



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Activités antimicrobienne et antioxydante des
huiles essentielles de : *Mentha piperita* et *Mentha
pulegium***

Présenté par : Douâae OU-YAHIA

Encadré par : Pr. Kawtar FIKRI BENBRAHIM
Pr. Abdellah FARAH

Soutenu le : 22/06/2015, devant le jury composé de :

Pr. Kawtar FIKRI BENBRAHIM

Encadrant

Pr. Abdellah FARAH

Encadrant

Pr. Khalid AMARNI JOUTEI

Examinateur

Pr. Mohamed IRAQUI HOUSSAINI

Examinateur

Année Universitaire : 2014-2015

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 – 212 (35) 60 29 53 – Fax : 212 (35) 60 82 14



Introduction

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne. L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiotique dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (Guinoiseau, 2010).

Le phénomène de résistance aux antibiotiques est général et concerne toutes les espèces bactériennes. La prolifération de ces bactéries résistantes a engendré une augmentation alarmante du taux d'infection avec les microorganismes pathogènes et est devenue donc une préoccupation majeure dans le domaine de la santé. À titre d'exemple *Staphylococcus aureus* principal agent impliqué dans les infections nosocomiales a acquis de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques dès 1960 (Luma et al, 2011).

L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour, finalement, conduire à une impasse thérapeutique.

Vue la propagation de ce phénomène de résistance, la découverte de nouveaux agents antibactériens est devenue plus qu'indispensable. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploitation des ressources naturelles semble plus prometteuse et en particulier celle des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), qui sont à l'origine de produits à forte valeur ajoutée, comme les huiles essentielles. Ces produits d'origine naturelle présentent une grande diversité de structures chimiques d'une grande importance aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine de l'industrie agroalimentaire notamment en ce qui concerne les propriétés antioxydantes, et c'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude.

Dans notre étude nous mettrons la lumière sur la composition chimique, les activités : antibactérienne, antifongique et antioxydante des huiles essentielles de deux plantes



aromatiques et médicinales appartenant à la famille des *lamiaceae* : *Mentha piperita* et *Mentha pulegium*.

Les principaux objectifs de ce travail se résument dans les volets suivants :

- ✓ L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques étudiées : la menthe poivrée et la menthe pouliot ;
- ✓ L'évaluation de l'effet antibactérien et antifongique des huiles essentielles avec la méthode des disques et la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices, bactéricides ainsi que fongicides ;
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles avec la méthode du radical DPPH.

I. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales (PAM)

I.1 Définition

Les plantes aromatiques sont des plantes produisant des aromates, autrement dit des composés parfumés. Plus spécifiquement, une plante aromatique est une plante qui contient



suffisamment de molécules aromatiques dans un ou plusieurs de ses organes producteurs à savoir feuilles, fleurs, fruits, graines, écorce etc. Le terme médicinal, d'après la pharmacopée européenne, signifie que ces plantes sont médicaments d'origine végétale dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière, le plus souvent, il s'agit d'une ou de plusieurs parties qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes (Vercauteren, 2012).

I.2 Historique

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) ont des vertus médicinales considérables, en effet, 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire selon les statistiques de 2003 de l'OMS (Bhar et Balouk, 2011).

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums ainsi que dans les préparations culinaires.

Les Grecs furent les héritiers des connaissances médicinales de l'Egypte pharaonique et de la Mésopotamie. Grâce au père de la médecine Hippocrate, des bases d'une médecine scientifique dépourvue d'une pratique magico-religieuse ont été établies dès le 4^{ème} siècle avant J.C. Deux cent trente plantes médicinales sont décrites dans le corpus Hippocratique d'Hippocrate (Fleurentin, 2008).

De nos jours entre 20000 et 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale (Adossides, 2003).

I.3 Importance des plantes aromatiques et médicinales

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. La plupart des grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes (Goeb, 1999).



La popularité dont jouissent depuis longtemps les plantes aromatiques en général reste liée à leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, calmantes.etc (Nicolas,1991 ; Mishara et al, 1994).

En plus de leur importance sur le plan médical et culturel, les plantes aromatiques et médicinales constituent un facteur économique majeur pour les pays en voie de développement dont le Maroc.

Le Maroc grâce à son climat méditerranéen et ses caractéristiques géomorphologiques, bénéficie de conditions favorables pour le développement d'une flore riche et variée comprenant un important potentiel en PAM souvent endémiques, ainsi, l'exploitation de ce potentiel est devenue un secteur important et prometteur pour le pays. En effet, le Maroc exporte environ l'équivalent de 300 millions de Dirhams en PAM et environ 165 millions de Dirhams d'huiles essentielles, soit un total d'environ 456 millions de Dirhams.

L'exploitation et le commerce des plantes aromatiques et médicinales représentent une source de revenu non négligeable et permet de créer des milliers de journées de travail pour plusieurs familles dans la campagne et même en ville.

I.4 Métabolisme des végétaux supérieurs

Il existe deux voies de métabolisme chez les végétaux : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

I.4.1 Métabolisme primaire

Au cours du métabolisme primaire, les végétaux synthétisent des molécules indispensables à leur vie, dont des facteurs de croissance, des glucides stockés sous forme de saccharose ou d'amidon, des cofacteurs enzymatiques tels que le coenzyme A, le NAD⁺, le NADP⁺ et enfin de nombreux intermédiaires métaboliques comme le pyruvate et l'acétylcoenzyme A qui interviennent dans de nombreuses réactions de catabolisme et d'anabolisme (Epstein, 1972; Brownleader et al, 1997; Taiz et Zeiger, 1998).

I.4.2 Métabolisme secondaire

La majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutique sont extraites directement de la plante entière. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance, aucun rôle spécifique

pour la plante ne leur a été assigné (Braz-Filho, 1999). Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par cinq voies métaboliques principales: la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mevalonique, des acides aminés (Taiz et Zeiger, 1998) et du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) via la voie des pentoses phosphates (Contin et al, 1998). La figure 1 donne un aperçu sur les interactions entre métabolismes primaire et secondaire. Les précurseurs principaux de la plupart des métabolites secondaires sont l'acétyl-CoenzymeA, l'erythro-4-phosphate, le phosphoénolpyruvate, les acides aminés, le pyruvate et le 3-phosphoglycérate.

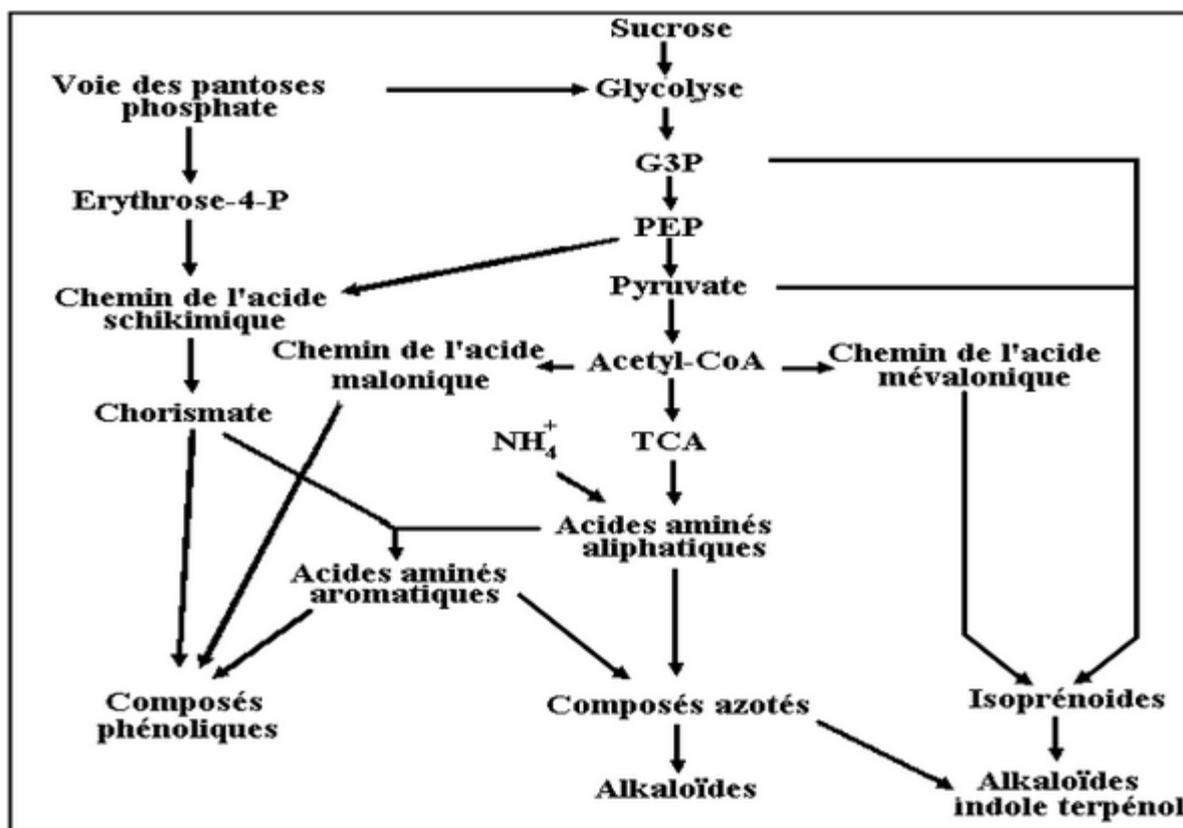


Figure1 : Relations entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire chez les végétaux. (G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate, PEP: phosphoénolpyruvate, TCA: cycle de l'acide citrique).

A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétal. Un métabolite secondaire particulier est souvent spécifique à quelques espèces. Ces métabolites secondaires sont classés selon leur structure



chimique; on les résume en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les isoprénoïdes et les composés azotés.

Les composés phénoliques regroupent différentes classes de composés tels que les polyphénols, les isoflavonoïdes prénylés, les stilbènes, les coumarines, les flavonols ou encore les aurones. Les polyphénols, par exemple, sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside.

La nature et la fonction de ces composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Ils jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante et sont tous impliqués dans les mécanismes de résistance et peuvent même être considérés comme des phytoalexines grâce à leurs propriétés antimicrobiennes. En plus, ils interviennent dans les interactions des plantes avec leurs environnements biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV) et assurent la communication entre cellules, entre végétaux et même entre végétaux et animaux.

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes. De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc.

La classification des terpenoïdes repose sur le nombre d'unités terpéniques :

- C5 : hémiterpènes (une unité isoprène)
- C10 : monoterpènes (deux unités isoprène)
- C15 : sesquiterpènes (trois unités isoprène)
- C20 : diterpènes (quatre unités isoprène)
- C30 : triterpènes
- C40 : tetraterpènes (caroténoïdes)
- C45 et C50 : queues terpéniques des molécules d'ubiquinone et de plastoquinones
- Au-delà : polyterpènes (caoutchouc...).



Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques et assez peu solubles dans l'eau. On retrouve en effet des molécules comme la quinine, des drogues (cocaïne), des anticancéreux (la vincristine et le taxol), des molécules utilisées comme poisons (strychnine) et des stimulants (caféine). Cette famille de métabolites secondaires a été particulièrement étudiée du fait des enjeux économiques qui y sont associés. Leurs actions biologiques les place également au cœur de phénomènes d'interactions de défense face aux pressions biotiques (herbivores, microorganismes).

On distingue généralement :

- les alcaloïdes vrais : qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane.
- les proto-alcaloïdes : qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine).

II. Huiles essentielles

II.1 Définition

Il existe plusieurs expressions pour définir les huiles essentielles. Selon la pharmacopée européenne, une huile essentielle est définie comme : « Produit odorant, de composition généralement complexe, obtenu à partir d'une matière végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (Pharmacopée Européenne, 2010).

Selon l'association française de Normalisation (AFNOR), on appelle huile essentielle (ou parfois essence végétale) le liquide concentré hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante (AFNOR, 2000).

Contrairement à ce que suppose la dénomination, ces extraits ne sont pas forcément huileux (AFNOR, 2000). Les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (Huile de tournesol, de maïs, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par la plante et contenue dans ses cellules, soit dans les fleurs ou



dans les sommités fleuries, soit dans les feuilles, soit dans l'écorce, ou dans les racines, soit dans les fruits ou dans les graines soit encore ailleurs dans la plante (Anton et Lobstein, 2005).

II.2 Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont synthétisées et accumulées dans des structures histologiquement spécialisées. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), dans des poils sécréteurs (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes.

Afin de limiter leur évaporation ainsi que leur oxydation à l'air, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes (Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005).

II.3 Composition des huiles essentielles

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et al, 2002 ; Gonny et al, 2004 ; Burt, 2004).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi et al, 1995).

L'huile essentielle est un mélange complexe de molécules odorantes. C'est un liquide homogène, bien qu'il soit constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures. A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (Pibini, 2006).

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les *terpénoïdes* et les *phénylpropanoïdes*.



Les phénylpropanoïdes sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques qui sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényl.

La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C₁₀) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesquiterpénoïdes (C₁₅) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les mono- et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles.

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées.

Du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont les plus actifs. Ainsi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, d'origan et de clou de girofle, démontrent les plus hautes activités antibactériennes (Elodie Guinoiseau, 2010).

II.4 Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient d'une façon déterminante dans leur composition chimique (Ganero, 1977).

II.4.1 Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale.

Dans ce système, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable (Fig. 2). Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées (Richard et Peyron, 1992).

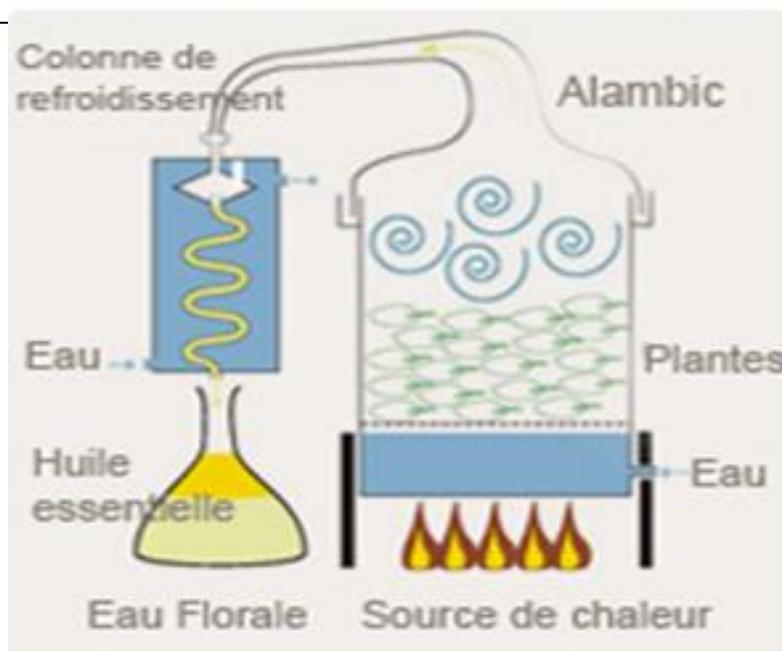


Figure 2 : Procédé d'entraînement à la vapeur d'eau

II.4.2 Hydrodistillation

C'est le procédé le plus utilisé pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi pour obtenir de meilleurs rendements.

Le principe repose sur l'immersion de la matière première végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité (Fig. 3).

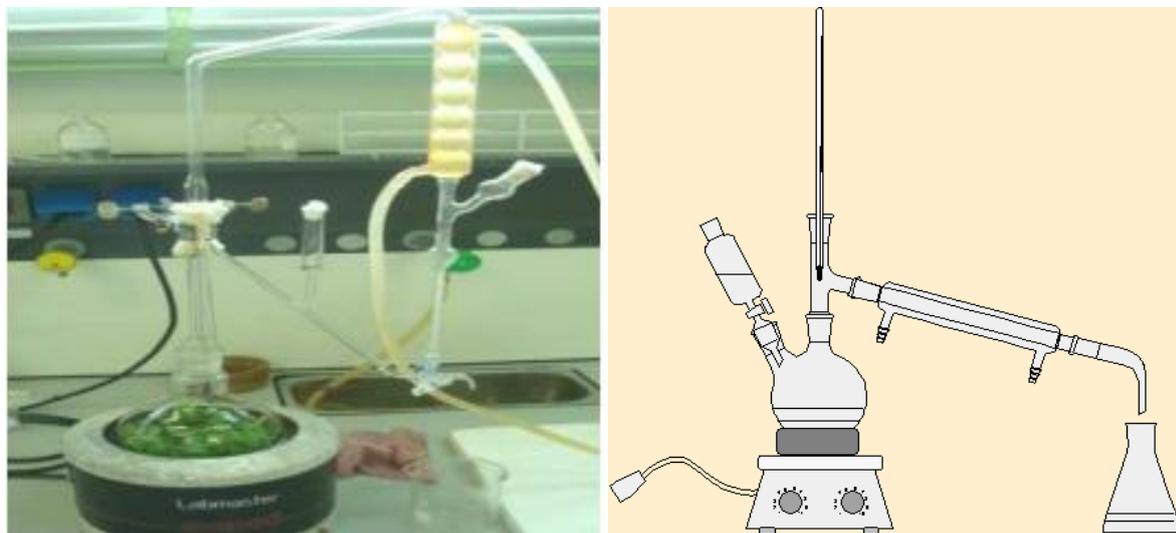


Figure 3 : Montage d'hydrodistillation

II.4.3 Extraction par solvants organiques

Ce procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Legrand, 1993 ; Dapkevicius et al, 1998 ; Kim et Lee, 2002).

II.4.4 Extraction à froid

Ce mode d'extraction à froid est choisi en raison de la fragilité des essences qui est due à leurs composants terpéniques et aldéhydiques, sensibles à la chaleur.

Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (Basil et al, 1998).

II.4.5 Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Aghel et al, 2004).

Le CO₂ à l'état supercritique n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable en jouant sur la température de mise en œuvre (Fig. 4).

Les avantages de cette méthode sont : la possibilité d'éliminer, et de recycler le solvant par simple compression détente, la non agressivité des températures d'extraction vis à vis des

constituants les plus fragiles ainsi que l'inertie et l'inflammabilité du CO₂ (Laguinez Privera, 2006).

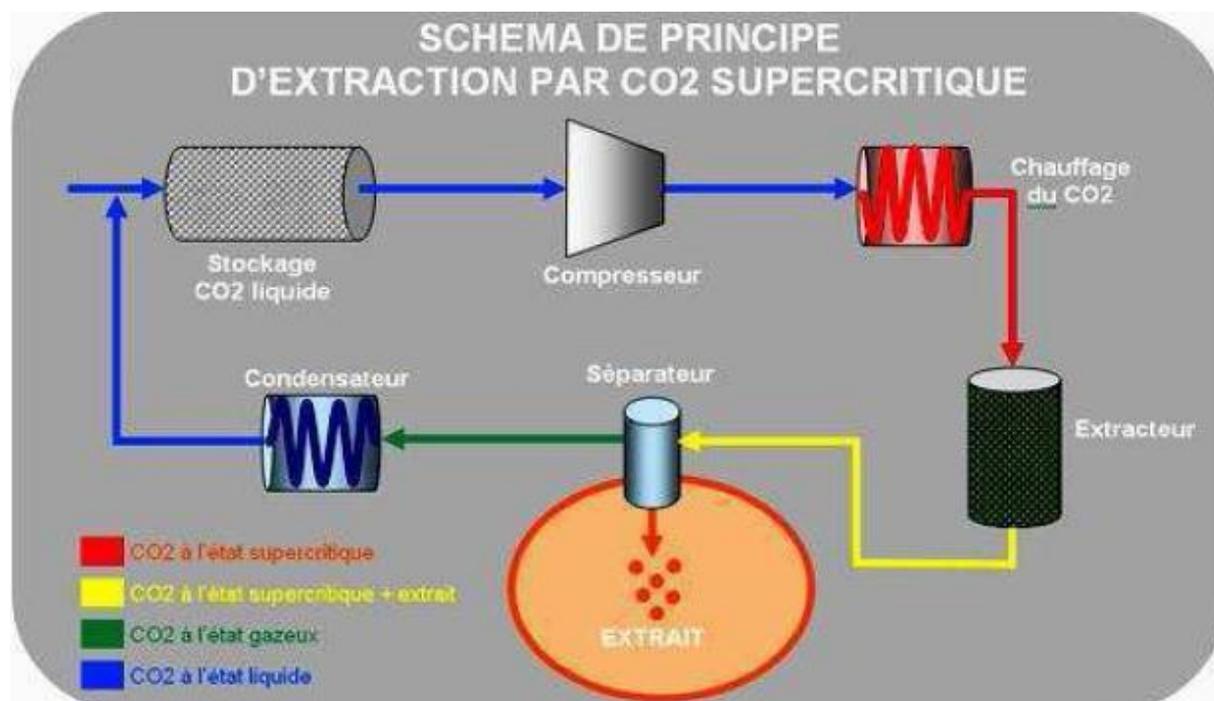


Figure 4 : Principe d'extraction par CO₂ supercritique

II.5 Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes. Elles sont généralement sous forme liquide à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux « huiles fixes » (lipides). Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle) et sont très rarement colorées.

Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaient à la vapeur d'eau, mais très peu solubles dans l'eau. Elles sont aussi très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière de l'air.

II.6 Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Compte tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Figure 5).

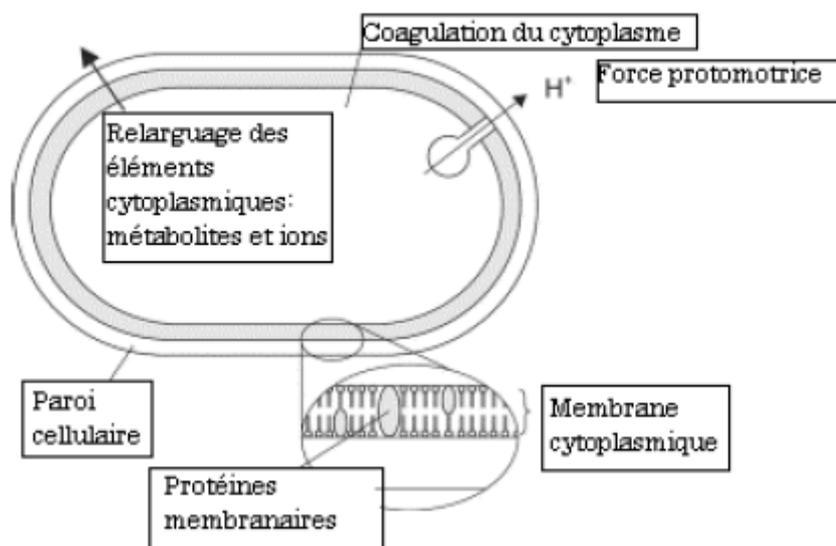


Figure 5 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. En effet, l'hydrophobicité des molécules présentes dans les huiles essentielles permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson et al, 2002 ; Ultee et al, 2002). 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.

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert et al, 2001). En détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander et al, 1998).



Toutefois, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

II.7 Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité des huiles sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (Pibiri, 2006). Mais la neurotoxicité des huiles essentielles à thuyone (*Artemisa absinthum*) et pinochaphène (*Hyssopus officinalis*) est assez bien connue. En effet, ces substances cétoniques induisent des troubles psychiques et sensoriels. D'autres monoterpènes sont toxiques à forte doses : camphre, cinéole, anéthol. Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines cancéreuses (Sivropoulou et al, 1996).

II.8 Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

II.8.1 Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

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



Kunicka, 2003). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). En effet, chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (Berche, 2003).

La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) (May *et al*, 2000 ; Tohidpour *et al*, 2010).

II.8.2 Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Lis-Balchin, 2002).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiaceae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Etant donnée la grande complexité de la composition chimique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al*, 1988). Les auteurs concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro



einnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique :
Phénols>Alcools>Aldéhydes>Cétones>Ethers>Hydrocarbures.

II.8.3 Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (Richard, 1992).

Lorsqu'on parle d'activité antioxydante, on en distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Multon, 1982). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc (Madhavi *et al*, 1996).

Des études ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

III. Plantes étudiées

III.1 Les Menthes

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des labiacées (Jahandiez et al, 1934).

Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces de Menthe doivent leur odeur et activité à leurs Huiles Essentielles ou Essences de Menthe (Il idrissi et al, 1982).

Ces essences très odoriférantes ont un intérêt industriel important ; elles sont souvent extraites des plantes de la race cultivée avec de bons rendements.

Au Maroc, la Menthe se rencontre dans presque toutes les régions soit à l'état spontané ou cultivé (Jahandiez et al, 1934).



Parmi toutes les labiées, les Menthes se reconnaissent, en plus de leur odeur spéciale, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales.

Alors les principales caractéristiques de ces espèces sont :

- une tige quadrangulaire.
- des feuilles simples et opposées.
- l'odeur caractéristique qui se dégage par simple touché (Benayad, 2008).

III.1.1 *Mentha pulegium* L.: Menthe Pouliot

III.1.1.1 Description botanique

Mentha pulegium est une plante vivace herbacée et peut atteindre 40 cm de hauteur (Stengel et Stahl, 1993). Cette espèce pousse de façon sauvage dans les zones humides du centre, l'Est et l'Ouest de l'Europe, le nord d'Afrique ainsi que l'Asie mineure (Chalchat et al, 2000; Titim et al, 1972).

Très répandue au Maroc particulièrement entre les régions de Marrakech et Azrou, c'est une plante fertile dont la descendance semble assez homogène, se distingue des autres menthes par son port étiré, ses tiges en parties couchées sur le sol, ses fleurs rosées disposées au long de la tige et des rameaux, et de son calice obturé.

Les parties aériennes sont pubères et portent les trichomes glandulaires qui sont responsables de la sécrétion de l'huile essentielle (Rodriguez, 2012).





Figure 6 : *Mentha pulegium*

III.1.1.2 Classification botanique

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous règne :	<i>Tracheobionta</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe :	<i>Astériidae</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Lamiaceae</i>
Genre :	<i>Mentha</i>
Espèce :	<i>Mentha pulegium</i>

III.1.2 *Mentha piperita* : Menthe poivrée

La menthe poivrée est une plante herbacée vivace de la famille des lamiacées. Ce type de menthe serait issu d'un croisement entre *M.aquatica* et *M.spicata*.

Bien que le genre soit natif de la région méditerranéenne, il est cultivé dans le monde entier pour son utilisation dans la saveur, le parfum ainsi que dans les applications médicales et pharmaceutiques. L'huile de la Menthe poivrée est l'une des huiles essentielles les plus produites et consommées (Heywood, 1979 ; Foster, 1990 ; Brown, 1995).

Une fois séchée, la plante entière est distillée pour obtenir l'huile essentielle qui est de couleur jaune très clair, son odeur est assez forte et sa saveur piquante et rafraîchissante.

III.1.2.1 Description botanique

Il s'agit d'une plante vivace de 40 à 60cm de hauteur à tige de section carrée, légèrement velue et violacée. Les feuilles, simples et opposées, sont ovales et découpées en dents de scie. Elles sont de couleur vert foncé sur le dessus et vert pale en dessous. Les fleurs sont roses violacé et regroupées en épis au sommet de la plante.



Figure 7 : *Mentha piperita*

III.1.2.2 Classification botanique

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous règne :	<i>Tracheobionta</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe :	<i>Astériadae</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Lamiaceae</i>
Genre :	<i>Mentha</i>
Espèce :	<i>Mentha piperita</i>



I. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

L'identification des constituants des huiles essentielles étudiées a été réalisée en se basant sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont été effectuées au CNRST sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard (série HP6890), couplé avec un spectromètre de masse (série HP5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La CPG est équipée d'une colonne capillaire VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), (30 m x 0,25 mm) avec une épaisseur du film de 0,25 μm , d'un détecteur FID réglé à 300 °C et alimenté par un mélange de gaz H₂/Air et un injecteur split-splitless réglé à 220°C. Le volume injecté est de 1 μl . Le mode d'injection est split (rapport de fuite: 1/50 débit: 1.4 ml/min). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 40 à 300 °C à raison d'une montée de 4 °C/min et un palier de 5 minutes à la température finale. La limite de détection est inférieure à 1 ppm. L'appareil est piloté par un système informatique de type « *HP ChemStation* », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.



L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse NIST 98. En effet, le système d'indice est basé sur une notion de rétention relative. Il compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire. Ce système est applicable en chromatographie en phase gazeuse à tout composé sur toute colonne.

II. Activité antimicrobienne

II.1 Activité antibactérienne

Les huiles essentielles que nous avons étudié sont celle de : *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*.

Le test antibactérien pour les huiles essentielles a été réalisé en deux étapes : une première étape correspondant à un test de mise en évidence de l'activité antibactérienne (aromatogramme) suivie d'une deuxième étape déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

II.1.1 Mise en évidence de l'activité antibactérienne

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion ou aromatoigramme qui est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme.

a. Principe

Le principe repose sur le fait que les disques sont chargés d'antibiotiques et déposés à la surface des milieux de cultures solides préalablementensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées. L'antibiotique commence à diffuser dès son application sur le milieu de culture, les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures ou plus selon la souche étudiée et ceci afin de favoriser la croissance bactérienne. L'effet de l'antibiotique sur la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une zone appelée « zone d'inhibition » dépourvue des bactéries (Figure 8). Dans le cas de l'aromatogramme, l'antibiotique est remplacé par des extraits de plantes ou des huiles essentielles.

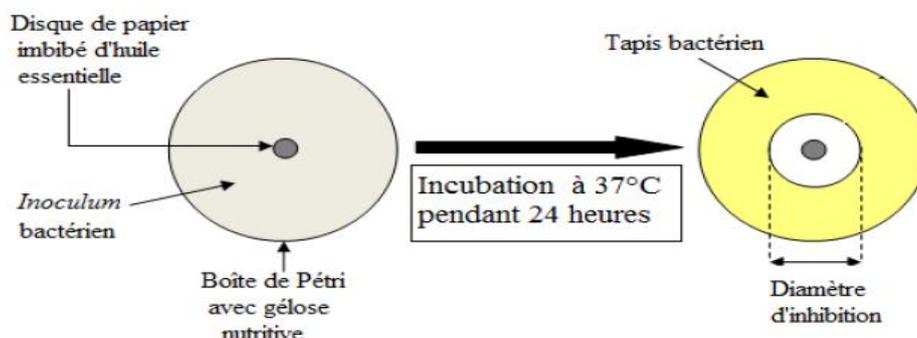


Figure 8 : Principe de l'aromatogramme

Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée durant 50 ans d'utilisation mondiale (Boullard et al,2010).

b. Protocole

b.1 Choix et origine des souches

L'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées a été testée sur deux souches pures issues du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la faculté des sciences et techniques, Fès. Il s'agit d'une bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) et d'une bactérie à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27 853).

b.2 Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu LB, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile. Ensuite, le contenu de l'anse a été transféré dans 10 ml d'eau physiologique stérile et la suspension bactérienne a été homogénéisée à l'aide du vortex, l'opacité de cette suspension doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique comprise entre 0,08 et 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10^8 UFC/ml.

b.3 Préparation des disques

Des disques de 6mm de diamètre en papier Whatman N°=1 ont été préparés et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.

b.4 Application du test



Dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu LB stérile, 1 ml de suspension bactérienne de densité équivalente au standard de 0,5 de Mc Farland (10^8 UFC/ml) a été ensemencé, l'excédent de l'inoculum a été ensuite éliminé par aspiration. Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre ont été déposés à la surface de la gélose puis imbibés de 5 μ l de l'huile essentielle. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres, disque inclus.

Chaque test a été réalisé en deux répétitions.

II.1.2 Détermination de la CMI en milieu liquide

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber toute croissance bactérienne.

À cause de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, l'émulsion a été réalisée avec le milieu de culture Mueller Hinton à 0,15% d'agar (Remmal et al, 1993). Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact microorganisme/composé.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée grâce à l'utilisation des microplaques à 96 puits avec une gamme de concentrations des huiles essentielles allant de 8 à 0,0078% pour *Staphylococcus aureus* et 40 à 0,039% pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Ensuite, 10 μ l de résazurine ont été ajoutés pour révéler la croissance bactérienne (Bouhdid et al.,2009).

Après une incubation à 37°C pendant 2 heures, les CMI ont été déterminées comme les plus faibles concentrations en huiles essentielles ayant montré un changement de coloration de la résazurine. La croissance bactérienne est détectée par la réduction de la résazurine ayant une coloration bleue en résorufine ayant une coloration rose (Figure 9).

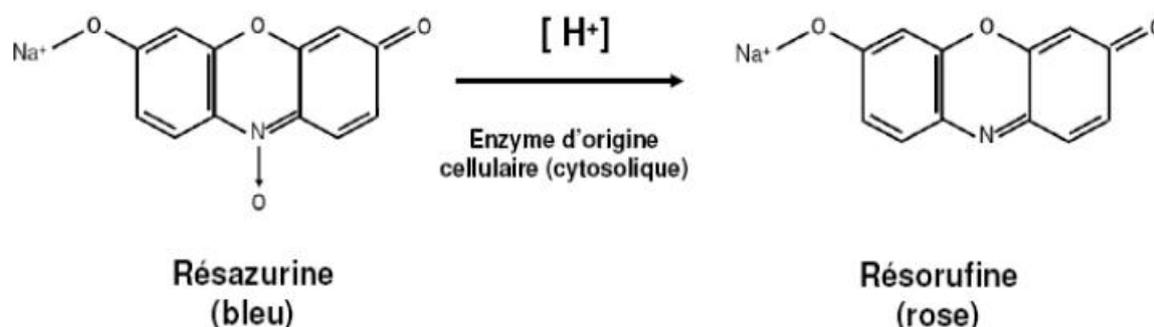


Figure 9 : Réduction de la résazurine en résorufine catalysée par des enzymes d'origine bactérienne

Pour chaque huile, le test a été réalisé en deux répétitions.

II.1.2 Détermination de la CMB en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum bactérien initial. Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

La CMB a été déterminée en prélevant 3 μ l à partir des puits négatifs et en les déposant sur le milieu LB solide, puis en les incubant à 37°C pendant 24 heures.

Après l'incubation, la CMB a été considérée comme étant la plus faible concentration en huile essentielle ayant montré une absence de croissance.

II.2 Activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et les Concentrations Minimales Fongicides (CMF).

II.2.1 Choix et origine des souches

L'activité antifongique des huiles essentielles étudiées a été testée sur deux souches pures issues du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques, Fès. Les souches sont : une levure *Candida albicans* et une moisissure *Aspergillus niger*.

II.2.2 Préparation de l'inoculum

La souche d'*Aspergillus niger* a été cultivée sur le milieu Extrait de Malt (EM) par des stries très serrés de façon à obtenir un tapis complet lors de la croissance. Ainsi, après sept jours



d'incubation, les spores formées sont récoltées par raclage de la surface de culture avec de l'eau distillée stérile. La suspension de spores ainsi obtenue est concentrée par centrifugation à 1000 rpm pendant 10 minutes et à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot de spores est remis en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile et les spores sont comptées à l'aide de la cellule de Malassez afin d'obtenir une concentration de 10^6 spores/ml.

Pour la levure *Candida albicans*, nous avons raclé à l'aide d'une anse stérile quelques colonies à partir d'une culture pure cultivée pendant 48 heures à 30°C sur le milieu YPG. Ensuite, nous avons inoculé le contenu de l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisé la suspension à l'aide du vortex, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland correspondant à 10^6 UFC/ml.

II.2.3 Détermination de la CMI en milieu liquide

Pour la levure *Candida albicans*, la CMI a été déterminée par la méthode de microplaque à 96 puits en utilisant une gamme de concentrations allant de 16 à 0,0015%.

La microplaque a été incubée à 30°C pendant 48 heures. Ensuite, 10 µl de résazurine ont été ajoutés pour révéler la croissance.

Après une incubation à 30°C pendant 2 heures, les CMI ont été déterminées comme les plus faibles concentrations en huiles essentielles ayant montré un changement de coloration de la résazurine.

Pour la moisissure *Aspergillus niger*, la dilution des huiles essentielles a été réalisée par le tween 20 à 1%. La technique utilisée était également celle de la microplaque à 96 puits avec une gamme de concentrations allant de 40 à 0,039%. La concentration de la suspension fongique était de l'ordre de 10^6 spores/ml et l'incubation a été réalisée à 30°C pendant 72 jours. Après l'incubation, la révélation de la croissance fongique a été réalisée par observation à l'œil nu et les CMI ont été déterminées comme les plus faibles concentrations en huiles essentielles ayant montré une absence de croissance.

II.2.4 Détermination de la CMF sur milieu solide

La Concentration Minimale Fongicide (CMF) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum fongique initial. Elle définit l'effet fongicide d'une huile essentielle.



Pour *Candida albicans*, la CMF a été déterminée en prélevant 3 μ l à partir des puits négatifs et en les déposant sur le milieu YPG solide, puis en incubant à 30°C pendant 48 heures.

Pour *Aspergillus niger*, La CMF a été déterminée en prélevant 3 μ l à partir des puits négatifs et en les déposant sur le milieu EM solide. L'incubation a été réalisée à 30°C pendant 72 heures.

Après l'incubation, la CMF correspond à la plus faible concentration en huile essentielle ayant montré une absence de croissance.

III. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles testées a été estimé par comparaison avec un antioxydant commercialisé : hydroxytoluène butylé (BHT). Tous les tests ont été réalisés avec 2 répétitions pour chaque concentration.

III.1 Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, c'est-à-dire DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ambiante. La délocalisation donne une couleur violette bien caractéristique de la solution de DPPH•. La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH+ (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (Burits et Bucar, 2000), qui se transforme en DPPH-H de couleur jaune (Figure 10).

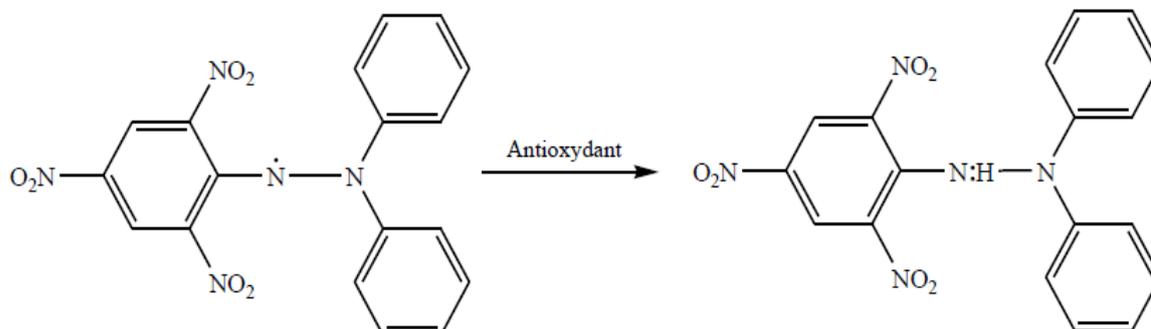


Figure 10 : Réduction du DPPH en DPPH-H

III.2 Protocole

La capacité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée en utilisant le radical libre DPPH selon la méthode décrite par Mighri et al, (2010).

Une série de dilution des huiles essentielles allant de 20mg/ ml à 0,5 mg/ml (w/v) a été préparée à l'aide du méthanol. Une solution de DPPH à 0,004% (w/v) a été préparée en utilisant le même solvant et incubée pendant deux heures à l'obscurité. Ensuite, 2,5 ml de chaque dilution des huiles essentielles ont été mélangés avec 2,5 ml de la solution DPPH, les mélanges ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. Enfin, la densité optique a été mesurée à 517 nm.

L'hydroxytoluène butylé (BHT) a été utilisé comme témoin positif. Chaque test a été réalisé en deux répétitions.

III.3 Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon *Sharififar et al*, (2007), le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH (I%) a été calculé de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

A échantillon : Absorbance du composé testé.



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences et Techniques
www.fst-usmba.ac.ma



Les concentrations en huile essentielle et en BHT, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index CI50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50% (Sharififar *et al*, 2007).



I. Composition chimique des huiles essentielles étudiées

La composition chimique des deux huiles essentielles a été déterminée, au CNRST de Rabat, à l'aide de la CPG/ SM. Les résultats de cette analyse sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

➤ *Mentha piperita*

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha piperita* par la CPG/SM, a permis d'identifier 26 composés (Tableau1). Les composés majoritaires sont : le menthol (46,32%), le menthofurane (13,18%), l'acétate de menthyle (12,10%), le menthone (7,42%) ainsi que le 1,8-cineole (6,06%) (tableau 1).

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha piperita*

RI	Composés	Pourcentage
931	α -thujene	0.31
939	α -Pinene	0.32
967	Verbenene	0,02
975	Sabinene	1.38
979	β -pinene	0.53
1005	α -Phellandrene	0,01
1026	P-cymene	0,03
1031	Limonene	3.01
1033	1,8-Cineole	6.06
1070	<i>cis</i> -Sabinenehydrate	0.24
1098	Linalool	0.05
1123	Chrysanthenone	0.42
1152	Menthone	7.42
1164	Menthofuran	13.18
1165	Neomenthol	4.79
1171	Menthol	46.32
1177	terpinen-4-ol	0,04
1189	α -terpineol	0,03
1243	Carvone	1,02
1273	Neomenthylacetate	0.43
1295	Menthyl acétate	12.10
1305	Isomenthyl acetate	0.82
1352	α -terpinyl acetate	0,03
1388	β -Bourbonene	0.37
1409	α -Gurjunene	0,03
1418	β -Caryophyllene	0.55



RI=Indice de Rétention

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Benchikha et al. (2008), qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha piperita* contenait 20 composés et que les composés majoritaires étaient : menthol (51%), menthone (25%), 1,8-cineole (7%) et acétate de menthyle (6%), mais différent de ceux rapportés par Tyagi et al, (2011), qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha piperita* contenait 47 éléments et que les principaux constituants étaient le menthol (19,1%), isomenthone (14,8%), le limonène (10,6%), iso-menthanol (8,8%), acétate de menthyle (6,6%), β -pinène (5,6%), α -pinène (4,8%), 1,8-cinéole (3,5%), isopulégol (3%), pulégone (2,3%), pipéritone (2,1%), et β -phellandrène (2,8%).

➤ *Mentha pulegium*

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* par la CPG/SM, a permis d'identifier 18 composés. Les composés majoritaires sont : R(+)-pulégone (75,48%), le carvone (6,66%) ainsi que le dihydrocarvone (4,64%) (tableau2).

Tableau 2: La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*

RI	Composés	Pourcentage
939	α -pinène	0,52
952	Cyclohexanone-3-méthyl	0,26
980	β -pinène	0,39
993	Myrcène	0,16
994	Octanol-3	1,86
1001	δ -2-carène	0,07
1031	Limonène	1,88
1072	p-mentha-3,8-diène	2,44
1154	Menthone	0,19
1168	Pinocarvone	1,27
1173	Menthol	0,72
1194	dihydrocarvone	4,64
1238	R(+)-pulégone	75,48
1242	Carvone	6,66
1252	Péperitone	1,13
1419	Caryophyllène	0,33
1630	γ -eudesmol	0,28
1649	α -eudesmol	0,49

RI=Indice de Rétention



Ces résultats ne confirment pas ceux rapportés par Mahboubi et Haggi (2008) qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* contenait 16 composés et que les composés majoritaires étaient : le piperitone (38,0%), piperitenone (33,0%), α -terpinol (4,7%), 1,8-cineole (4%), oxyde de piperitone (3,4%), menthone (3,1%), borneole (2,9%) et le pulégone (2,3%).

Ces différences peuvent être dues à certains facteurs écologiques et environnementaux (Hazzoumi, 2010), mais également à d'autres facteurs : la partie utilisée de la plante, l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques (Amarti et al, 2010).

II. Activité antibactérienne des huiles essentielles

II.1 Aromatogramme

La méthode de diffusion sur disques a été étudiée pour mettre en évidence le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de deux plantes vis-à-vis de deux souches bactériennes testées : une souche à Gram+ *S.aureus* et une souche à Gram- *P.aeruginosa*. Les résultats obtenus de cette activité sont illustrés sous forme de diamètres des zones d'inhibition en mm (tableau 3).

Tableau 3 : Diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* contre les souches *S.aureus* et *P.aeruginosa*

Souches	Huiles essentielles	
	<i>M.piperita</i>	<i>M.pulegium</i>
<i>S. aureus</i>	25±0,0 mm	17±0,05 mm
<i>P. aeruginosa</i>	9±0,0 mm	8±0,1 mm

Il ressort des résultats présentés dans le tableau ci-dessus que les huiles essentielles testées ont une activité inhibitrice contre les deux souches bactériennes étudiées.

Pour l'huile essentielle de *M. piperita*, la bactérie à Gram+ *S. aureus* s'est révélée plus sensible à l'action de cette huile essentielle en comparaison avec la bactérie à Gram- *P.aeruginosa* qui était beaucoup plus résistante avec des diamètres des zones d'inhibition de 25mm et 9mm respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'huile essentielle



de *M. pulegium* mais avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de 17 mm pour *S. aureus* et de 8 mm pour *P. aeruginosa*.

Les deux souches ont montré une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *M. piperita* supérieure à celle vis-à-vis de l'huile essentielle de *M. pulegium*.

Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *M. piperita* sont comparables avec ceux de Singh et al. (2011) qui ont rapporté que cette huile essentielle est pourvue d'une activité inhibitrice importante envers *S. aureus*. L'activité antibactérienne de cette huile essentielle peut être attribuée à la présence des constituants monoterpènes actifs, tels que l' α -pinène. En effet, ces composés provoquent des lésions au niveau de la membrane cellulaire de microorganismes ce qui provoque la perturbation de la perméabilité cellulaire et par conséquent une perte des constituants cellulaire et donc la mort de la bactérie (Meincken et al, 2005).

Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *M. pulegium* concordent avec ceux de Mahboubi et Haghi. (2008) qui ont rapporté que cette huile essentielle est pourvue d'une activité antibactérienne contre *S. aureus* avec un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 21mm. Par ailleurs, Ait Ouazzou et al, (2011) ont rapporté que l'huile essentielle de *M. piperita* a une forte activité inhibitrice contre *S. aureus* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 21,4, par contre *P. aeruginosa* a été résistante.

II.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI) et Concentration minimale bactéricide (CMB)

Avant d'utiliser une molécule antibactérienne dans un produit destiné à l'utilisation médicale ou bien agroalimentaire ..., la concentration minimale inhibitrice (CMI) doit être estimée (Hammer et al, 1999). Pour cette raison la CMI des huiles essentielles étudiées a été évaluée ainsi que la CMB. Les Tableaux (4, 5, 6, 7,8 et9) représentent les résultats de la CMI et de la CMB des huiles essentielles testées.

Tableau 4 : CMI des huiles essentielles de *M. piperita* et *M. pulegium* contre *S. aureus*

Concentrations (%)	<i>Staphylococcus aureus</i>											
	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,625	0,312	0,0156	0,0078	Témoin



<i>M.piperita</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>M.pulegium</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 5 : CMI des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* contre *P.aeruginosa*

Concentrations (%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>											
	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	Témoin
<i>M.piperita</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M.pulegium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

En analysant les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *M.piperita* et de *M.pulegium* représentés dans les tableaux 4 et 5 ci-dessus, nous constatons que ces deux huiles essentielles sont dotées d'une activité antibactérienne et ont inhibé les deux souches testées, mais à des CMI différentes. La bactérie à Gram positif *S.aureus* a montré la sensibilité la plus élevée vis-à-vis des deux huiles essentielles tandis que *P.aeruginosa* a montré une forte résistance vis-vis de l'huile essentielle de *M.pulegium*. En effet, la CMI de l'huile essentielle de *M.piperita* était de 0,5% (5µl/ml) pour *S.aureus* et de 5% (50µl/ml) pour *P.aeruginosa* et la CMI de l'huile essentielle de *M.pulegium* était de 1% (10 µl/ml) pour *S.aureus* et de 40% (400 µl/ml) pour *P.aeruginosa*.

Les deux souches ont montré une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *M.piperita* plus élevée par rapport à l'huile essentielle de *M.pulegium*.

Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *M.piperita* ne concordent pas avec ceux de Cronin et al. (1988) et Mossi et al. (2011) qui ont enregistré une valeur de CMI plus élevée pour *P.aeruginosa* et *S.aureus* respectivement.



Les résultats obtenus avec l'huile essentielle de *M.pulegium* ne concordent pas avec ceux de Mahboubi et haggi. (2008) qui ont enregistré une valeur de CMI de l'ordre de 0,5 µl/ml pour *S.aureus*. Par ailleurs, les résultats obtenus pour la souche *P.aeruginosa* ne sont pas en accord avec ceux d'Ait-Ouazzou et al. (2011) qui ont enregistré une CMI supérieure à 30µl/ml. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *M.pulegium* peut être attribuée à la forte concentration en R(+)-pulegone (Hajlaoui et al, 2009) ou encore à l'effet synergique du piperitone avec les autre constituants de cette huile essentielle (Mahboubi et al, 2008). Les résultats des CMB des huiles essentielles *M.pulegium* et *M. piperita* sont illustrées dans les tableaux 6,7, 8 et 9.

Tableau 6 : CMB de l'huile essentielle de *M.piperita* contre *S.aureus*

	<i>Staphylococcus aureus</i>				
Concentrations (%)	8	4	2	1	0,5
<i>M.piperita</i>	-	-	-	+	+

Tableau 7 : CMB de l'huile essentielle de *M.pulegium* contre *S.aureus*

	<i>Staphylococcus aureus</i>			
Concentrations (%)	8	4	2	1
<i>M.pulegium</i>	-	-	-	-

Tableau 8 : CMB de l'huile essentielle de *M.piperita* contre *P.aeruginosa*

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Concentrations (%)	40	20	10	5
<i>M.piperita</i>	-	-	+	+



Tableau 9 : CMB de l'huile essentielle de *M.pulegium* contre *P.aeruginosa*

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Concentration (%)	40
<i>M. pulegium</i>	-

Les deux huiles essentielles *M.piperita* et *M.pulegium* possèdent une activité bactéricide contre les deux souches testées. En effet, la CMB de *M.pulegium* était de 1% (10µl/ml) pour *S.aureus* et de 40% (400 µl/ml) pour *P.aeruginosa*. Tandis que la CMB de *M.piperita* était de l'ordre de 2%(20 µl/ml) pour *S.aureus* et de 20% (200 µl/ml) pour *P.aeruginosa*.

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle de *M.piperita* ne concordent pas avec ceux de Singh et al. (2011) qui ont rapporté que la CMB était de 0,6 % pour *S.aureus*.

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle de *M.pulegium* ne sont pas en accord avec ceux rapportés par Mahboubi et al. (2008) qui ont rapporté que la CMB était de 0,5 µl/ml pour *S.aureus* et ne confirment pas ceux de Ait-Ouazzou et al. (2011) qui ont rapporté que la CMB pour *P.aeruginosa* était supérieure à 30 µl/ml .

En général, la bactérie à Gram positif *S.aureus* a montré une sensibilité aux deux huiles essentielles *M.piperita* et *M.pulegium* supérieure à celle de la bactérie à Gram négatif *P.aeruginosa*.

La différence de l'activité inhibitrice constatée entre les bactéries Gram positif et celles Gram négatif est étroitement liée à la composition de leur paroi cellulaire, car l'activité antibactérienne des huiles essentielles pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants des huiles essentielles avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions.

Les mécanismes d'action probables des huiles essentielles, principalement chez les micro-organismes à Gram positif, sont basés sur le contact direct de leurs composés hydrophobes avec les phospholipides de la membrane cellulaire, ce qui pourrait causer des dommages structurels ou une rupture complète des membranes cellulaires, des pertes des constituants cellulaires et du contrôle interne de la cellule. Cependant, la résistance des Gram négatif est attribuée aux contraintes de diffusion à travers leur membrane externe causée par la présence



d'une barrière hydrophile (Gachkar et al, 2007). La paroi des bactéries Gram⁺ est presque exclusivement constituée de peptidoglycane, auquel sont associés des polymères d'acide téichoïques. Alors que, la paroi des bactéries Gram négatif est plus complexe. Le peptidoglycane, réduit à une fine couche, est entouré par deux membranes. La membrane interne comporte majoritairement des phospholipides alors que la membrane externe présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe, caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS) (Gachkar et al, 2007). Le LPS représente 75% de la surface totale de la membrane externe et établit des interactions spécifiques avec des protéines membranaires, telles que les porines.

Le LPS est constitué de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Son caractère hydrophile rend la membrane externe des bactéries Gram⁻ imperméable à la plupart des molécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des Gram négatif à certains composés hydrophobes. Cette hydrophobicité est la principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles. Alors que chez les bactéries Gram positif, elle permet la solubilisation de ces composés 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 (Yang et al, 2009). 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.

III. Activité antifongique des huiles essentielles

III.1 Concentration minimale inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Fongicide (CMF)

L'activité antifongique des huiles essentielles *M.piperita* et *M.pulegium* a été testée sur deux souches fongiques : une levure *Candida albicans* et une moisissure *Aspergillus niger*.

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ainsi que les Concentrations Minimales Fongicides (CMF) sont illustrées dans les tableaux 10, 11, 12 et 13 ci-dessous.

Tableau 10 : CMI des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* contre *C.albicans*

<i>Candida albicans</i>



Concentrations (%)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156	Témoin
<i>M. piperita</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. pulegium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Tableau 11 : CMI des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* contre *A.niger*

		<i>Aspergillus niger</i>										
Concentrations (%)	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	Témoin
<i>M. piperita</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>M. pulegium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

En analysant les résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielles *M.pulegium* et *M.piperita* représentés dans les tableaux 10 et 11 ci-dessus, nous constatons que les deux huiles essentielles sont pourvues d'une activité antifongique contre les deux souches testées : *Candida albicans* et *Aspergillus niger* mais à des CMI différentes. En effet, la CMI de l'huile essentielle de *M.piperita* était de 0,078%(0,78µl/ml) pour *A.niger* et de 0,25% (2,5µl/ml) pour *C.albicans* alors que la CMI de l'huile essentielle de *M.pulegium* était de 0,156% (1,56 µl/ml) pour *A.niger* et de 0,125% (1,25µl/ml) pour *C.albicans*.

Tableau 12 : CMF de l'huile essentielle de *M.piperita* contre *C.albicans*

		<i>Candida albicans</i>						
Concentrations (%)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	



<i>M. piperita</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
--------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Tableau 13 : CMF de l'huile essentielle de *M.pulegium* contre *C.albicans*

	<i>Candida albicans</i>							
Concentrations (%)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<i>M. pulegium</i>	-	-	-	-	-	-	-	+

Tableau 14 : CMF de l'huile essentielle de *M.piperita* contre *A.niger*

	<i>Aspergillus niger</i>								
Concentrations (%)	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
<i>M. piperita</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 15 : CMF de l'huile essentielle de *M.pulegium* contre *A.niger*

	<i>Aspergillus niger</i>								
Concentrations (%)	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156
<i>M. pulegium</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats illustrés dans les tableaux 14 et 15 ci-dessus, on constate que les deux huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* possèdent une activité fongicide contre les deux souches testées *C.albicans* et *A.niger*. En effet les CMF des deux huiles essentielles étudiées étaient de l'ordre de 40% (400µl/ml) pour les deux souches *C.albicans* et *A.niger*. Les résultats de l'huile essentielle de *M.pulegium* ne sont pas en accord avec ceux de Mahboubi et al.,(2008) qui ont rapporté que les CMI et CMF pour *A.niger* étaient de l'ordre



de 0,25µl/ml et 8µl/ml respectivement, alors que pour *C.albicans* ces deux valeurs étaient de l'ordre de 1 µl/ml et 2 µl/ml respectivement.

Les résultats de l'huile essentielle de *M.piperita* ne concordent pas avec ceux de Saharkiz et al. (2012) qui ont rapporté que les CMI et CMF pour la levure *C.albicans* étaient de l'ordre de 1,5 µl/ml et 3,3 µl/ml respectivement.

IV. Activité antioxydante des huiles essentielles

IV.1 Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I%) a été calculé selon la relation suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* et par le BHT sont enregistrés dans les tableaux 16 et 17 ci-dessous.

Tableau 16 : Pourcentage d'inhibition pour les huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium*

Huiles essentielles testées	Concentration (mg/ml)				
	10	5	2	1	0,5
<i>M. piperita</i> (I%)	70,05±3,2	48,23±0,0	23,30±0,0	13,14±0,9	5,42±0,0
<i>M.pulegium</i> (I%)	72,35±5,7	57,45±0,0	49,86±1,1	22,08±4,7	18,15±1,1

Tableau 17 : Pourcentage d'inhibition pour le BHT

Concentration (mg/ml)	I%
0,1	84,55±0,7
0,05	86,72±0,0
0,0256	86,17±0,3
0,0125	82,52±0,1
0,006	46,61±2,6
0,003	28,99±0,3



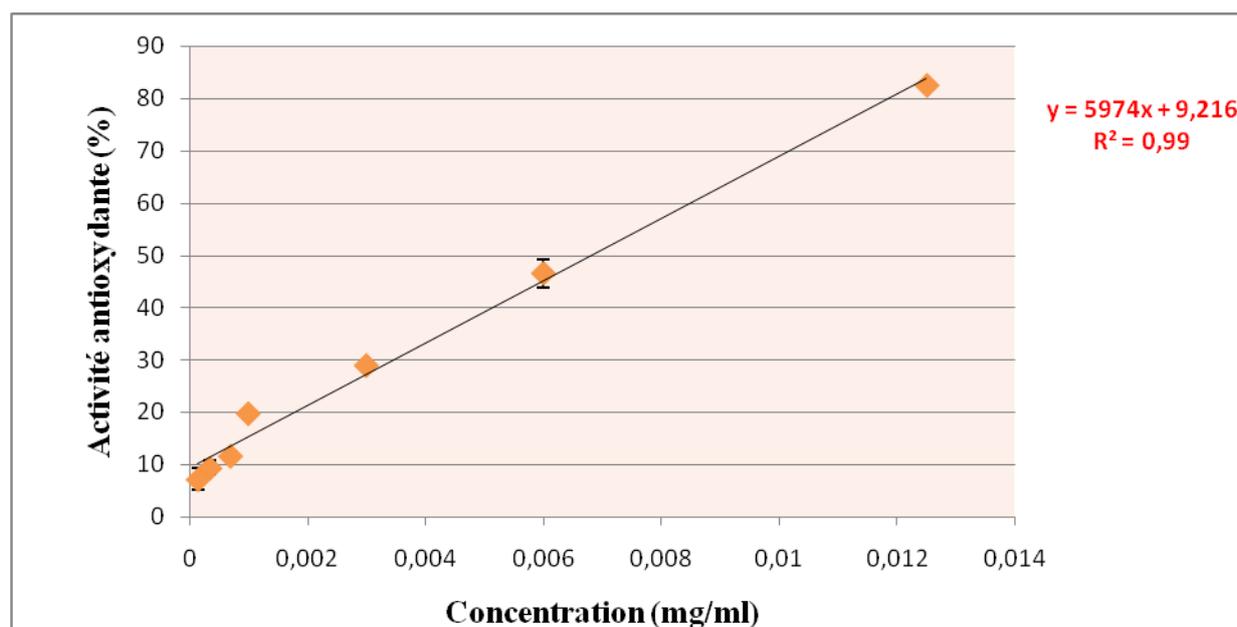
0,001	19,78±0,0
0,0007	11,65±0,7
0,00035	9,34±1,3
0,00015	7,18±2,1

Il semble que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration aussi bien pour les deux huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* que pour le BHT.

Bien que les concentrations utilisées pour le BHT soient largement inférieures à celles utilisées pour les huiles essentielles, on remarque que les pourcentages d'inhibition du radical libre pour les deux huiles essentielles de *M. piperita* et *M. pulegium* étaient inférieurs à ceux du BHT pour les concentrations : 0.0125, 0.0256, 0.05 et 0.1 mg BHT/ml.

IV.2 Détermination d'IC50

IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Le calcul des IC50 des huiles essentielles de *M.piperita* et *M.pulegium* ainsi que du BHT est schématisé dans les figures 11,12 et 13



— **Figure 11** : Variation de l'activité antioxydante en fonction de la concentration en BHT —

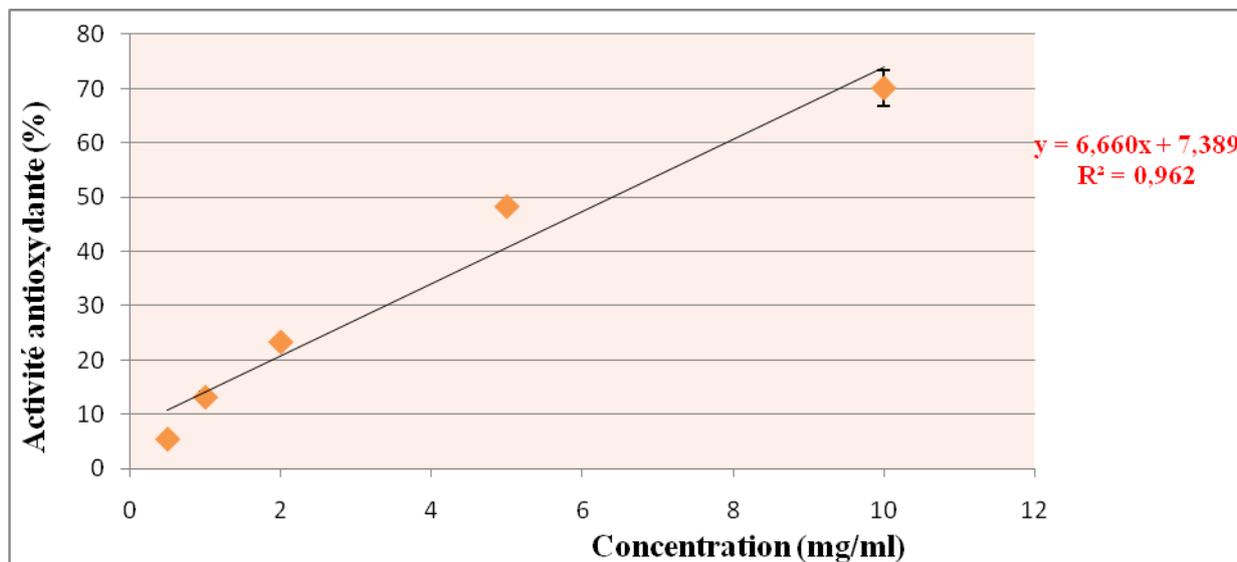


Figure 12 : Variation de l'I% en fonction de la concentration en HE de *M.piperita*

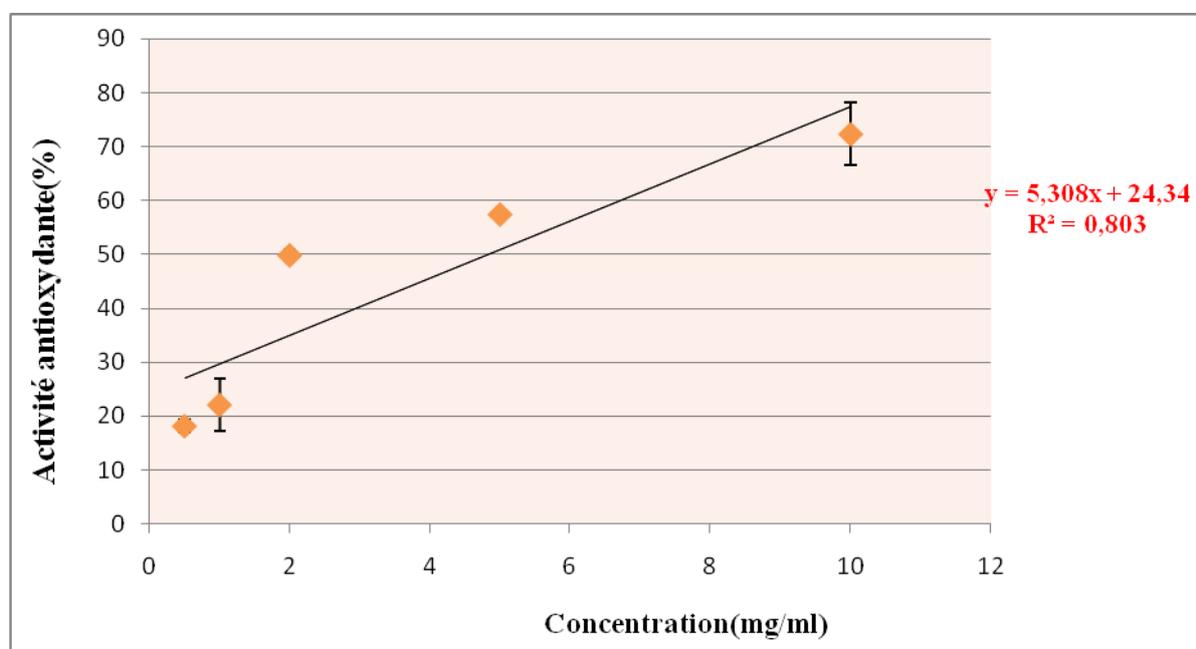


Figure 13 : Variation de l'activité antioxydante en fonction de la concentration en huile essentielle de *M.pulegium*

Les IC₅₀ des huiles essentielles de *M. piperita* (M.poivrée) et de *M. pulegium* (M.pouliot) ainsi que du BHT sont montrées dans la figure 14 ci-dessous.

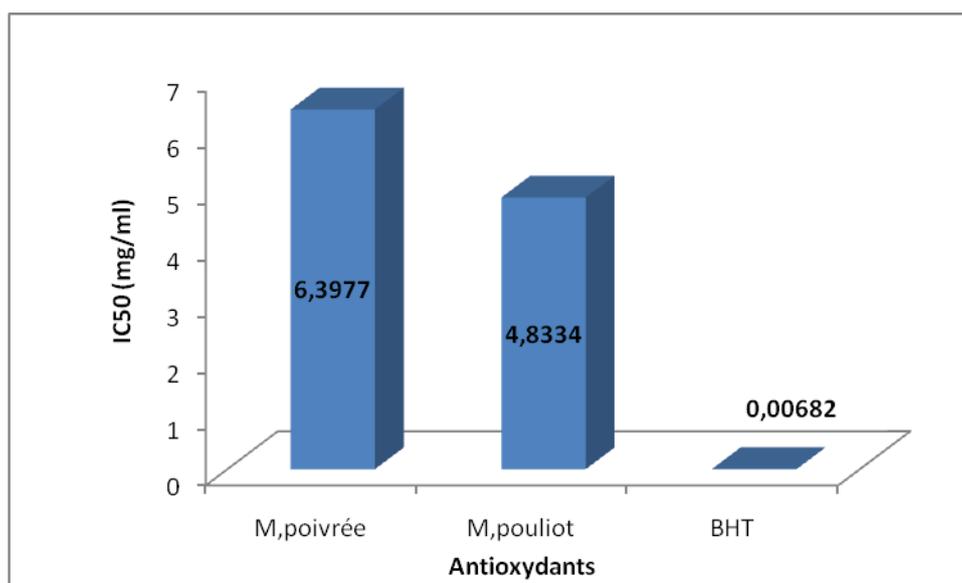


Figure 14 : Valeurs d'IC₅₀

L'huile essentielle de *M.pulegium* a montré une activité antioxydante supérieure à celle de l'huile essentielle de *M.piperita*. En effet, l'huile essentielle de *M.pulegium* a pu ramener le radical libre 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC₅₀ de 4,8334 mg/ml alors que l'IC₅₀ de l'huile essentielle de *M.piperita* était de 6,3977 mg/ml. Les deux huiles essentielles ont montré une activité antioxydante largement inférieure à celle du BHT qui a une IC₅₀ égale à 0,00682 mg/ml.

Il semble d'après ces résultats que le BHT est l'antioxydant le plus efficace avec une IC₅₀ de 0,00682 mg/ml par rapport aux deux huiles essentielles étudiées.

De plus, l'activité antioxydante des deux huiles essentielles serait liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal de ces composés comme réducteurs des radicaux libres a été souligné dans plusieurs rapports (Villano *et al*, 2007).

Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Mimica-dukić *et al*. (2003) qui ont rapporté que l'IC₅₀ de l'huile essentielle de *M.piperita* était de 0,00253 mg/ml et que cette activité est probablement due au menthone.



Les composés majoritaires des huiles essentielles ne sont pas les seuls responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Lu et Foo, 2001 ; Sing *et al*, 2006).

Conclusion et perspectives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antimicrobiens naturels, tel que les huiles essentielles des plantes, vu le rôle qu'ils peuvent jouer dans beaucoup d'applications, à savoir l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique, la parfumerie, etc. Ces produits naturels étaient et restent toujours une source inépuisable de structures complexes et diverses.



Ce travail entre dans le cadre de la valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales marocaines et il a comme objectifs la détermination de la composition chimique et l'évaluation des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles extraites de deux plantes *Mentha pulegium* et *Mentha piperita*.

L'analyse de la composition chimique par CPG/SM a permis d'identifier 26 constituants pour l'huile essentielle de *M. piperita* dont les composés majoritaires sont : le menthol (46,32%), le menthofurane (13,18%), l'acétate de menthyle (12,10%), le menthone (7,42%) ainsi que le 1,8-cineole (6,06%) et 18 constituants pour l'huile essentielle de *M. pulegium* dont les composés majoritaires sont : le R(+)-pulégone (75,48%), le carvone (6,66%) ainsi que le dihydrocarvone (4,64%).

Les deux huiles essentielles ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des 4 souches microbiennes testées. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *M. piperita* a montré une activité inhibitrice sur les bactéries testées plus élevée que celle de *M. pulegium* et que la bactérie à Gram positif *S. aureus* s'est avérée plus sensible que la bactérie à Gram négatif *P. aeruginosa*.

Les deux huiles essentielles ont présenté une activité anti-oxydante mais plus faible en comparaison avec le BHT.

Ces résultats sont très encourageants et indiquent que ces plantes devraient être étudiées plus largement afin d'explorer leur potentiel dans le traitement des maladies infectieuses ainsi que dans la conservation des aliments.

Afin de mieux appréhender les activités de ces huiles essentielles, il serait intéressant de :

- déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités ;
- rechercher les mécanismes d'action de ces deux huiles essentielles sur les microorganismes ;
- Pour une étude beaucoup plus approfondie, on pourra envisager d'autres investigations telles que l'application de ces deux huiles essentielles comme agents de phytomédecation et de conservation des aliments.