%, 75,95%, 76,5%, 89,53%) pour les concentrations 0,39, 0,78, 1,56, 3.12 mg/ml respectivement.

La **figure 43** représente l'effet des huiles essentielles de la plante *Mentha pulegium* vis-à-vis les globules rouges humains.

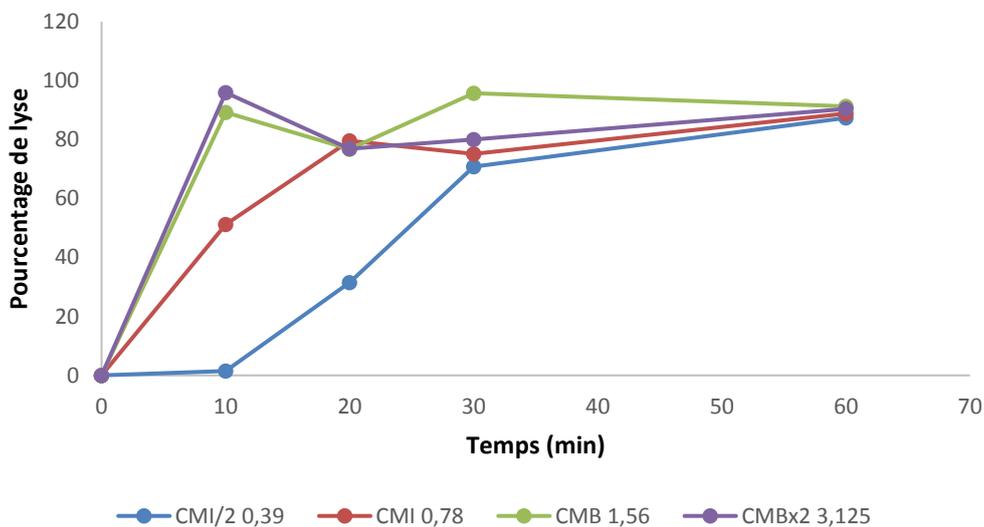


Figure 43 : Cytotoxicité de l'huile essentielle de *Mentha Pulegium* vis-à-vis les globules rouges humains.

Le pouvoir hémolytique évolue dans la concentration 0,39 mg/ml et 0,78 mg/ml en fonction du temps entre 1.51 % et 88.85 %. L'hémolyse minimale de 1.51% est obtenue à la concentration 0,39 mg/ml après 10 min dans l'HE de la plante étudiée. Tandis que la plus grande valeur d'hémolyse de 95,74 % a été obtenue à la concentration 1,56 mg/ml après 30 min est considérée comme toxique vis-à-vis des globules rouges. La concentration de 1,56 mg/ml a provoqué une lyse à 89,25%.

Les résultats obtenus montrent que les pourcentages d'effet hémolytique d'extrait méthanolique de la plante *Mentha pulegium* sont directement proportionnels à l'augmentation de concentration d'extraits en fonction du temps.

Aucune étude n'a été réalisée sur la cytotoxicité des extraits notre plante *Mentha pulegium* c'est pour cela il est impossible de les comparer avec autre étude.

Conclusion générale

La phytothérapie peut constituer une médecine alternative ou au moins un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique. A l'heure actuelle, l'Algérie est un pays riche en termes de biodiversité, et l'usage des pharmacopées traditionnelles est encore une pratique bien vivante. Ces pharmacopées traditionnelles comportent des traitements pour soigner plusieurs pathologies et il est donc toujours d'actualité de penser que de nouvelles molécules puissent continuer à être isolées des plantes locales spontanées. Les plantes médicinales restent toujours une source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques et un grand nombre de plantes aromatiques possèdent des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans des divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Toutefois, les rendements des extraits qui ont été réalisés par trois méthodes macération, infusion et hydrodistillation permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés et de la méthode d'extraction. Alors que, l'extrait méthanolique était le plus fort à (12,26%) suivi par l'extrait aqueux à (8,6 %) et les huiles essentielles avait un rendement de (0,78%). Les résultats obtenus au cours de nos travaux de screening phytochimique de la plante *Mentha pulegium*, ont révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes, des composés réducteurs, des coumarines et des alcaloïdes.

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits (méthanolique et aqueux) de *Mentha pulegium* a montré que la capacité antioxydante total la plus élevée a été observée avec l'extrait méthanolique suit à la concentration de 500mg/m (201,08 mg EAG/g MS) par rapport à l'extrait aqueux (44,13mg/g MS). Alors que l'extrait aqueux a une forte activité anti radicalaire par rapport le témoin utilisé (acide ascorbique) et l'extrait méthanolique avec une IC50 de l'ordre de 0,23 mg/ml.

L'ensemble de nos résultats montre que le traitement des espèces fongiques testées par l'extrait méthanolique de *Mentha pulegium* avait un effet antifongique. Principalement, sur *Phytophthora infestans* avec un indice d'inhibition de 61,90%, ce qui le rend cette souche la plus sensible des souches étudiées. Cependant, les souches *Aspergillus niger* et *Penicillium spp* étaient les souches les plus résistantes vis-à-vis de l'extrait testé avec un indice de 0% et 4% à la concentration de 1µg/ml.

Par ailleurs, l'étude qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne de nos extraits de *Mentha pulegium* est avérée très intéressante. Du fait que nous avons obtenu un effet inhibiteur vis-à-vis les six souches bactériennes et les trois levures par la méthode de diffusion sur gélose. L'effet de cette plante a été défini sur la souche *Candida albicans* ATCC 10231 qui a montré une sensibilité vis-à-vis l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de 37,5 mm, également vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 26790 (32,5mm). Une modeste activité contre *Staphylococcus aureus* ATCC 11778 avec une zone de 11 mm par l'extrait méthanolique qui est considéré comme l'extrait le plus actif vis-à-vis les souches testées. Par contre, les huiles essentielles avaient une activité modérée. L'extrait aqueux n'a enregistré aucune activité vis-à-vis les souches utilisées. Les résultats obtenus indiquent que *Listeria monocytogenes* est la souche la plus sensible. Les CMI et CMB (CMF) ont été déterminées, par la méthode de micro-dilution, pour les trois extraits de la plante. De ce fait, le pouvoir antimicrobienne est relativement élevé, avec des CMI obtenues sont comprises entre 1,56 et 6,25 mg/ml et des (CMB et CMF) compris entre 1,56 et 12,25 mg/ml.

L'étude de la cytotoxicité de la plante *Mentha pulegium* nous a clairement montré que la plante avait une activité cytotoxique vis-à-vis les globules rouges humain avec un taux d'hémolyse atteint 95,74% en huile essentielle qui est considéré comme le plus cytotoxique des extraits étudiés.

L'extrait méthanolique sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a fourni un effet inhibiteur intéressant sur la viabilité cellulaire de cette souche, ainsi que sa capacité tolérance au sel et son activité de lipase.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans les différents extraits en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, et donc il est nécessaire de compléter ce travail par des études supplémentaires approfondies. Enfin, nous recommandons une culture des plantes médicinales pour permettre à la population d'avoir des médicaments et des denrées alimentaires moins chers et plus naturels et d'éviter la disparition de certaines espèces intéressantes.

Références bibliographiques

A. Barchan, M. Bakkali, A. Arakrak, A. Laglaoui. (2015). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de *Mentha*: *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*

A. Basli, M. Chibane, K. Madani, N. Oukil. (2012). 2–9. Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf.

A. Benabdallah. Thèse En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. (2017). Etude écophysiological, développement et importance des plantes médicinales du genre *Mentha* dans le Parc National d'El-Kala (Nord-Est Algérie)

A. B.Haj Khalifa. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation

A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini, N. Dakka. (2017). 10298-017-1118. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries

A.Lamharrar, C.Sidi Ethmane Kane, A.Idlimam, S.Akkad, M. Kouhila, A.Mimet, M.Ahachad. (2007). 978-2-9511591-6-7. Détermination expérimentale des isothermes de sorption et de la chaleur isostérique des feuilles d'absinthe et de menthe pouliot

A. Kamkar, A.Jebelli Javan, F.Asadi, M.Kamalinejad(2010) 1796–1800. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil

A.Meriem, M.Houria, A.Assia, M.Rachida. (2016). 197–205. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities

B.Teixeira, A. Marques, Ramos, I.Batista, C.Serrano, O. Matos, N.R. Neng, M.F. Nogueira, J.A.Saraivab, M.L.Nunes. (2012). 81–87. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil

B. Nabila. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. (2016). Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*

B. Mourad. Thèse En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat. (2014). Caractérisation phénotypique et moléculaire des salmonelles isolées à partir des aliments et d'origine humaine responsables de gastro-entérites

B. bouguerne. Thèse de doctorat. (2012). conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose)

C. Balière. (2017). Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC

C. Dauga, J.Dore, A.Sghir. (2005). 290-6. La diversité Insoupçonnée du monde microbien

CH.Ourdia. Thèse de doctorat. (2012). composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhizaglabra

C. Iays. Thèse de doctorat. (2012). ARN régulateurs de *Staphylococcus aureus* :

Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, Niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014), performance Standards for antimicrobial Disk susceptibility tests: approved standard, National committee for clinical laboratory standard. Wayne, Pa, USA, 11th edition.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014)b Methods for Dillution antimicrobial succceptiltiy tests for bacteria that Grow aerobically, Approved standard, National Committee for clinical laboratory standards, Wayne ,Pa , USA 9th edition .

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

D. Ourain, A. Agoumi, M. Ismaili-Alaoui, K. Alaoui, Y. Cherrah, M.A. Alaoui, M.A. Belabbas. (2007).6-14. Activite' antifongique de l'acide ole'ique et des huiles essentielles de Thymus saturejoides L. et de Mentha pulegium L., comparee aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques

D. Ouraïni, A.Agoumi,M. Ismaïli-Alaoui, K.Alaoui,Y. Cherrah,M.Amrani, M.-A. Belabbas.(2005). 147-157. Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes

E. Guinoiseau. Thèse de doctorat. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action

E.Dumas. Thèse de doctorat. (2012). *Listeria monocytogenes* : Caractérisation fonctionnelle d'un mutant ferritine. Etude de la biodiversité par une approche protéomique

F.Brahmi, F.Dahmoune, N.Kadri, M.Chibane, S.Dairi, H.Remini, S.O.Bensidhoum, L.Mouni, Kh.Madani. (2017).20160064. Antioxidant capacity and phenolic content of two Algerian *Mentha* species *M. rotundifolia* (L.) Huds, *M. pulegium* L., extracted with different solvents

F.Brahmi, D.Hauchard, N.Guendouze, K.Madani, M. Kiendrebeogo, L.Kamagaju, C.Stevigny, M.Chibane. (2015). 01165427. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae)

F. Chambard. (2009). 00592196. Les candidoses cutanéomuqueuses : physiopathologie et conseils à l'officine

H. Hadjlaoui, T. Najla, N. Emira, S. Mejdi, F. Hanen, K. Riadh, B. Amina, World J.

Biotechnol. Microbiol. (2009). Article in World Journal of Microbiology and Biotechnology ·

DOI: 10.1007/s11274-009-0130-3 Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine

H.Boukhebti, A.N.Chaker, H.Belhadj, F.Sahli1, M.Ramdhani, H.Laouef, D.Harzallah. (2011). 3 (4) 267-275. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils

H.Ghazghazia, A.Chedia, M.Abderrazak, H. Brahim. (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie

J.Pincemail, K.Bonjean, K. Cayeux, J.O.Defraigne. (2002) 233–239. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences

J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle. (2007). 628-638. Le stress oxydant

J.Odile, C.PASTRE. (2005). 3 – 4116. intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques

J.Luc Aboya Moroh. (2014). Resistance bacterienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*

J. R. Rabehaja. Thèse de doctorat. (2013). Production et analyse d'huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales de Madagascar. caractérisation par RMN ¹³C, CPD (IR) et CPD-SM

K. Riachi Foulla. Thèse de doctorat. (2014). Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie

K. Rhayour. Thèse de doctorat. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*

L. Pasquier, CH. Chuard. (2017). 1737-40. Infections à *Listeria monocytogenes*

L. Ryma. Thèse de doctorat. (2016). Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide

M. Chraïbi, K. Fikri-Benbrahim, M. Amrani, A. Farah, A. Bari, Z. Benziane Ouaritini. (2018). Etude ethnobotanique sur l'utilisation de *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* et *Pelargonium graveolens* au Nord du Maroc (Taounate) et évaluation de leur pouvoir antimicrobien

M. Uwineza, B. El Yousfi, A. Lamiri. (2018). Activités antifongiques *in vitro* des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, *Eugenia aromatica* et *Cedrus atlantica* sur *Fusarium culmorum* et *Bipolaris sorokiniana*.

M. Y.Hadi, I.Hameed, I. Ibraheem. (2017) 10.5958/0974-360X.2017.00648.5. *Mentha pulegium*: Medicinal uses, Anti-Hepatic, Antibacterial, Antioxidant effect and Analysis of Bioactive Natural Compounds: A Review

M.Mkaddem, M.Boussaid, N.Ben Fadhel. (2013). 37-41. Variability of Volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae)

M.Lawrence.(2006). 633.8'2. Mint The Genus *Mentha*

M.Samir, S.Imen, Gh.Mouloud, B.Laid, B.Hacène. (2016). Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale de la région de M'sila *Mentha pulegium* L.

M. Kamal Elmeskini. Thèse de doctorat. (2011). Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*

N.Salem, J.Sriti, O.Bachrouch, K.Msaada, S.Khammassi, M.Hammami, S.Selmi, E. Boushah, M.Ouertani, N.Hachani, M.Abderraba, B.Marzouk1, F.Limam1, J.M.Ben Jemaa. (2018). 8(4) : 207-216. Phenological stage effect on phenolic composition and repellent potential of *Mentha pulegium* against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*

N.Zekri, S.Amalich, A.Boughdad, M.A.El Belghiti, T.Zair. (2013) 2(4), 607-619. Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium L.* oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*

N. Benayad. Thèse de doctorat. (2013). Evaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines.Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse

N. Zekri. Thèse de doctorat. (2017). Etude phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium (L.)*, *M. suaveolens (Ehrh.)* et *M. spicata (L.)* du Moyen-Atlas Marocain

N. Ouis. Thèse de doctorat. (2015). Etude chimique et Biologique des huiles essentielles de coriandre de fenouillet de persil.

N. Commeau. Thèse de doctorat. (2013). Modélisation de la contamination par *Listeria monocytogenes* pour l'amélioration de la surveillance dans les industries agro-alimentaires

O.Louis Clément. Thèse de doctorat. (2009). Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines

Okoko T, Ere D. 2012. Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asia Pacific J Tropica Biomed.* 2:449–453.
Okwu DE. Phytochemicals and vitamin content of indigenous species of southeastern Nigeria. *J.Sustain. Agric. Environ*, 2004; 6(1): 30-37.

S. Yanisse. Thèse de doctorat. (2013). recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes aromatiques et médicinales en milieu solide :étude prospective à l'hôpital militaire avicenne de marrakech.

S. Laouami. Thèse de doctorat. (2012). Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : Rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex

S. D. Miszczycha. Thèse de doctorat. (2013). Croissance et survie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) en fonction des technologies fromagères mettant en oeuvre du lait cru.

S. Krief. Thèse de doctorat. (2004). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées

S.Rafika. Thèse Pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3ème cycle. (2015). Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes

S.Soukaina. (2013). Effet du repiquage de *pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques

S. Moja, F .Jullien. (2014). Les menthes, diversité des espèces et composition chimique

S. Hmiri, M. Rahouti, Z. Habib, B. Satrani, M. Ghanmi, M. El Ajjouri. (2011). p.824 – 836. Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de mentha pulegium et d'eugalyptus camaldulensis dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation

T. Chafika. Thèse de l'obtention du diplôme de Doctorat en Microbiologie Appliquée. (2017). Examen phytochimique et Pouvoir antimicrobien et anti-radicalaire des extraits de *Nepeta amethystina*(Gouzia) de la région d'Aïn Sefra (Algérie)

T. Mohamed. Thèse de doctorat. (2011). Typologie, cartographie des stations forestières et modélisations des peuplements forestiers. Cas des massifs forestiers de la wilaya de Saida (Algérie)

Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I. et Coulibaly, A. (2012). Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58 : 4234-4242.

V. Aoun. Thèse de doctorat. (2013). Développement de nouvelles formulations d'antifongiques et évaluation de l'activité sur *Candida spp* et *Aspergillus spp*

N. Qazi. (2005). 20: 607–610. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India

X. Lerverve. (2009). 44, 219—224. Stress oxydant et antioxydants? Oxidative, stress and antioxydants?

Y. Rolland. (2004). Antioxydants naturels végétaux

Annexes

✓ Annexe I : fiches d'enquête

الرمز		استجابات رقم	
معلومات عامة عن المستجوب			
السن	الجنس:	<input type="checkbox"/> ذكر	<input type="checkbox"/> أنثى
السكن (البلدية)			
الحالة العائلية	<input type="checkbox"/> أعزب	<input type="checkbox"/> متزوج	<input type="checkbox"/> أخرى
الحالة الاقتصادية:	<input type="checkbox"/> ضعيفة	<input type="checkbox"/> متوسطة	<input type="checkbox"/> جيدة
المستوى التعليمي:	<input type="checkbox"/> غير متمدرس	<input type="checkbox"/> ابتدائي	<input type="checkbox"/> متوسط
<input type="checkbox"/> ثانوي	<input type="checkbox"/> جامعي	<input type="checkbox"/> أخرى	
معلومات عامة عن النبات الطبي			
الإسم (أو الأسماء) الشعبي (العربي والقبائلي إن وجد)			
مصدر النبات	<input type="checkbox"/> محلي	<input type="checkbox"/> مستورد	<input type="checkbox"/> المكان بالضبط إن أمكن:
طبيعة النبات	<input type="checkbox"/> مزروع	<input type="checkbox"/> تلقائي	<input type="checkbox"/> أخرى
طريقة القطف (إذا أمكن)			
موسم القطف (الأشهر)			
معلومات عن التحضير والإستعمال الطبي			
المناطق المستعملة	<input type="checkbox"/> الجذور	<input type="checkbox"/> السيقان	<input type="checkbox"/> الأوراق
<input type="checkbox"/> الأزهار	<input type="checkbox"/> البذور	<input type="checkbox"/> البراعم	<input type="checkbox"/> الدرنات
<input type="checkbox"/> أخرى			
شكل النبات المستعمل	<input type="checkbox"/> رطب	<input type="checkbox"/> جاف	<input type="checkbox"/> أخرى
طريقة التحضير	كمية الماء: كمية النبات: مدة التحضير: مواد ينصح استعمالها (عسل، زيت، حليب...):		
الجرعات المستعملة	الكمية لكل جرعة (ملعقة، كأس...): عدد المرات في اليوم إن أمكن: الفئات المسموح لها (أطفال، كبار، حوامل...):		
الإستعمال الطبي والأمراض المعالجة			
مدة العلاج المطلوبة (إن وجدت)			
معلومات عن سمية النبات			
احتياطات أخرى (مثلا الأظعمة التي يجب تجنبها أو الأوقات ... (إن وجدت)			
الأعراض الجانبية المحتملة (إن وجدت)			
مصدر المعلومات	<input type="checkbox"/> وراثي	<input type="checkbox"/> تعلم	<input type="checkbox"/> خبرة شخصية
<input type="checkbox"/> أخرى	<input type="checkbox"/> خبرة أشخاص تعرفهم	<input type="checkbox"/> أخرى	

✓ Annexe II : Milieux de culture

Milieu		Formule et PH	Compositions	
Solide	Gélose Nutritive (GN)	Formule (en g/l) pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C	Peptone Extrait de levure Extrait de bœuf Chlorure de sodium Agar Eau Distillée qsp 1L	05,0 02,0 01,0 05,0 15,0
	Gélose Sabouraud	Formule (en g/l) pH = 5,8 ($\pm 0,2$) a 37°C	Glucose Peptone Extrait de levure Agar Eau Distillée qsp 1L	40,0 05,0 03,0 15,0
	Muller Hinton (MH)	Formule (en g/l) PH= 7,3 à 25°C	Infusion de viande de bœuf Hydrolysate acide de caséine Amidon Agar Eau Distillée qsp 1L	04,0 17,5 01,5 17,0
	Potato Dextrose Agar (PDA)	<u>Formule (en g/l)</u> PH= 5.6 \pm 0.2 à 25°C	Extrait de pomme de terre Glucose Agar Eau Distillée qsp 1L	200 20,0 17,0
	Neutraliseur :	<u>Formule (en g/l)</u> pH = 7,5 ($\pm 0,2$) à 37°C	Gélose nutritive NaCl Tween 80 Eau Distillée qsp 1L Jaune d'œuf	23,0 05,0 05,0 075

	Agar Salty Tween (AST):	<u>Formule (en g/l)</u>	Peptone	10,0
			NaCl	75,0
			CaCl ₂ H ₂ O	0,10
			Tween 80	10,0
			Agar	20,0
			Eau Distillée qsp 1L	
	GN-NaCl :	<u>Formule (en g/l)</u>	GN	23,0
			NaCl	50,0
			Tween 80	05,0
			Eau Distillée qsp 1L	
			Jaune d'œuf	75,0
Liquide	Bouillon Nutritif (BN)	<u>Formule (en g/l)</u> pH = 7,5 (±0,2) à 37°C	Peptone	15,0
			Extrait de levure	03,0
			Chlorure de sodium	06,0
			Glucose	01,0
			Eau Distillée qsp1L	
	Bouillon Sabouraud	<u>Formule (en g/l)</u> pH = 5,8 (±0,2) à 37°C	Peptone (Fluka)	10,0
			Extrait de levure	03,0
			Glucose	20,0
			Eau Distillée qsp 1L	
	Bouillon Mueller Hinton (BMH)	<u>Formule (en g/l)</u> pH = 7,4 (±0,2) à 37°C	Infusion de viande de bœuf	02,0
			Hydrolysate de caséine	17,5
			Amidon	01,5
			Eau Distillée qsp 1L	

✓ **Annexe III : Réactifs, solution et les colorants utilisés**

1. Les réactifs :

1.1. Réactif de Dragendorff :

(Tétraiodobismuthate de potassium) ou appelle aussi réactif à l'iodobismuthate de potassium :

- Solution A : Dissolve 0.5g de bismuth nitrate (Bi (NO₃)₃ 5 H₂O) dans 20 ml d'acide acétique 20% ;
- Solution B : 5ml de KI préparée à 40% dans l'eau distillé ;
- Mélanger A et B et Ajuster à 100ml par l'eau distillé.

1.2. Réactif de Mayer :

- Solution A : 1.358g de chlorure de mercure HgCl_2 sont dissous dans 60 ml d'eau distillée ;
- Solution B : 5g d'iodure de potassium KI sont dissous dans 10ml d'eau distillée ;
- Les solutions A et B sont mélangées extemporanément et le volume final est ajusté à 100ml avec d'eau distillée.

1.3. Réactif de Wagner :

2g de KI et 1,27g de I sont dissous dans 75ml d'eau distillée, puis ajustés à 100ml avec d'eau distillée.

2. Les solutions :**2.1. La solution de lavage :**

La solution de lavage consiste à préparer une solution de MgCl_2 à 2mM contenant 150mM de NaCl.

2.2. La solution tampon PBS :

Pour préparer 1 litre de PBS 100mM, il suffit de mélanger une quantité suffisante pour 20mM de KH_2PO_4 et une quantité suffisante pour 80mM de Na_2HPO_4 additionnée par 150mM de NaCl. Compléter à 1000 mL avec de l'eau distillée.

2.3. L'eau peptonée :

1g de peptone ajuster par 1litre d'eau distillée.

3. Les colorants :**3.1. Violet de gentiane au cristal**

- ✓ Violet de gentiane : **10g**
- ✓ Phénol : **20g**
- ✓ Ethanole à 0.95 : **100ml**
- ✓ Eau distillée : **1000ml**

3.2. Lugol

- ✓ Iode : **05g**
- ✓ Iodure de potassium : **10g**
- ✓ Eau distillée : **01g**

3.3. Fuchsine de ziehl

- ✓ Fuchisine basique : **10g**
- ✓ Phénol : **50g**
- ✓ Ethanol à 0.5 : **100ml**

✓ Eau distillée : **1000ml**

✓ **Annexe IV : l'observation microscopique des souches**

1. Coloration de Gram

Cette coloration permet de distinguer deux types de bactéries ; à Gram négatifs (G-) et à Gram positives (G+) en basant sur la composition de leur paroi notamment par l'épaisseur du peptidoglycane ou la présence d'une membrane externe. Elle se déroule comme Suit :

- Préparation d'un frottis ;
- Séchage à l'aire libre de frottis ;
- Fixation par passage direct dans la flamme du bec Bunsen ;
- Coloration : technique de V.L.A.F (violet/lugol/alcool/fuschine) ;
- sécher le frottis au papier absorbant et l'examiner à l'objectif sous elles immersion (grossissement X 100).

Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses (**Lansing et al., 2018**).

2. L'observation microscopique des champignons :

Elle est basée sur les caractéristiques morphologiques de mycélium et des spores, et a été évaluée par la technique de ruban adhésif qui consiste à appuyer à la surface de la colonie à l'aide d'un petit morceau de scotch transparent, puis collé à une lame de verre recouvert de bleu de coton au lactophénol et observée sous microscope (**chabasse et al., 1999**).

✓ **Annexe V : Initiation aux manipulations**

1. Préparation d'une solution par dissolution d'un composé solide :

- La quantité de matière à dissoudre (m : masse à dissoudre) est calculée par l'équation suivante : $m = c.M.V$ (avec m en g, M en $g.mol^{-1}$, V en L et c en $mol.L^{-1}$).
- Peser précisément la masse m en prélevant le solide avec une spatule propre et sèche.
- Pour cela, le placer dans une capsule de pesée ou un verre de montre préalablement taré
- Introduire le solide dans une fiole jaugée avec un entonnoir à solide. Rincer la capsule de pesée (ou le verre de montre) et l'entonnoir avec de l'eau distillée : verser l'eau de rinçage dans la fiole jaugée.
- Remplir la fiole jaugée aux trois quarts avec de l'eau distillée.
- Après l'avoir bouchée, agiter pour dissoudre le solide.

- Une fois la dissolution terminée, ajouté de l'eau à la pissette.
- Terminer à la pipette simple pour ajuster au trait de jauge.
- Reboucher la fiole jaugée et la retourner plusieurs fois pour bien homogénéiser la solution (cette étape est pour les solutions qui ne représentent aucun risque).
- La solution est prête : elle peut être stockée dans un flacon, étiquetée et utilisée ultérieurement.

2. Stérilisation :

- Les manipulations stériles :

Tous les instruments du microbiologiste devront être stériles et utilisés dans la zone de travail stérile créée par le bec Bunsen (zone d'environ 30 cm de diamètre). Les prélèvements et les transferts de produits devront être effectués dans cette zone stérile.

- Organisation du poste de travail
- Organisation du travail
- Stérilisation :

1. Stérilisation humide :

Utilisation de la cocotte-minute à l'équivalent de l'autoclave pour la stérilisation humide des milieux, les solutions, les matériaux en plastique et en papier...etc. (120°C à 40 minutes).

2. Stérilisation sec :

Pour cette stérilisation nous avons utilisé le four pasteur pour les instruments qui résiste la haute température comme les tube à vis, tube à hémolyse, pince...etc. (180°C à 30 minutes).

- Décontamination (destruction)