

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre

Département de Biologie



Spécialité : Microbiologie Appliquée

Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master

Thème:

Effet antibactérien des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur quelques espèces bactériennes

Présenté par:

Ahmed ben sultan Rima

Sami khouloud

Yekhlef khaoula

Jury :

M^{elle} LATTAB A.

Promotrice

UDBKM

M^{me} Saadi F.

Présidente

UDBKM

M^{me} Benouaklil F.

Examinatrice

UDBKM

Année universitaire: 2019/2020

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'intervention consciente, d'un grand nombre de personnes, Nous souhaitons ici les en remercier.

Il ne nous serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promoteur M^{elle} LATTAB Aïcha pour avoir accepté de nous encadrer et diriger.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Khouloud, Rima et Khaoula

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

*A mes Parents, sans qui, je n'en serais pas là
aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et
leur soutien depuis toujours. Ils ont su me
donner toutes les chances pour réussir.*

A mes frères Walid, Mohammed et Rachid.

A ma sœur Wissam.

A ma petite rose Soudjoud.

A tout ma belle famille.

*A mes chères amies : wissame , Chaima ,
Rima ,khaoula ,Hanane , Ahlam et kanza.*

Et toutes les personnes que j'estime.

Khouloud

Dédicaces

*En ce moment particulier dans ma vie,
Je tiens à dédier ce modeste travail à :*

Mon cher papa

*Ecole de mon enfance, qui a été mon ombre durant
toutes les années des études et à mis à ma disposition
tous les moyens nécessaire pour que je réussisse, et
qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à
me Donner l'aide et à me protéger*

Ma chère maman

*Qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui
s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,
quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as
fait pour moi. Soyez fière de moi aujourd'hui et voyez
à travers ce travail mon amour sincère et ma
Gratitude profonde que dieu vous gardes et protèges
pour moi inshallah.*

A mes chères sœurs :

Ismahane et Nour el yakine

A mes chers frères :

Hadi, Oussama, Rachid

A tout ma famille

A mon promotrice

A tous mes amis et camarades

Rima

Dédicaces

*Je dédier ce modeste travail : A ma mère YAMINA
:TU M'as la lumière de mes jours, la source de
mes efforts, Tu m'as donné ton amour, ta tendresse
et toute ton attention. Dans la difficulté tu as
toujours été prompte à me venir en aide.*

*A mon père LARBI : mon soutien moral et source
de joie et de bonheur, Merci pour l'éducation que
tu as su nous donner et pour tous les efforts
auxquels tu as toujours consentis pour nous voir
réussir. Merci pour tes encouragements et tes
conseils*

*A mon très cher mari RIDHA J'aimerai bien que
tu trouves dans ce travail l'expression de mes
sentiments de reconnaissance les plus sincères car
c'est grâce à ton aide, ta compréhension et ta
patience que ce travail a pu voir le jour.*

*A MES SŒURS ET MES CHERE :
Iman, Souad, Hanane, Youssra, et Ikram pour tes
encouragements et tes conseils.*

Mes belles fleurs : Adam, Ritaj et Douaa.

*une grande dédicace à tous Mes amis :
Hadjar, Mariam, Rima et khouloud*

KHAOULA

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre I : Infections nosocomiales et anti-biorésistance

I.1. Infections nosocomiales	3
I.1.1. Présentation des infections nosocomiales	3
I.1.1.1. Définition	3
I.1.1.2. Epidémiologie	3
I.1.1.3. L'origine	4
I.1.1.4. Les type d'infection nosocomiaux	4
I.1.2. Les principales bactéries responsables des infections nosocomiales	7
I.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	7
I.1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
I.1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
I.2. Anti-biorésistance	14
I.2.1. Les antibiotiques	14
I.2.1.1. Les antibiotiques naturels	14
I.2.1.2. Les antibiotiques synthétiques	14
I.2.1.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques	14
I.2.2. Résistance aux antibiotiques	17
I.2.2.1. La résistance naturelle	17
I.2.2.2. La résistance acquise	17
I.2.3. Mécanismes de résistance	18
I.2.3.1. Modification de la perméabilité membranaire	18
I.2.3.2. Systèmes d'efflux bactériens	18

I.2.3.3. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques	18
I.2.3.4. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques	19

Chapitre II : *Mentha pulegium*

II.1. Historique	20
II 2. Généralité	20
II.3. Description botanique	21
II.4. Systématique	22
II.5. Origine et répartition géographique	23
II.6. Composition chimique	24
II.7. Culture	25
II.8. Propriété et usage	25
II.8.1. Parasiticide	25
II.8.2. Bactéricide	25
II.8.3. phyto-aromathérapie	26
II.8.4. Utilisations médicinales traditionnelles	26
II.8.5. Utilisations médicinales	26
II.8.6. Domaine de l'agriculture	26
II.8.7. Domaine de l'industrie	26
II.9. Toxicologie	27
II.10. Activité Antibactérienne des huiles essentielles de <i>Mentha pulegium</i>	28

Chapitre III : Généralités sur les huiles essentielles

III.1. Généralités sur les huiles essentielles	29
III.1.1. Historique	29
III.1.2. Définition d'huile essentielle	29
III.1.3. Origine des huiles essentielles	30
III.1.4. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes	30
III.1.5. Localisation des huiles essentielles	30
III.1.6. Composition chimique des huiles essentielles	31
III.1.6.1. Les composés terpéniques	31
III.1.6.2. Les composés aromatiques	32
III.1.6.3. Des composés d'origines diverses	33

III.2. La conservation des huiles essentielles	34
III.3. Domaines d'utilisation	34
III.3.1. En pharmacie	34
III.3.2. Phytothérapies	34
III.3.3. En Parfumerie et cosmétologie	35
III.3.4. En industrie alimentaire	35
III.4. Techniques d'extraction des huiles essentielles	35
III.4.1. La distillation	35
III.4.1.1. Hydrodistillation	36
III.4.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	37
III.4.1.3. Distillation à la vapeur directe (Hydrodiffusion)	38
III.4.2. Extraction par solvants	38
III.4.3. L'expression à froid	39
III.4.4. Extraction par micro-ondes	39
III.4.5. Extraction par le CO₂ supercritique	40
III.5. Activités anti-microbiennes des huiles essentielles	41
III.5.1. Activité antibactérienne	41
III.5.2. Activité antifongique	42
III.6. Toxicité des huiles essentielles	43

Chapitre IV : Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

IV. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	44
IV.1. Activité antibactérienne	44
IV.1.1. Généralités	44
IV.1.2. Agents antimicrobiens	44
IV.2. Facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles	44
IV.2. 1. Activité liée à la composition chimique	44
IV.2. 2. Le type des microorganismes cible	45
IV.2.3. Mode d'action des huiles essentielles	45
IV.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne	47

IV.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	47
IV.3.1.1.Méthode de diffusion en milieu solide	47
A. Par la méthode de diffusion en disque (aromatogrammes)	47
B. Par la méthode de diffusion en puits	48
IV.3.1.2. Méthode en phase vapeur (ou Microatmosphère)	48
IV.3.2. Méthode de dilution (Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI))	49
IV.3.2.1.Technique de macro-dilution en milieu liquide	50
IV.3.2.2.Technique de micro-dilution en milieu liquide	51
IV.3.2.3.Technique de macro-dilution en milieu solide	52
IV.3.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide	54
Conclusion	56
Références bibliographiques	57

Liste des abréviations

AFNOR :	Association Française de Normalisation
CPG :	chromatographie en phase gazeuse
DHF :	Dihydrofolate
DHP :	Dihydroptéroate
DL50 :	Dose Létale à 50%
ECBU :	Examen Cytobactériologique des Urines
<i>E. coli :</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEs :	huiles essentielles
IAS :	infections associées aux soins
IN :	infection nosocomiales
INVS :	institut de veille sanitaire.
J.C :	Jésus-Christ
LPS :	Les lipopolysaccharides
MLS :	macrolides, lincosamides, streptogramines
<i>M. pulegium :</i>	<i>Mentha pulegium</i>
MRD :	multirésistance aux drogues
ORL :	Oto-Rhino-Laryngologie
<i>P. aeruginosa :</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
<i>S. aureus :</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SM :	spectromètre de masse
THF :	Tétrahydrofolate
TIAC :	intoxication alimentaires individuelles ou collectives

Liste des figures

- Figure 1 :** Observation microscopique de coloration de Gram d'*Escherichia coli*
- Figure 2 :** Observation microscopique de coloration de Gram de *Staphylococcus aureus*
- Figure 3 :** Observation microscopique de coloration de Gram de *Pseudomonas aeruginosa*
- Figure 4 :** Modes d'action des antibiotiques
- Figure 5 :** Morphologie de *Mentha pulegium*
- Figure 6 :** Répartitions géographique de la Menthe par le monde
- Figure 7 :** Structure de la molécule d'isoprène
- Figure 8 :** Structure chimiques de quelques composés aromatiques
- Figure 9 :** Structures chimiques des composées rencontrées dans les huiles essentielles.
- Figure 10 :** Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation.
- Figure 11 :** Principe schématisé de l'appareillage d'entraînement à la vapeur d'eau.
- Figure 12 :** Principe schématisé de différentes étapes d'hydro-diffusion.
- Figure 13 :** Technique d'extraction par solvant.
- Figure 14 :** Extraction assisté par micro-ondes.
- Figure 15 :** Montage d'extraction par les fluides supercritiques.
- Figure 16 :** Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.
- Figure 17 :** Principe de la méthode de diffusion par disque.
- Figure 18 :** Illustration de la méthode de micro-atmosphère.
- Figure 19 :** Méthode de lecture de la Concentration Minimale Inhibitrice.
- Figure 20 :** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de macro-dilution en milieu liquide.
- Figure 21 :** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.
- Figure 22 :** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de macro-dilution en milieu solide.
- Figure 23 :** Présentation de la méthode E-test (Méthode de diffusion et de dilution).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modes d'action des principales classes d'antibiotiques.

Tableau 2 : Composition des huiles essentielles extraites de *Mentha pulegium*.

Résumé

L'usage extensif des agents antibactériens dans la médication humaine a conduit à l'apparition de souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers des nouvelles molécules (Mebareki, 2010), où une bonne partie des recherches scientifiques s'oriente actuellement vers la voie de l'usage des extraits biologiques actifs des plantes médicinales, notamment vers les huiles essentielles (Essawi et Srour, 2000).

Dans ce cadre nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur quelques espèces bactériennes » *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*«, mais à cause le cas exceptionnelle de cette année cette étude ne pote que la partie bibliographique.

On a présenté les principales bactéries responsables des infections nosocomiales et leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques. Puis on a fait une recherche sur la plante choisie (*Mentha pulegium*), où on a cité des travaux sur l'activité antibactérienne de cette plante où plusieurs études montrent la propriété antibactérienne de cette plante.

Ensuite on ajouté une étude sur les huiles essentielles et les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne pour prendre quelque connaissances sur les différentes techniques d'extraction et les techniques qu'on peut utiliser pour l'étude de l'effet antibactérien d'un composé ou d'un extrait biologique.

Mots-clés : Les huiles essentielles, *Mentha pulegium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, infections nosocomiales.

الملخص

أدى الاستخدام المكثف للعوامل المضادة للبكتيريا في العلاجات البشرية إلى ظهور سلالات جرثومية مقاومة، ومن هنا جاءت أهمية توجيه البحث نحو مركبات جديدة (Mebareki ، 2010)، حيث ان الكثير من الابحاث العلمية تتجه حاليًا نحو استخدام المستخلصات البيولوجية النشطة للنباتات الطبية ، وخاصة الزيوت الأساسية. (Essawi et Srour, 2000)

في هذا السياق، اهتمينا بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية من النعناع البري على عدد من الأنواع البكتيرية « *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, E. coli* »، ولكن نظرًا للحالة الاستثنائية لهذا العام، فإن هذه الدراسة تستعرض الجزء البيليوغرافي فقط.

استعرضنا البكتيريا الرئيسية المسؤولة عن التهابات المستشفيات وآليات مقاومتها للمضادات الحيوية. ثم قمنا بإجراء بحث على النبتة *Mentha pulegium* ، حيث استشهدنا بأبحاث حول النشاط المضاد للبكتيريا لهذا النبات حيث أظهرت العديد من الدراسات الخاصة المضادة للبكتيريا لهذا النبات.

كما أضفنا دراسة عن الزيوت الأساسية وطرق تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لاكتساب بعض المعرفة حول تقنيات الاستخلاص المختلفة وتقنيات التي يمكن استخدامها لدراسة التأثير المضاد للبكتيريا لمركب أو مستخلص بيولوجي.

الكلمات الرئيسية :

الزيوت الأساسية، النعناع البري *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* التهابات المستشفيات

Abstract

The extensive use of antibacterial agents in human medication has led to the appearance of resistant microbial strains, hence the importance of orienting research towards new molecules (Mebareki, 2010), where much of the scientific research is currently moving towards the use of active biological extracts of medicinal plants, in particular towards essential oils (Essawi and Srour, 2000).

In this present work, we investigated the antibacterial activity of essential oils of *Mentha pulegium* on a few bacterial species »*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*«, but due to the exceptional case of this year this study only reviews the bibliographic part.

We presented the main bacteria responsible for nosocomial infections and their mechanisms of resistance to antibiotics. Then we did a research on the plant (*Mentha pulegium*), where we cited work on the antibacterial activity of this plant where several studies show the antibacterial property of this plant.

Then we added a study on essential oils and methods of evaluating antibacterial activity to gain some knowledge on the different extraction techniques and techniques that can be used for the study of the antibacterial effect of a compound or a biological extract.

Key words : Essential oils, *Mentha pulegium* . *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial infections.



Introduction

Introduction

Depuis leur découverte au début du XXème 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'antibiothérapie 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).

De plus, l'usage extensif des agents antibactériens dans la médication humaine a conduit à l'apparition de souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers des nouvelles molécules (Mebareki, 2010), où une bonne partie des recherches scientifiques s'oriente actuellement vers la voie de l'usage des extraits biologiques actifs des plantes aromatiques et médicinales, notamment vers les huiles essentielles (Essawi et Srour, 2000). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 75 à 95% des populations rurales (particulièrement dans les pays en développement) font recours à la médecine traditionnelle faite en grande partie à base de plantes (OMS, 2003). Il a été prouvé qu'environ 20% des espèces végétales dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques ou cosmétiques, car elles contiennent des molécules ou des principes actifs à différentes propriétés biologiques, qui trouvent leur application dans divers domaines (médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture, etc.) (Suffredini *et al.*, 2004).

L'Algérie compte parmi les pays du bassin méditerranéen les plus riches en ressources phylogénétiques à intérêt aromatique et médicinal, vu la diversité de ses étages bioclimatiques. On dénombre plus de 300 espèces à usage thérapeutique ou aromatique existant parmi les 3 150 espèces végétales que compte notre pays (Moral, 2002 ; Nait, 2012).

Actuellement, les plantes aromatiques et médicinales possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles et leurs extraits dans la médecine et dans d'autres domaines d'intérêt économique.

Les huiles essentielles par exemple, également appelées huiles odoriférantes volatiles, sont des liquides huileux aromatiques extraits de différentes parties de plantes ; les feuilles, les écorces, les fleurs, les bourgeons, les graines, etc. (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). Ces

substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants peuvent être utilisées pour résoudre de différents problèmes.

La menthe pouliot, connue sous le nom vernaculaire arabe de « fliyou », est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures (Agnihotri *et al.*, 2005 ; DiazMaroto *et al.*, 2007). Les parties aériennes fleuries de cette plante sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (Zargari, 1990; Delille, 2007).

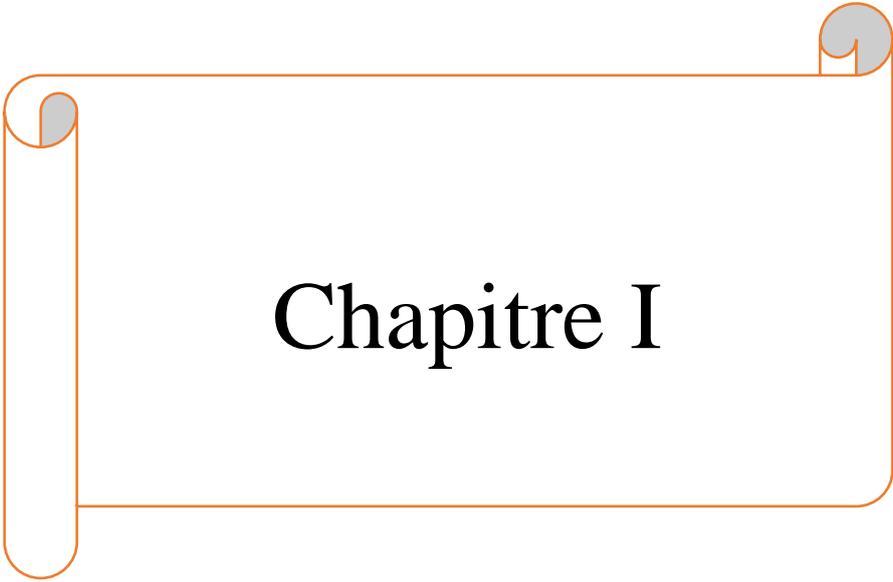
L'objectif de notre travail est l'étude d'effet antibactérien des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur quelques espèces bactérienne, mais à cause le cas exceptionnelle de cette année cette étude ne pote que la partie bibliographique qui englobe quatre chapitres.

Dans le premier chapitre, on a présenté et cité les principales bactéries responsables des infections nosocomiales, les différents types des antibiotiques, modes d'action et les mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Dans le deuxième chapitre, on a présenté la plante choisie (*Mentha pulegium*), leur composition chimique et ses propriétés et usages dont on a cité l'activité antibactérienne de cette plante.

Pour le troisième chapitre, on a présenté les huiles essentielles (origine, rôle, localisation), composition chimique et les différentes techniques d'extraction.

Alors que le quatrième chapitre (Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles) est ajouté pour prendre quelque connaissance sur des techniques qu'on peut utiliser pour l'étude de l'effet antibactérien d'un composé ou d'un extrait biologique.



Chapitre I

I.1. Infections nosocomiales

I.1.1. Présentation des infections nosocomiales

I.1.1.1. Définition

L'infection est le résultat de l'agression d'un organisme vivant par un microorganisme. Elle se traduit par des altérations anatomiques ou fonctionnelles, par des manifestations cliniques et biologiques, qui résultent du déséquilibre entre la virulence de l'agent pathogène et les capacités de résistance et de défense de l'hôte.

Depuis novembre 2006, les infections nosocomiales (IN) sont intégrées aux infections associées aux soins (IAS). La notion d'IAS ne se limite plus aux risques infectieux au niveau des établissements de santé, mais rassemble dans un même champ l'ensemble des infections survenues lors de prises en charge relevant à la fois de l'hospitalisation et des soins de ville (Siebert et Crouzilles, 2010 ; Crouzilles, 2011).

I.1.1.2. Epidémiologie

Selon l'enquête menée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) en 2006, 4,97 % des patients pris en charge dans 2 337 établissements de santé (soit environ 95 % des lits d'hospitalisation) présentaient plusieurs infections nosocomiales, soit 1 patient sur 20. Par rapport à 2001, ce taux a diminué de 8 % (Anonyme 1).

Les infections urinaires (30,3%) sont les plus fréquentes devant les pneumopathies infectieuses (14,7%) et les infections du site opératoire (14,2%). Sont ensuite touchées la peau et les tissus mous (10,2 %), puis les voies respiratoires supérieures (6,4%) (Anonyme 1).

La majorité des infections nosocomiales se développe après environ 48 heures d'hospitalisation. On considère également comme infection nosocomiale une maladie secondaire à un germe acquis à l'hôpital avant la sortie du malade. Le meilleur exemple est sans doute celui des infections survenant après l'intervention chirurgicale et qui se développent des jours voire des semaines après la sortie du malade.

Différentes enquêtes effectuées aux États-Unis ont montré que 5 % des patients admis dans une unité de soins intensifs acquièrent une nouvelle infection. Ceci a des répercussions financières et de santé publique au point que l'on estime que le taux de décès a doublé chez les patients qui développent une infection nosocomiale.

Il n'est pas nécessaire que le patient présente une diminution de ses capacités de défense immunitaire pour contracter une maladie nosocomiale (Raymond et Aujard, 2000).

I.1.1.3. L'origine

Les infections nosocomiales peuvent être directement liées aux soins ou simplement survenir lors de l'hospitalisation indépendamment de tout acte médicale alors il existe plusieurs types relevant de modes de transmission différent :

- **Une origine endogène** : c'est à dire que le malade se contamine par ses propres germes, à l'occasion d'un acte invasif et/ou en raison d'une situation médicale du patient c'est à dire son âge et sa pathologie, ses traitements, la qualité des soins, la présence de germes pathogènes pour certains patients fragilisés (Faure, 2002). Les infections endogènes représentent 50 % au moins des infections nosocomiales (Faure, 2002).
- **Une origine exogène** : qui sont soit des infections croisées transmises d'un malade à l'autre, soit des infections provoquées par les germes du personnel porteur, soit des infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (Faure, 2002). Ces deux origine peuvent être causées par :
 - un manque de bonnes pratiques d'hygiène (absence de lavage des mains).
 - les progrès de la médecine et de la chirurgie avec l'apparition de nouvelle technique thérapeutique de plus en plus agressifs qui peuvent être des possibles sources d'infections (Faure, 2002).

I.1.1.4. Les types d'infection nosocomiaux

➤ Infections urinaires nosocomiales

Les simples colonisations urinaires (ou bactériuries asymptomatiques) ne sont pas des infections associées aux soins. Pour les formes symptomatiques, les signes classiques sont les suivants :

- fièvre.
- douleur.
- envies impérieuses.
- pollakiurie.
- brûlures mictionnelles ou douleurs sus pubiennes.

La preuve est toujours microbiologique. L'Examen Cytobactériologique des Urines (ECBU) est considéré comme positif en fonction de valeurs seuils :

- sans sondage vésical ni autre abord de l'arbre urinaire : leucocytaire ($\geq 10^4$ leucocytes/ml) et uro-culture positive ($\geq 10^3$ micro-organismes/ml) et au plus 2 espèces microbiennes isolées, avec sondage vésical ou autre abord de l'arbre urinaire, en cours ou dans les 7 jours précédents : uro-culture positive ($\geq 10^5$ micro-organismes/ml) avec au plus 2 espèces microbiennes isolées. Il existe des spécificités gériatriques (Stammn, 1986).

➤ Infections des voies respiratoires et pneumopathie

La fréquence des infections respiratoires nosocomiales est environ de 10 à 15%. Dans les services de réanimation, elles sont très fréquentes, représentant en moyenne 30% des infections nosocomiales.

La source principale d'infection est la flore or pharyngée et les bactéries d'origine digestive qui colonisent les voies respiratoires par voie ascendante et rétrograde. Les facteurs posturaux tel que le décubitus qui favorise les micro-inhalations par reflux, l'existence d'une sonde gastrique et les antiacides qui altèrent la barrière gastrique, favorisent cette colonisation. La ventilation artificielle représente le facteur de risque principal d'infection. La sonde d'intubation et la canule de trachéotomie sont des corps étrangers qui entraînent nécessairement un processus inflammatoire de la muqueuse laryngée et/ou trachéale à leur contact. Par ailleurs, les moyens de défense locaux du patient placé sous ventilation mécanique sont notablement moins efficaces :

- le rôle de filtre, représenté par les fosses nasales et le pharynx, est complètement court-circuité.
- les réflexes de toux et d'éternuements ne peuvent plus jouer leur rôle.
- la qualité du mucus et les structures ciliaires sont altérées.

Les sécrétions bronchiques sont plus abondantes et moins bien évacuées ; ceci est favorisé par l'immobilité. L'intubation multiplie de risque de pneumopathie nosocomiale par plus de 20.

Les aspirations trachéales par la sonde d'intubation ou la trachéotomie peuvent également être source d'infections, notamment quand elles ne sont pas réalisées dans les règles d'hygiène et d'asepsie (Stammn, 1986).

➤ **Infections du site opératoire**

Les infections de site opératoire sont des infections nosocomiales survenant suite à une intervention chirurgicale. Elles dépendent de l'environnement pré-, per- et postopératoire du malade ainsi que de l'équipe soignante, les défenses immunitaires de l'hôte et surtout le niveau de propreté de l'acte chirurgical (Fournel, 2017).

➤ **Bactériémies et septicémies**

Elles représentent environ 6% des infections nosocomiales. Les bactériémies sont la première cause de mortalité attribuable à l'infection nosocomiale, bien que la létalité par bactériémie ait diminuée au cours des dernières années.

Les dispositifs intra vasculaires sont la source principale, représentant environ 1/3 des bactériémies nosocomiales. Un foyer infectieux à distance peut également être associé à une bactériémie nosocomiale, en particulier un foyer urinaire, pulmonaire et digestif (Amiar et Bendjama, 2011).

➤ **Les infections sur cathéter :**

Le cathéter peut être contaminé par des bactéries qui migrent le long de la surface externe des tubulures, par contamination manu portée par le personnel médical et paramédical ou par voie hématogène c'est-à-dire par des germes présents dans la circulation sanguine qui viennent «s'accrocher» au cathéter. Les seuls signes cliniques peuvent être l'aspect inflammatoire du point de ponction (point où le cathéter entre dans la peau) et écoulement purulent. Mais le risque est que l'infection du cathéter entraîne une bactériémie, c'est-à-dire la circulation des bactéries dans le sang qui peut donner une infection généralisée. Le traitement consiste en général, à enlever le cathéter en cause si c'est possible et à un traitement antibiotique (Stammn, 1986).

I.1.2. Les principales bactéries responsables des infections nosocomiales

I.1.2.1. *Escherichia coli*

❖ Généralités

Escherichia coli (ou *E. coli* ou colibacille) est une bactérie (organisme procaryote) appartenant à la famille des *Entérobactéries*. Le colibacille est un bacille, bactérie en forme de bâtonnet, à coloration de Gram négative. *Escherichia coli* possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. Elle se réplique très rapidement à 37°C, toutes les 20 minutes, ce qui permet de multiplier facilement de l'ADN ou des protéines d'intérêt (Buagnicont, 1995).

E. coli, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines. C'est une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur, sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente (Nauciel et Vildé, 2005) (figure1).

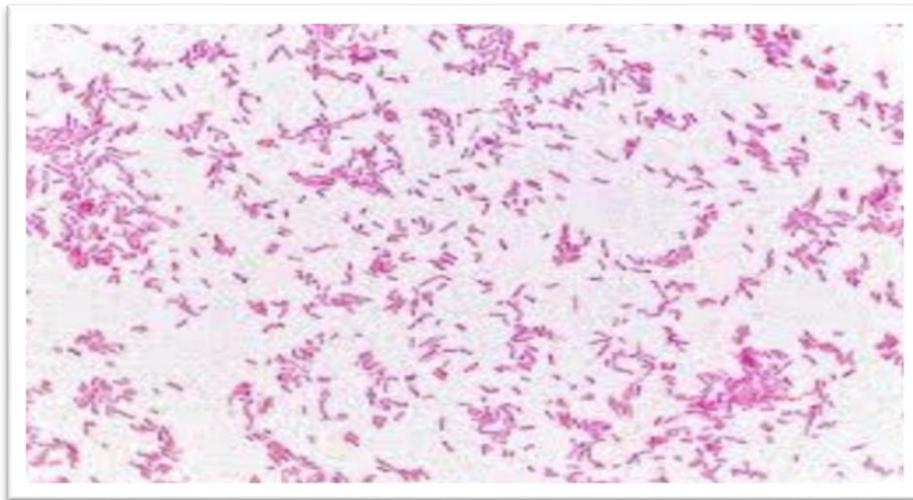


Figure 1 : Observation microscopique de coloration de Gram d'*Escherichia coli* (Anonyme 2).

❖ Taxonomie

(Djelouat , 2011).

Règne	<i>Procaryotae</i>
Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

❖ Pouvoir pathogène

La majorité des souches d'*E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. Les *E. coli* ont le même pouvoir invasif que *Shigella*. Ils multiplient à l'intérieur des cellules et où ils causent des inflammations avec des diarrhées (Syndrome schigellose) sanglantes riches en mucus et leucocytes (Nauciel et validé, 2005).

C'est une bactérie communément trouvée dans les intestins des mammifères et des humains. Il en existe différentes formes dont certaines sont pathogènes, provoquant de gastro-entérites ayant des traductions cliniques variables : diarrhées d'allure banale, diarrhée sanglante. Chez le nourrisson la diarrhée peut entraîner assez rapidement un état de déshydratation (Nauciel et Vildé, 2005). Elle peut aussi causer des infections de méningites ou une septicémie (Eyquen et Montgner, 2000).

Le point de départ de l'infection est le plus souvent le tube digestif des animaux, notamment les bovins. La contamination se fait ensuite chez l'homme par voie orale, par ingestion d'aliments contaminés. Une fois à l'intérieur de l'organisme, les souches pathogènes vont coloniser la flore intestinale et s'y multiplier. L'*Escherichia coli* peut également se transmettre via contact direct par les mains avec des animaux contaminés ou avec des personnes infectées.

I.1.2.2. *Staphylococcus aureus*

❖ Généralités

En 1880, le chirurgien Sir Alexander Ogston a décrit pour la première fois les *Staphylocoques* et a créé le genre *Staphylococcus*. C'est en 1884 que *S. aureus* a été nommé par le Docteur Rosenbach d'après la pigmentation dorée des colonies en culture pure obtenues d'isolat de lésions purulentes (Beaudry, 2011).

S. aureus est une bactérie à coloration de Gram positive (Le Minor et Véron., 1984). En microscopie, il peut être isolé en paire ou en tétrade, mais le plus souvent il forme des amas ressemblant à des grappes (figure 2).

S. aureus est une bactérie immobile, non sporulante et aéro-anaérobie facultative, possédant à la fois de la catalase et coagulase positive (Beaudry, 2011 ; Kara, 2014 ; Bernier, 2015). La température optimale de croissance de *S. aureus* est comprise entre 30 et 37°C et le pH optimal est entre 7 et 7,5. *S. aureus* est résistant à la bacitracine et aux conditions diverses comme la concentration en NaCl, la chaleur, les désinfectants et la présence de lysozyme (Beaudry, 2011).

S. aureus est considéré comme une bactérie redoutable par son pouvoir pathogène et son habilité à déjouer le mode d'action de l'arsenal thérapeutique disponible (Rebiahi *et al.*, 2014).

Chez l'Humain, *S. aureus* colonise principalement le nez mais peut aussi se trouver dans le système gastro-intestinal et les aisselles (Beaudry, 2011 ; Bernier, 2015).

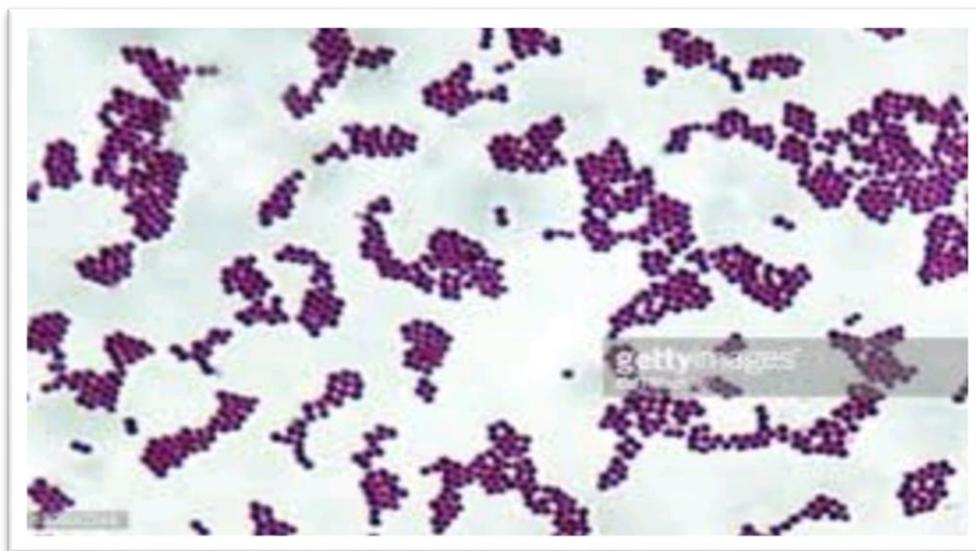


Figure 2 : Observation microscopique de coloration de Gram de *Staphylococcus aureus* (Anonyme 3).

❖ Taxonomie

Selon la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les *Staphylocoques* sont classés parmi les bactéries à coloration de Gram positive, dans le phylum des Firmicutes (Dolarras, 2007 ; Prescott *et al.*, 2010 ; Rebiahi, 2012).

Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

❖ Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus comporte deux sous espèces :

- *S. aureus* subsp. anaerobius, bactérie à catalase (-) et pathogène pour l'animal.
- *S. aureus* subsp. aureus, bactérie pathogène par virulence (elle fabrique des protéines de surface et des enzymes dont la coagulase libre et la thermonucléase) et par toxinogénèse (elle produit diverses toxines, dont des entérotoxines de différents types antigéniques : A à F) (Dolarras, 2007).

Staphylococcus aureus, espèce de *Staphylococcus* à coagulase positive, est fréquemment rencontré chez l'homme. Il peut être responsable d'infections cutanées (impétigo, furoncles...), d'infections de la sphère ORL (sinusites, otites...), d'infections diverses et d'infections septicémiques redoutables, d'infections nosocomiales, et d'intoxication alimentaires individuelles ou collectives (TIAC) (Dolarras, 2007).

I.1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

❖ Généralités

P. aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative (figure 3) de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle est aussi appelée bacille pyocyanique en raison de sa forme allongée et de la production de pigments bleus et verts par la bactérie : la pyocyanine et la pyoverdine.

La bactérie a été découverte en 1882 par Carle Gessard, un pharmacien des armées et bactériologiste français. Une expérience sur les colorations bleues et vertes du pus laissé sur les bandages recouvrant les plaies des soldats lui a fait identifier un pigment soluble dans l'eau et fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière ultraviolette. Son étude l'amène à isoler la bactérie et à conclure sur la nature pathogène de *P. aeruginosa* et à classer la souche (Gessard, 1984).

Ce micro-organisme est ubiquitaire et se retrouve sous forme de saprophyte, en particulier dans les milieux humides : la bactérie a pour habitat naturel l'eau douce, le sol et les plantes. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobic stricte, c'est-à-dire qu'elle a besoin d'oxygène pour vivre et se développer.

P. aeruginosa se retrouve sous deux phénotypes distincts :

- Une forme planctonique : les bactéries sont mobiles grâce à leurs flagelles et leurs pili.
- Une forme communautaire : les bactéries s'agrègent sous forme de biofilms.

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé. Il est constitué d'environ 6,3 Mb, ce qui en fait l'un des plus grands génomes bactériens connus. 8,4 % de son génome est constitué de gènes impliqués dans la régulation, ce qui permet à la bactérie une grande adaptabilité (Stover *et al.*, 2000).

Grace à ses nombreux facteurs de virulence et à sa capacité d'adaptation, la bactérie est capable d'infecter un large spectre d'hôtes, allant des plantes aux mammifères en passant par certains insectes.

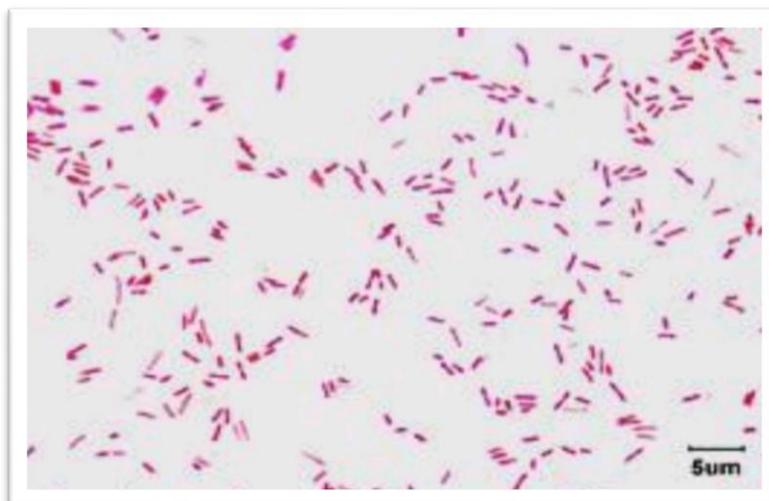


Figure 3 : Observation microscopique de coloration de Gram de *Pseudomonas aeruginosa* (Anonyme 4).

❖ **Taxonomie**

(Chaker, 2012).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

❖ Pouvoir pathogène

P. aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes. Elle provoque de nombreuses infections parmi ceux-ci :

➤ Infections pulmonaires

- **Patients de réanimation** souvent colonisés par *P. aeruginosa* au niveau bronchique, évolution rare mais grave vers une pneumopathie mono ou bilatérale nécrosante et une septicémie avec choc septique (>30% de mortalité) (Anonyme 5).
- **Patients atteints de mucoviscidose** colonisés à plus de 80% par la bactérie au niveau bronchique ; facteur d'inflammation locale et de détérioration de la fonction pulmonaire (Anonyme 5).

➤ Septicémies

Elles représentent 10 à 20 % des septicémies à bacilles à coloration de Gram négative. L'immunosuppression favorise leur survenue et elles sont décrites avec une fréquence élevée au cours du sida. Elles ne présentent pas de caractères cliniques particuliers si ce n'est la présence exceptionnelle de manifestations cutanées, faites de vésicules riches en bacilles, entourées d'un halo violacé, évoluant vers l'ulcération nécrotique, traduisant la dissémination par voie artérielle. La leucopénie et l'hypothermie sont inconstantes.

Le pronostic est grave (mortalité voisine de 50 %) lié à la maladie sous-jacente, à la localisation primitive, à l'accessibilité ou non du foyer à un geste chirurgical (Anonyme 6).

➤ Infections superficielles

- **Surinfections** de plaies, d'escarres, de brûlures...
- **Folliculites et otites externes** bénignes après baignade (jacuzzis)
- **Conjonctivites et kératites** chez les porteurs de lentilles.
- **Fonte purulente** de l'œil après chirurgie (exceptionnelle) (Anonyme 5).

➤ Infections diverses

- Infections urinaires chez les personnes porteuses d'une sonde (Anonyme 5).

I.2. Anti-biorésistance

I.2.1. Les antibiotiques

I.2.1.1. Les antibiotiques naturels

Parmi les 10 000 antibiotiques d'origine naturelle recensés dans le monde, 20% proviennent de champignons : *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, 70% proviennent d'actinomycètes microfilaments dont le genre *Streptomyces* est un producteur majeur d'antibiotiques : tétracyclines, aminoglycosides et 10% proviennent des bactéries (non actinomycètes), en particulier des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. La bacitracine utilisée pour certains traitements locaux en est un exemple (Mehdi, 2008).

I.2.1.2. Les antibiotiques synthétiques

Les antibiotiques synthétiques sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des substances primitivement extraites de micro-organismes. Parmi les antibiotiques d'origine synthétiques on distingue : Sulfamides, Métronidazole, Isoniazide, Acide nalidixique, les Fluoroquinolones et les Pénèmes.

On distingue aussi des antibiotiques d'origine semi-synthétique, ils sont obtenus en modifiant en laboratoire une substance produite par un microorganisme (Mehdi, 2008).

I.2.1.3. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (figure 4).

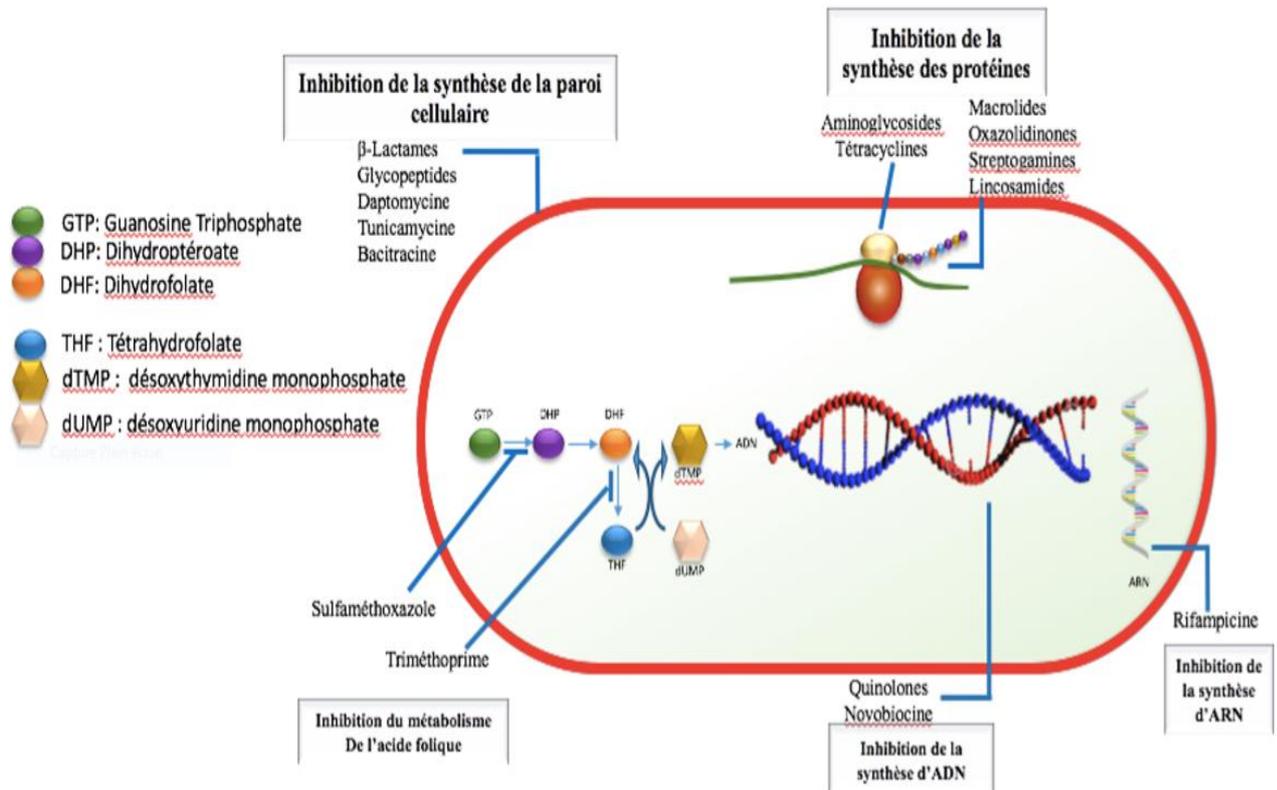
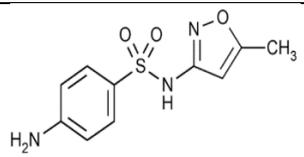
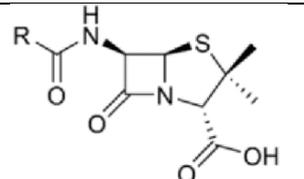
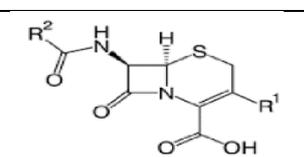
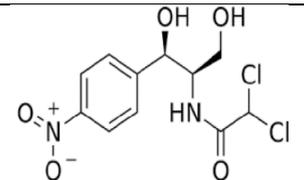
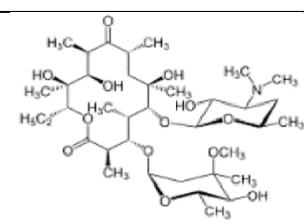
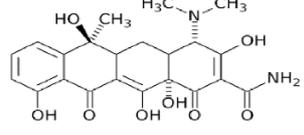
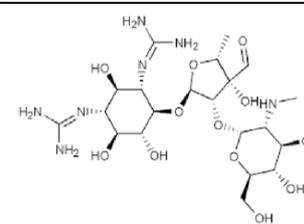
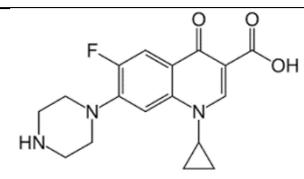


Figure 4 : Modes d’action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

DHP : Dihydroptéroate ; DHF : Dihydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate.

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l’ADN, mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (Tableau 1).

Tableau 1 : Modes d'action des principales classes d'antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

Classe	Origine	Mode d'action	Exemple	Structure chimique
Sulfamides	Synthétique	- Inhibent la synthèse de l'acide folique - Entraînent une diminution de la production	Sulfaméthoxazole	
β-Lactames de 1 ^{ère} génération	<i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Inhibent la synthèse du péptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Pénicilline	
	<i>Cephalosporium</i>		Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Chloramphénicol	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	Erythromycine	
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>		Tétracycline	
Aminoglycosides	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	Streptomycine	
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	

La complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels, qui entrent dans la constitution des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette haute spécificité, associée à l'exceptionnelle capacité d'adaptation des bactéries, participe, avec autres facteurs, à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (Guinoiseau, 2010).

I.2.2. Résistance aux antibiotiques

I.2.2.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible. Ainsi, l'absence de paroi chez les mycoplasmes rend les β -lactamines inactives vis à vis de ces bactéries (Mehdi, 2008).

I.2.2.2. La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky, 2006). La France, malgré une décroissance de sa consommation, peut-être liée aux campagnes publiques de sensibilisation, reste le second pays consommateur d'antibiotiques en Europe. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, et aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006).

I.2.3. Mécanismes de résistance

I.2.3.1. Modification de la perméabilité membranaire

Les lipopolysaccharides (LPS) sont constitués 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. Leurs caractères hydrophiles rendent la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002).

I.2.3.2. Systèmes d'efflux bactériens

Les premiers cas de résistance par efflux ont été mis en évidence pour des agents chimiothérapeutiques, efflués par la glycoprotéine P des cellules cancéreuses de mammifères (Juliano et Ling, 1976). L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (Levy et McMurry, 1978).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structures très différentes et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MRD : multirésistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004).

I.2.3.3. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Wright, 2005).

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêtalactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les Tétracyclines, pour la Fosfomycine et plus récemment pour les Fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules.

L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009).

I.2.3.4. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (Lambert, 2005). Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible.

La biosynthèse du peptidoglycane est assurée par une transpeptidase. L'acquisition d'une transpeptidase modifiée confère la résistance à la méthicilline et aux autres β -lactames, à de nombreuses bactéries, incluant les SARMs (Enright *et al.*, 2002).



Chapitre II

II. *Mentha pulegium*

II.1. Historique

La menthe est l'une des plantes médicinales les plus célèbres que l'on connaît depuis longtemps. On a retrouvé en effet des feuilles de menthe séchées vieilles d'environ 3000 ans dans les pyramides égyptiennes. Tandis que les Grecs et les Hébreux s'en parfumaient, les Romains en glissaient dans leur vin et leurs sauces. 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.

Originnaire d'Asie et de l'Europe médiévale, la menthe est un aromate connu pour sa prolifération rapide. Libérant un parfum très fort et agréable, elle embaumait les temples grecs et les demeures des Hébreux. Elle éloignait également les puces et assaisonnaient les mets (Addadi et Ferradji, 2014).

II.2. Généralité

La *Mentha pulegium* Linné, 1753 appelée localement « Fliou » (Lemordant *et al.*, 1977 ; Bellakhdar, 1978) et également appelée pouliot, pouliot royal, herbe aux puces, chasse puce, herbe de Saint Laurent ou frétille. Le nom de pulegium vient de latin de pulex, la puce car la plante a la propriété d'éloigner les puces (Bekhechi, 2008).

Les Menthes désignent un genre de dicotylédones gamopétales, de l'ordre des Lamiales et de la famille des *Lamiacées*, La *Mentha* formée de près de 3500 espèces réparties sur 8 sous-familles, près de la moitié (47%) des *Lamiaceae* sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae* (Bruneton, 1993). Au sein de la sous-famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate.

Elle est toxique à forte dose et peut provoquer l'avortement. Cette plante a aussi la particularité d'être insecticide puisqu'elle a été déjà utilisée pour faire éloigner les insectes.

Le genre *Mentha*, est responsable d'environ 2000 tonnes d'huile essentielle dans le monde entier, ce qui en fait le deuxième genre producteurs des huiles essentielles les plus importantes, après le genre Citrus.

Parmi toutes les labiées (*Lamiaceae*), 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. Les menthes ne dépassant pas 1 m, à tiges quadrangulaires, à feuilles pétiolées ou sessiles, arrondies ou ovales, plus ou moins dentées, à fleurs presque régulières mauves, roses ou blanches. Les quatre parties des fruits sont ovoïdes, parfois verruqueuses, l'odeur est forte et agréable, plus ou moins fine, à tiges fortifiées terminées par les fleurs inflorescences en tête arrondie.

II.3. Description botanique

C'est une plante de 10 à 30 cm de hauteur, à inflorescence formée de nombreux verticillés denses, feuillés et distants (Quézel et Santa, 1963). Sa saveur est fortement aromatique et son odeur est intense.

Les tiges à section carrée, sont plus ou moins dressées, verdâtres ou grisâtres, très ramifiées. Les feuilles, opposées et petites, sont ovales ou oblongues presque entières (légèrement dentelées ou crénelées) et munies d'un court pétiole.

Les fleurs, qui apparaissent en été, de Mai à fin Septembre, sont rose lilas, parfois blanches, et sont groupées à l'aisselle des feuilles en glomérules largement espacés le long de la tige. Chaque inflorescence, en cyme, est axillée par une bractée foliacée. Elle englobe jusqu'à 30 fleurs. Deux pré feuilles, réduites, naissent à la base de chaque inflorescence. Le calice, persistant et finement velu, est en cloche. Il est faiblement bilabié, strié et à 5 dents subégales (les 2 dents inférieures sont plus étroites). La corolle est gamopétale formée de cinq pétales soudées. Le fruit est constitué de 4 akènes (Quézel et Santa, 1963 ; Arvy et Gallouin, 2003).



Figure 5 : Morphologie de *Mentha Pulegium* (Bencheikh, 2012 ; Gerenutti *et al.*, 2014).

II.4. Systématique

D'après Quézel et Santa en 1963 et Guignard et Dupont en 2004, la classification systématique de la *Mentha pulegium* est la suivante :

<i>Règne</i>	<i>Végétal</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Labiacées</i>
Genre	<i>Menth</i>
Espèce	<i>Pulegium</i>

II.5. Origine et répartition géographique

Au départ, elle était d'origine méditerranéenne. Aujourd'hui, elle est répandue aussi en Europe de l'Ouest, du Sud et centrale, aux Canaries et à l'Ouest de l'Asie, ainsi qu'en Amérique. *M. pulegium*, est connue sous le nom de « Menthe pouliot ». Le nom de « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex* : la puce ; la plante ayant la propriété d'éloigner les puces. Elle est fréquente dans les milieux humides, elle pousse sur des sols sablonneux, et acides, mais est très sensible au sel (Anton, 2005).

Elle est parfois cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles très aromatiques. Malgré son utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, son intérêt économique demeure limité.

- **Principaux pays producteurs** : Les Etats Unis, le Maroc et l'Espagne.
- **Principaux pays exportateurs** : Les parties aériennes sont peu commercialisées alors que l'huile essentielle est exportée par les Etats Unis (Boukenna et Bouzidi, 2007).

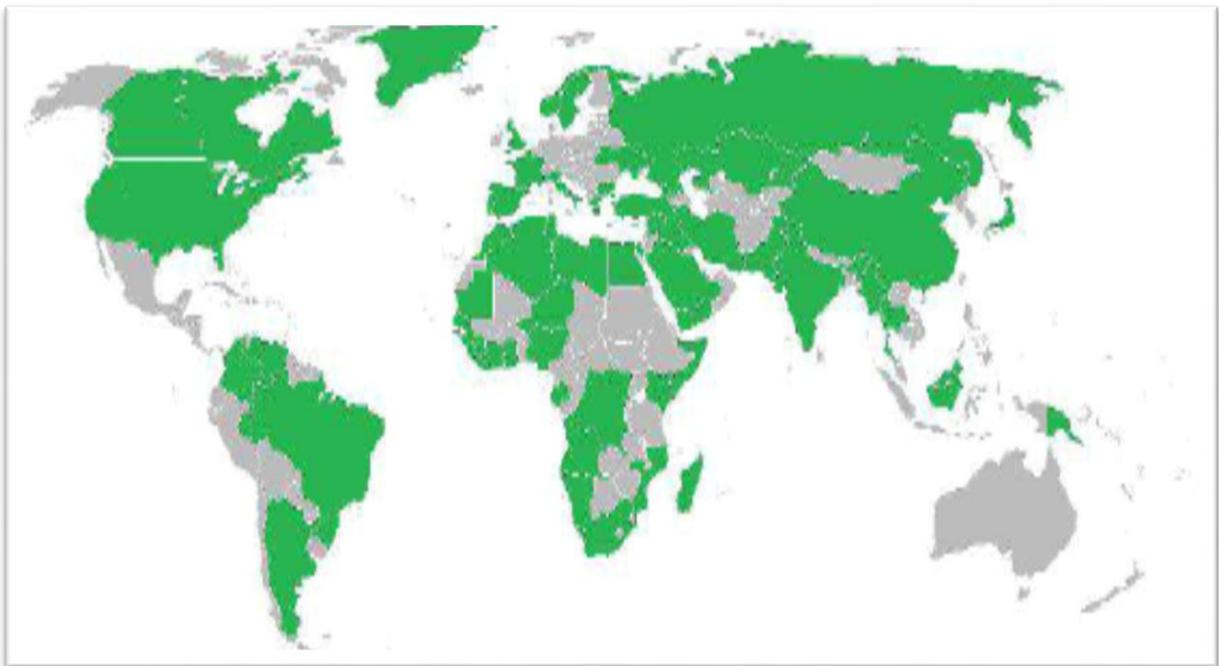


Figure 6 :  Répartitions géographique de la Menthe par le monde (Tucker *et al.*, 2007).

II.6. Composition chimique

La Menthe pouliot contient une huile essentielle, du tanin, des matières cellulosiques et pectiques, du sucre etc (Beloued, 1998). Les ingrédients de *Mentha pulegium* L. ont été soumis à un certain nombre d'études qui ont montré une différence de son peuple selon le domaine de la culture et elles ont quelques variations dans les composantes de divers pays. El-Ghorab a noté que l'huile de *M. pulegium* L. en provenance d'Egypte contient 43,5 % (pulegone), piperitone (12,2%), de Tunisie, (8 %) pulegone, isomenthone (11,3%).

• Huile essentielle

La menthe pouliot contient une huile essentielle. C'est un liquide jaunâtre, d'odeurs très fortes, solubles dans l'alcool, composées de 75 à 80% de pulégone liquide incolore d'odeur aromatique et de menthol de limonène lévogyre de dipentène , L'huile essentielle de *Mentha pulegium*. L est caractérisée par prépondérance de la (+)-pulegone (70-90%) accompagnée d'autres cétones mono terpéniques : isomenthone, menthone, piperténone (Bremness, 2001).

Tableau 2 : Composition des huiles essentielles extraites de *Mentha pulegium* (en %) (Bouchikhi, 2010).

Composés	LAWRENCE (1978) Espagne	SIVROPOULOU et al. (1995) Grèce	BEGHIDJA et al. (2007) Jijel (route de Bejaia)	BEKHECHI (2008) Région de Pierre du chat
α -pinène	0,3	-	0,18	0,3
β -pinène	0,4	-	0,4	0,2
Sabinène	0,3	-	0,14	-
Myrcène	0,1	-	0,12	-
Limonene	0,7	-	0,17	0,7
1,8-cinèole	0,4	-	0,18	0,2
p-cymène	0,2	-	0,04	0,1
Isomenthone	8,6	4,5	0,02	0,4
Pipéritone	0,2	1,9	0,3	0,5
Pipériténone	2,5	-	0,28	3,9
Menthone	16	1,0	0,6	10,9
Pulégone	79,4	44,7	87,3	75,8

- **Dérivés d'acides hydroxycinnamiques** : $\approx 5\%$, composés surtout d'acide rosmarinique ($\approx 3\%$) (Lamaison *et al.*, 1990).
- **Flavonoïdes** : diosmine, hesperidine (List *et al.*, 1980).
- **Tanins** (Baba Aissa, 1999).

II.7. Culture

La multiplication se fait par semis au printemps ou par division des racines réalisée en l'automne ou printemps. La plante préfère les sols humides, sablonneux et acide, mais est très sensible au sel (Teuscher *et al.*, 2005).

II.8. Propriété et usage

La menthe pouliot a surtout des vertus thérapeutiques, insecticide, que culinaire à cause de son goût plus amer, utilisée dans des cas différents ; nous procure une multitude de modes d'emploi et recettes. Il semble que dans le temps des anciens elle était méconnue, utilisée uniquement pour former des couronnes qu'ils portaient lors des cérémonies religieuses, par contre les chinois connaissaient ses propriétés calmante et antispasmodique, Hippocrate la considérait comme excitante alors que Pline à constater son effet antalgique (Kebissi, 2004).

II.8.1. Parasiticide

On signale que les propriétés de la menthe pouliot sont dues aux principes actifs qu'elle renferme. La menthe pouliot constitue un des principaux moyens de lutte contre la vermine (Leclerc, 1976). En la répandant (l'huile essentielle de notre menthe) dans l'air d'une pièce elle éloigne les parasites et insectes piqueurs. On en met dans les niches ou paniers des chiens, près des réserves à gains, de salaison et de fromages car l'odeur déplaît aux puces et aux petits rongeurs. On en brûle dans les locaux infestés par les puces, et on l'utilise aussi sous forme de lotion, sur le pelage des animaux domestique pour les débarrasser de ces nuisibles parasites (Baba, 2000).

II.8.2. Bactéricide

Purifie l'eau dans les pays arabes, l'eau devient plus ou moins fraîche car elle est conservée dans des jarres parfois pendant plusieurs jours. L'ajout d'une poignée de feuilles de menthe permet d'enrayer le développement des bactéries en plus de rendre l'eau plus désaltérante (Noudin et Grumbach, 2000).

II.8.3. Phyto-aromathérapie

Mentha pulegium L est utilisée : fraîche, vapeur, en friction en coction, comme huile essentielle, ou en infusion, en décoction, en cataplasme, ou encore en compresse.

II.8.4. Utilisations médicinales traditionnelles

Iranienne utilise généralement la plante *Mentha pulegium* L. contre les maladies infectieuses et trouve à être efficace contre ces problèmes sans aucune base scientifique pour expliquer cette action. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des agents pathogènes associés à des maladies infectieuses ainsi que des effets indésirables des antibiotiques a suggéré l'utilisation d'huile de *Mentha pulegium* L. comme antibiotique ou de remplacement. Une autre utilisation de cette plante est bien considérée comme un insectifuge, tant pour l'homme et des animaux domestiques. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les valeurs pratiques de l'application thérapeutique (Lorenzi *et al.*, 2002).

II.8.5. Utilisations médicinales

Un bon tonique digestif, il stimule les sucs digestifs, soulage les flatulences et les coliques : un bon remède pour les maux de tête et d'infections respiratoires mineures aidant à garder la fièvre et la congestion à vérifier ; un puissant stimulant à la muscle utérin encourageant la menstruation l'externe il peut être utilisé pour soulager les rhumatismes et compris la goutte (Bencheikh, 2011).

II.8.6. Domaine de l'agriculture

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

II.8.7. Domaine de l'industrie

On l'utilise surtout pour parfumer les savons et les détergents (Andeas, 1998).

II.9. Toxicologie

L'emploi des parties aériennes de la menthe pouliot en qualité de condiment et aux doses usuelles, ne présente aucun risque de toxicité ni aigue, ni chronique. L'HE est hépatotoxique à cause de sa teneur en pulégone. Des intoxications ont en effet été observées après ingestion de 5 g d'essence et des cas mortel sont signalés après absorption de 30 ml. L'emploi de la menthe pouliot pour la préparation de tisane d'agrément n'est pas recommandé (Anton, 2005).

II.10. Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium*

Mentha pulegium est considéré comme une espèce ayant des activités antimicrobiennes. Généralement, ses activités ont été associées à la composition chimique de cette plante.

Une étude réalisé par Radi et autre en 2019 sur l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Satureja calamintha* (L.), *Lavandula multifida* L. et *Mentha pulegium* L., testés contre certaines souches multi-résistantes impliquées dans des infections nosocomiales, montré que celles à composé majoritaire, la pulégone (*Mentha pulegium* et *Satureja calamintha*), a une activité antibactérienne plus élevée que celles à carvacrol comme composé majoritaire (Radi *et al.*, 2019).

En 2018, une étude ethnobotanique sur l'utilisation de *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* et *Pelargonium graveolens* au nord du Maroc (Taounate) et évaluation de leur pouvoir antimicrobien contre *Staphylococcus epidermis* et *Acinetobacter baumannii* par la méthode de micro-dilution. Les résultats indiquent que les essences testées ont montré un effet antibactérien important avec une sensibilité plus élevé a été enregistré par *S. epidermis* (Gram positif) que *A. baumannii* (Gram négatif) (Chraib *et al.*, 2018).

Une thèse soutenue par BOUHADDOUDA Nabila en 2016 sur l'activité antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*, les tests de l'activité antibactérienne sont exprimés sous forme de diamètres de zones d'inhibition par la méthode de diffusion sur disque et la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution. Les résultats indiquent que les huiles essentielles ont été particulièrement efficaces contre toutes souches bactériennes testées.

Une étude comparative de l'activité antimicrobienne de trois espèces de *Mentha* : *Mentha spicata*, *Mentha pulegium* et *Mentha piperitalis*. L'activité antibactérienne est exprimée sous

forme de diamètres de zones d'inhibition par technique de diffusion en puits. Le résultat a prouvé que l'activité varie en fonction de l'extrait et de la souche testée, où la plupart des souches Gram (+) se sont montrées sensibles vis-à-vis des différents extraits dans la plupart des cas (Barchan *et al.*, 2015).



Chapitre III

III.1. Généralités sur les huiles essentielles

III.1.1. Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (Jésus-Christ) (Baser et Buchbauer, 2010).

Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (Besombes, 2008 ; Bouguerra, 2012).

III.1.2. Définition d'huile essentielle

Une huile essentielle est un mélange naturel complexe de métabolites secondaires lipophiles, volatils, odorants et souvent liquides contenus dans des tissus végétaux spécialisés (Bruneton, 1993 ; Kalemba et Kunicka, 2003). Selon la norme AFNOR NF'T 75-006, «l'huile essentielle désigne le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation sèche. Elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» (AFNOR, 2000).

L'huile essentielle ne contient pas de corps gras comme l'huile végétale (Anton et Lobstein, 2005).

III.1.3. Origine des huiles essentielles :

Les plantes vertes puisent l'eau et utilisent l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus est appelé photosynthèse, il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferment la chlorophylle. Les produits issus de la photosynthèse sont (glucides, NADPH, ATP) constituent une source d'énergies, ils contribuent à la génération de nouvelles cellules, ils interviennent indirectement dans la biosynthèse de divers composés secondaires tels que les lipides, les hétérosides et les essences, ainsi les huiles essentielles font parties des résidus du métabolisme végétal (Narishetty, 2004).

III.1.4. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes

Dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme ou des sous-produits de l'activité métabolique d'une plante (Amiot, 2005). Cependant plusieurs de leurs effets utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines. Les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes, favorisant la pollinisation (Guignard, 2000). Certains auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal, assurant leur défense et aidant la plante à s'adapter à son environnement (Fouché, 2000).

III.1.5. Localisation des huiles essentielles

Les HEs sont largement réparties dans le règne végétal ; certaines familles en sont particulièrement riches (labiées). Elles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries (Menthe), écorces (cannelier), racines (vétiver), rhizomes (gingembre), fruits (Anis, fenouil, badianier)... dans une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes ; la composition des essences peut alors varier d'un organe à l'autre.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (Lauracées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs : poche sécrétrices schizogènes (rutacées), canaux sécréteurs (conifères, ombellifères), poils sécréteurs (labiées, composées) (Bruneton, 1999).

III.1.6. Composition chimique des huiles essentielles

Du point de vue chimique, les huiles essentielles sont constituées de mélanges extrêmement complexes. Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes (Buchanan *et al.*, 2000). Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). C'est la technique la plus utilisée, car elle permet de réaliser une analyse complète de plus d'une centaine de molécules chimiques que contient l'huile. Le spectromètre de masse (SM), que l'on associe souvent à la chromatographie (CPG-SM), permet lui d'obtenir la composition précise de l'huile essentielle (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi *et al.*, 1995 ; Platzer, 2002).

III.1.6.1. Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone à la formule générale $(C_5H_8)_n$ reconnue par Wallach dès 1887 (Lamarti *et al.*, 1994).

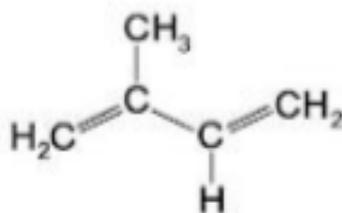


Figure 7 : Structure de la molécule d'isoprène

Cet isoprène est à la base du concept de la « règle isoprénique » énoncée en 1953 par Ruzicka. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments : cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires.

Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (Lamarti *et al.*, 1994). Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène (Baser et Buchbauer, 2010).

- **Les monoterpènes**

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (Rahal, 2004). Ces composés peuvent être : monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques (α - et γ -terpinène, p-cymène) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). Selon Bruneton (1999), la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions : alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

- **Les sesquiterpènes**

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (Belaiche, 1979). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (Rahal, 2004). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β -artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004).

III.1.6.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents que les précédents, ce sont très souvent des Allylphénols, Propénylphénols, Anéthol, Aisaldéhyde, Apiol, (Estragol), Eugénol, Safrole, Asarones, Cinnamaldéhyde, Cinnamyl alcohol. On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'authranilate de méthyle ; Les lactones dérivées des acides cinnamiques (les coumarines), étant, au moins pour les plus simple d'entre, entraînables par la vapeur d'eau (Bakkali *et al.*, 2008).

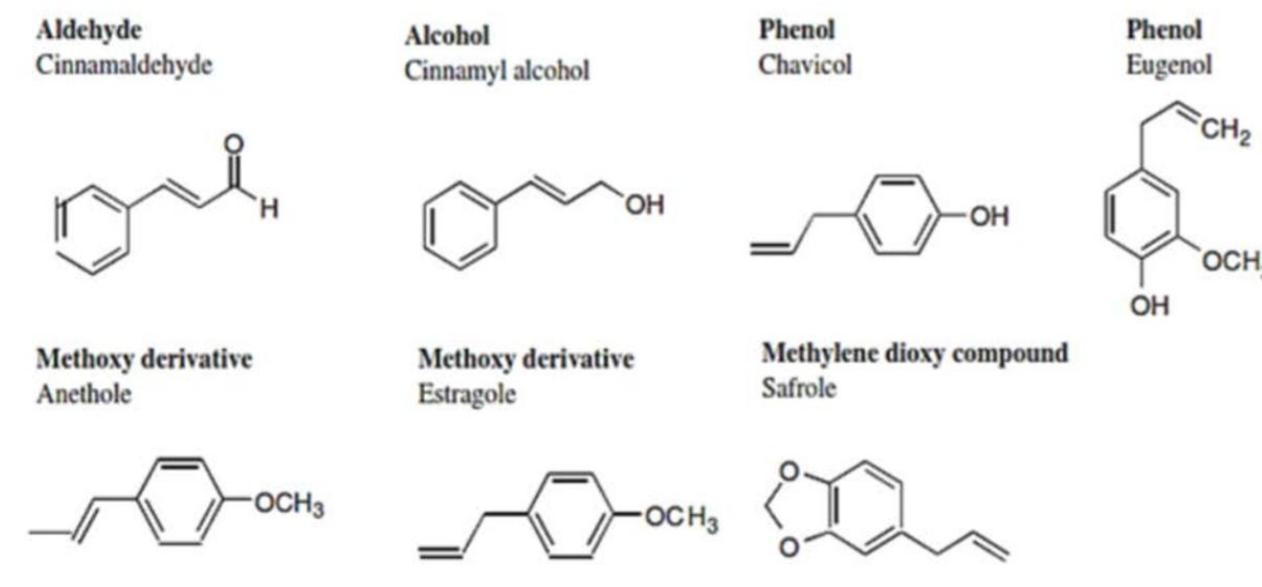


Figure 8 : Structure Chimiques de quelques composés aromatiques

III.1.6.3.Des composés d'origines diverses

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînable lors de l'hydrodistillation tels que : les carbures (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides (C₃ à C₁₀), alcools, aldéhydes, esters acycliques, lactones..... (Brueton, 1999).

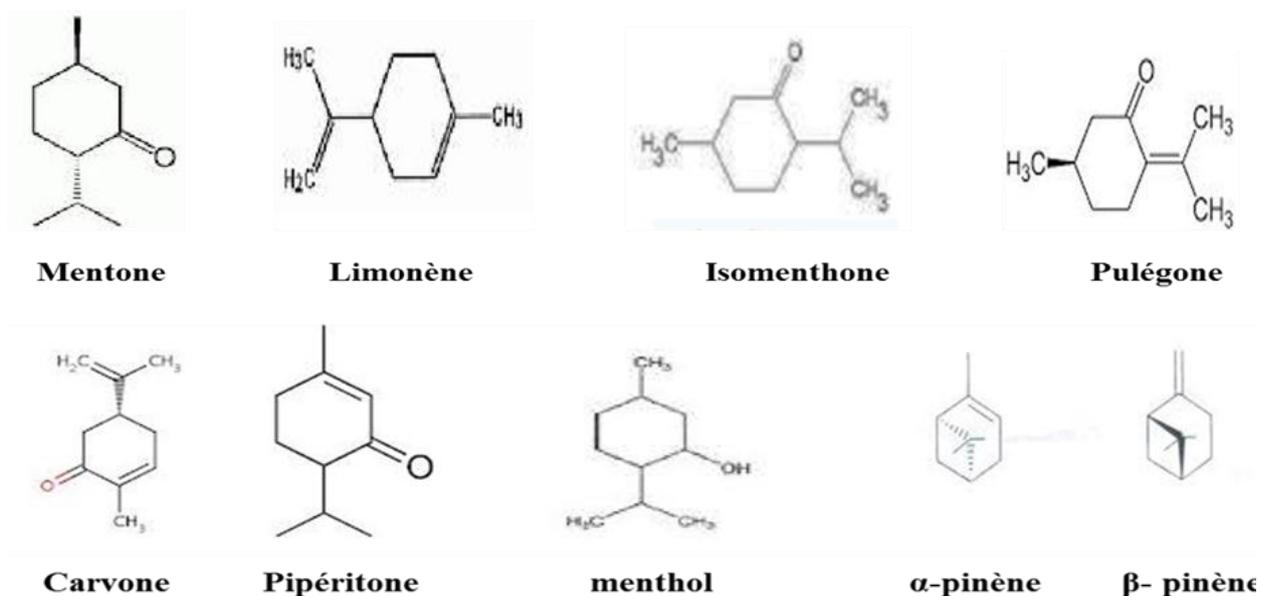


Figure 9 : Structures chimiques des composées rencontrées dans les huiles essentielles.

III.2. La conservation des huiles essentielles

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991).

III.3. Domaines d'utilisation

III.2.1. En pharmacie

L'importance des plantes aromatiques est indiscutable. Leur contenu en essence et la nature chimique des constituants de celle-ci les confèrent de grandes perspectives d'application. Ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique. Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types :

- Les produits du métabolisme primaire (essentiellement des saccharides), substances indispensables à la vie de la plante se forment dans toutes les plantes vertes grâce à la photosynthèse.
- Le second type de substances se compose des produits du métabolisme secondaire résultant essentiellement de l'azote (Bekhechi et Abdelomahid, 2010).

III.2.2. Phytothérapies

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HEs pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Attefosse, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie. Les HEs sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HEs ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries.

La listerine qui est une solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire. Les huiles

essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires (Rhayour, 2002).

III.2.3. En parfumerie et cosmétologie

L'utilisation des HEs dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Rhayour, 2002).

III.2.4. En industrie alimentaire

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside par l'utilisation des HE. Les plantes aromatiques et leur HEs sont utilisés dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des HEs, le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire. Ils y sont rajoutés pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires. Plusieurs travaux ont montré que les HEs de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (Rhayour, 2002).

Les huiles essentielles sont très utilisées dans les arômes alimentaires, que ce soit dans le secteur des arômes sucré ou salés. Dans le domaine des arômes salés, une place de choix revient évidemment aux huiles essentielles d'épices et d'aromates. Celles-ci sont également utilisées dans une moindre mesure dans le domaine des arômes sucrés, dans lequel les huiles essentielles d'agrumes sont largement représentées (Fernandez et Chemat, 2012).

III.4. Techniques d'extraction des huiles essentielles

III.4.1. La distillation

La distillation est un procédé qui utilise la nature volatile des composants aromatiques pour les séparer du reste de la plante. L'association à l'eau s'appuie sur la théorie des liquides mélangés mais non miscibles, découverte par Berthelot (1863), c'est l'azéotropisme. La distillation du mélange eau-essence végétale s'effectue à une température inférieure à 100°C à pression

atmosphérique normale, minimisant les dénaturations de l'huile essentielle qu'une température supérieure ne manquerait pas de provoquer (Piochon, 2008).

Il existe trois différents procédés d'extraction utilisant le principe de distillation : l'hydrodistillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

III.4.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Cette méthode consiste à immerger directement la partie de la plante à extraire dans l'eau chauffée jusqu'à l'ébullition pendant 3 heures. L'huile essentielle est évaporée avec la vapeur d'eau. Ces derniers sont hétérogènes sont alors condensés à l'aide d'un réfrigérant. Le distillat est ensuite récupéré dans un erlenmeyer (Figure : 10) (Jouault, 2012).

L'eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle (Boukhalfa, 2014). La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

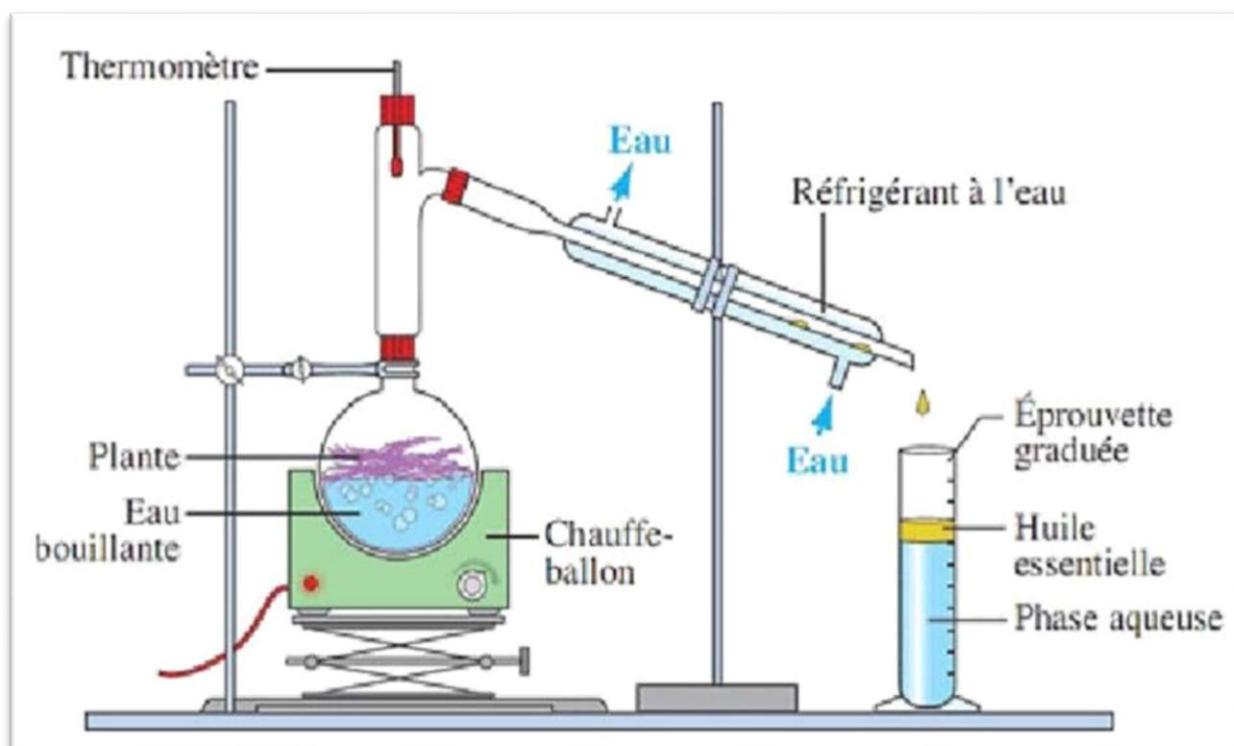


Figure 10 : Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation.

III.4.1.2. Distillation par 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 des plantes aromatiques. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Luicita, 2006). La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle » (Figure 11).

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle).

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Luchesi, 2005).

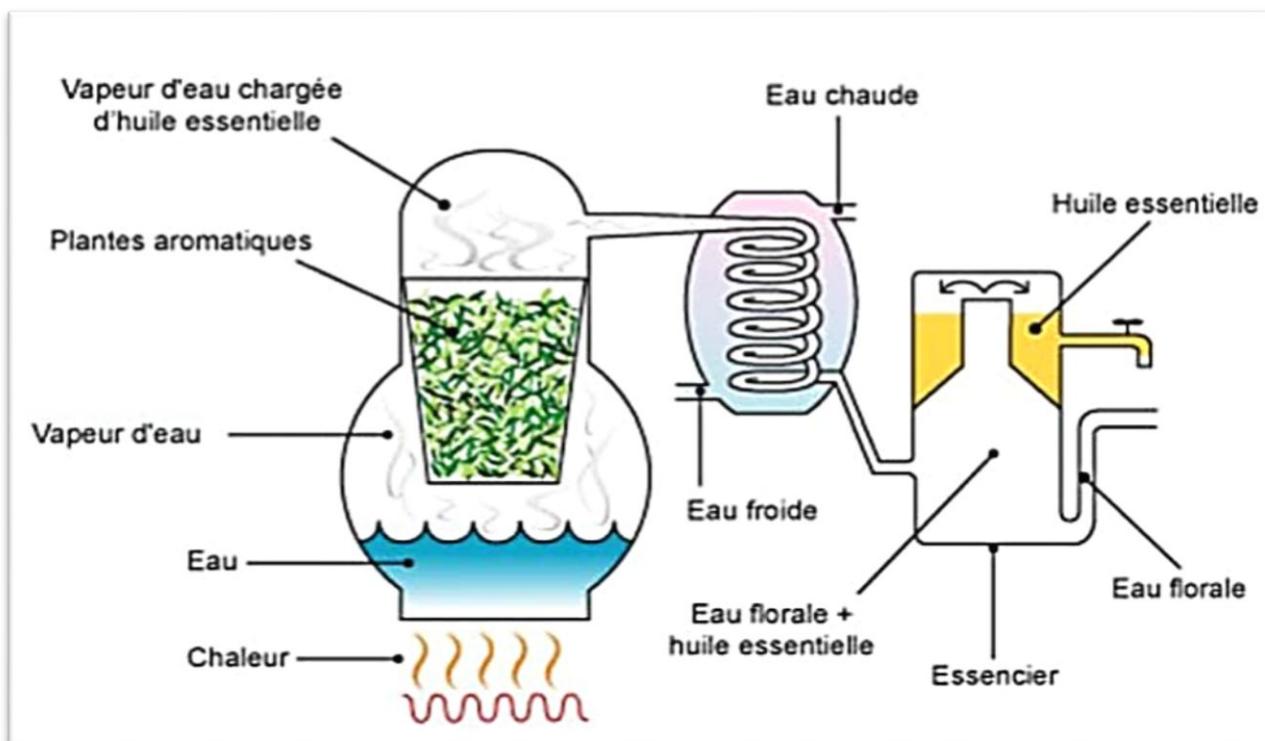


Figure 11 : Principe schématisé de l'appareillage d'entraînement à la vapeur d'eau (Luchesi, 2005).

III.4.1.3. Distillation à la vapeur directe (Hydrodiffusion)

C'est une variante de l'entraînement à la vapeur. Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur. La composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (Bruneton, 1999 ; Benjilali, 2004) (figure 12).

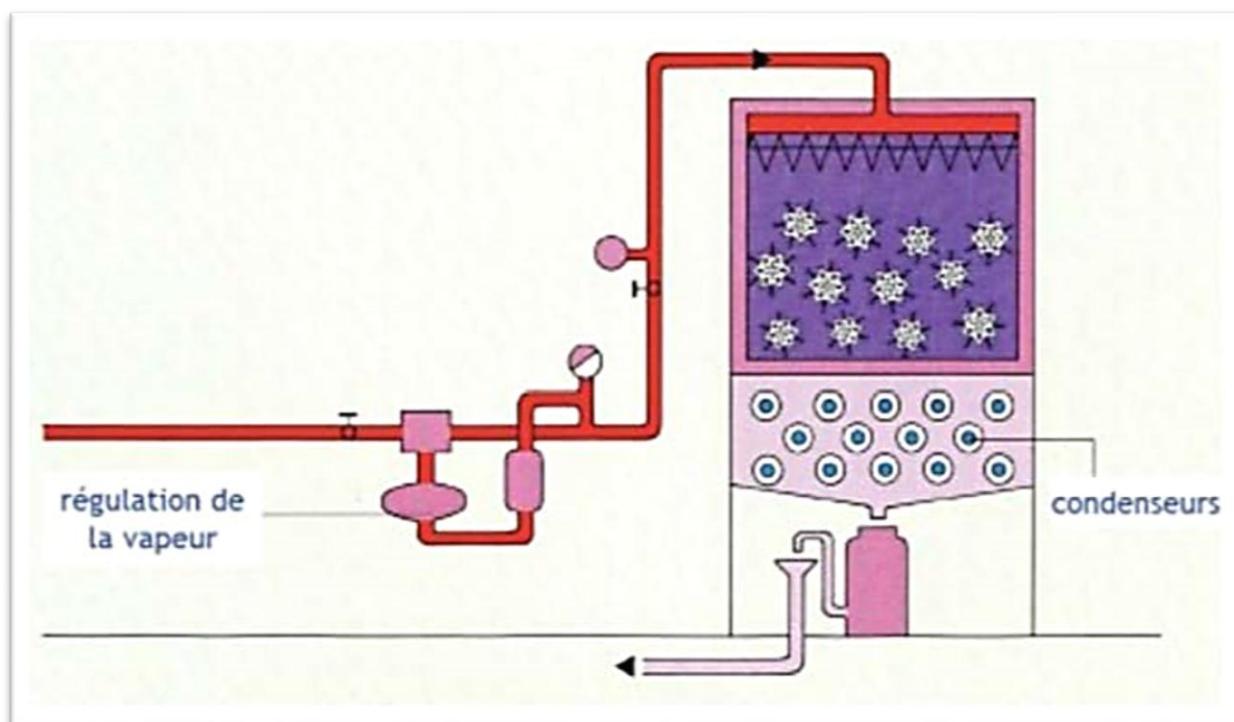


Figure 12 : Principe schématisé de différentes étapes d'hydro-diffusion.

III.4.2. Extraction par solvants

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Grâce à des lavages successifs, le solvant va dissoudre et extraire les constituants solubles contenus dans la plante avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé

«concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à « l'absolue » (Belaïche, 1979 ; Mebarka, 2007) (Figure 13).



Figure 13 : Technique d'extraction par solvant (Anonyme 7).

III.4.3. L'expression à froid

Les huiles essentielles de fruits d'agrumes sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid (Lucchesi, 2005). Le principe de cette technique est basé sur la rupture des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits ; cette essence entraînée par un courant d'eau froide. L'émulsion d'essence et d'eau isolée par décantation ou centrifugation.

III.4.4. Extraction par micro-ondes

Le pouvoir énergétique des micros-ondes a été mis en évidence à la fin de la seconde guerre mondiale, d'une façon anecdotique par un physicien, le Dr Spencer, suite à l'oubli de son sandwich sur un émetteur d'ondes, alors que jusqu'ici, les micros-ondes étaient uniquement utilisées comme vecteur d'information, elles investirent les laboratoires de chimie dans les années 80 (Mengal *et al.*, 1993). Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques

ont été publiés par Ganzler, coll, Lane et Jenkins en 1986. Depuis cette date, l'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches et de brevets (Figure 14).

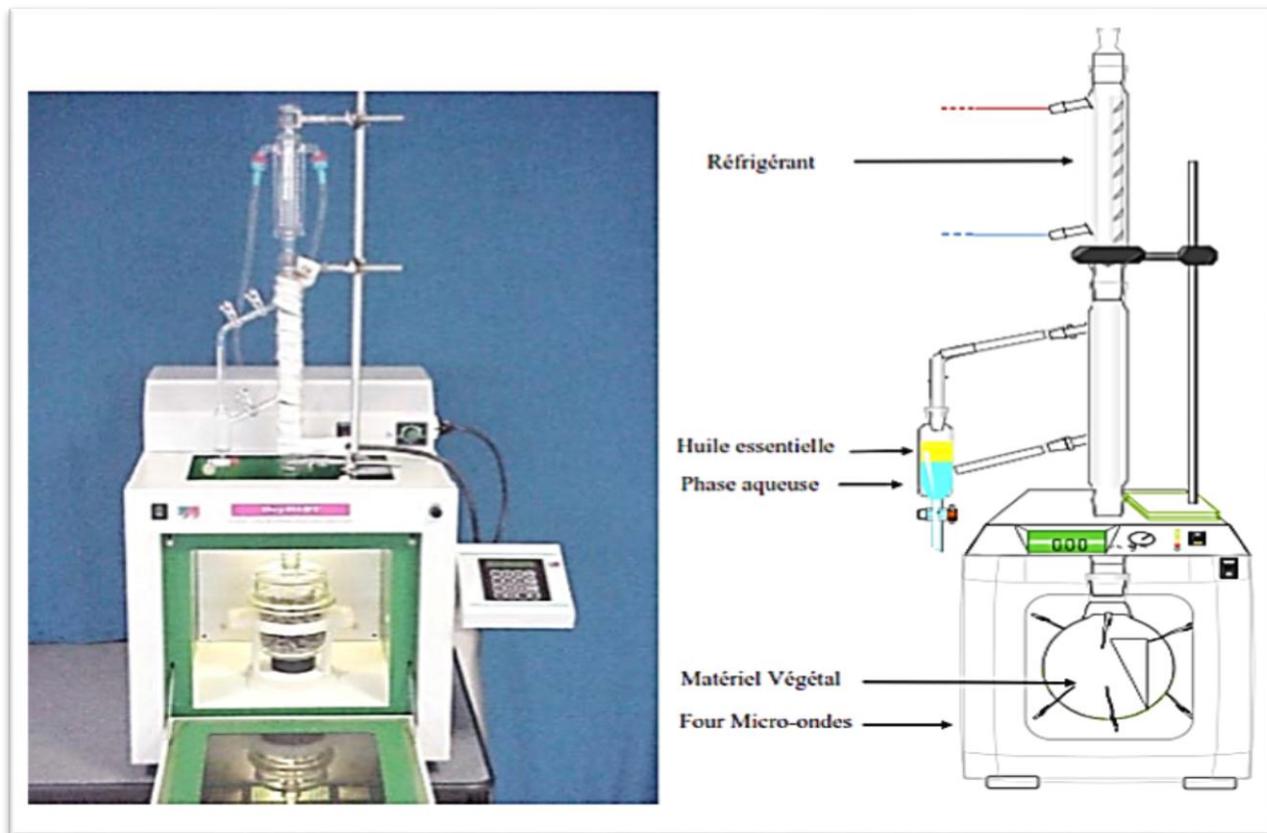


Figure 14 : Extraction assisté par micro-ondes (Chemat *et al.*, 2006).

III.4.5. Extraction par le CO₂ supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid, des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique sous pression et à température supérieur à 35°C, le dioxyde de carbone est employé principalement comme un fluide supercritique parce que c'est un solvant sain, non-combustible, peu couteux, inodore, sans couleur, insipide, non-toxique, et aisément disponible. Sa viscosité basse lui permet de pénétrer la matrice pour atteindre le matériel à extraire, et sa basse chaleur latente d'évaporation est un moyen élevé de volatilité qui peut être facilement enlevé sans laisser un résidu de solvant. Cette technique présent d'avantage énorme car le CO₂ est naturel, non toxique, disponible et peu couteux et il s'élimine de l'extrait sans laisser de résidus mais l'unique point de faible c'est le cout de l'installation (Pellerin, 1991) (Figure : 15).

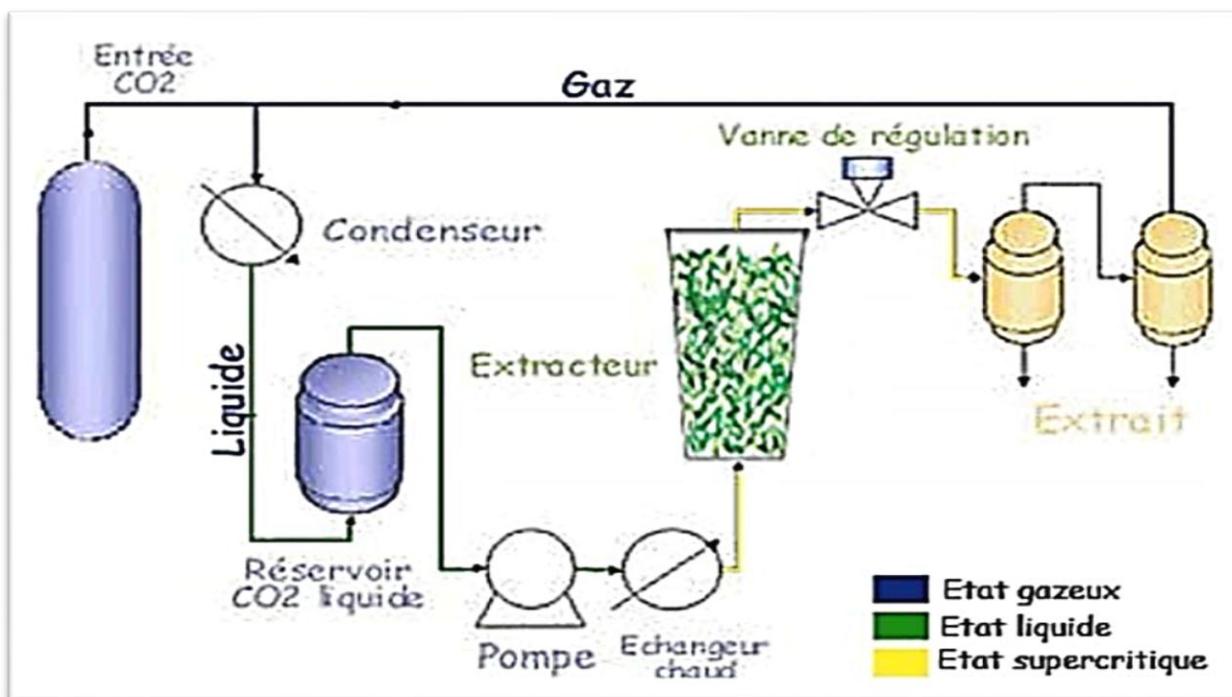


Figure 15 : Montage d'extraction par les fluides supercritiques (Pellerin, 1991).

III.5. Activités anti-microbiennes des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HEs. Étant 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 HEs ait son propre mécanisme d'action (Samah, 2012).

III.5.1. Activité antibactérienne

Les caractéristiques des huiles essentielles sont attribuées aux dérivés terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives 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 (Guinoiseau, 2010). Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et

induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (Figure 16).

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases

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

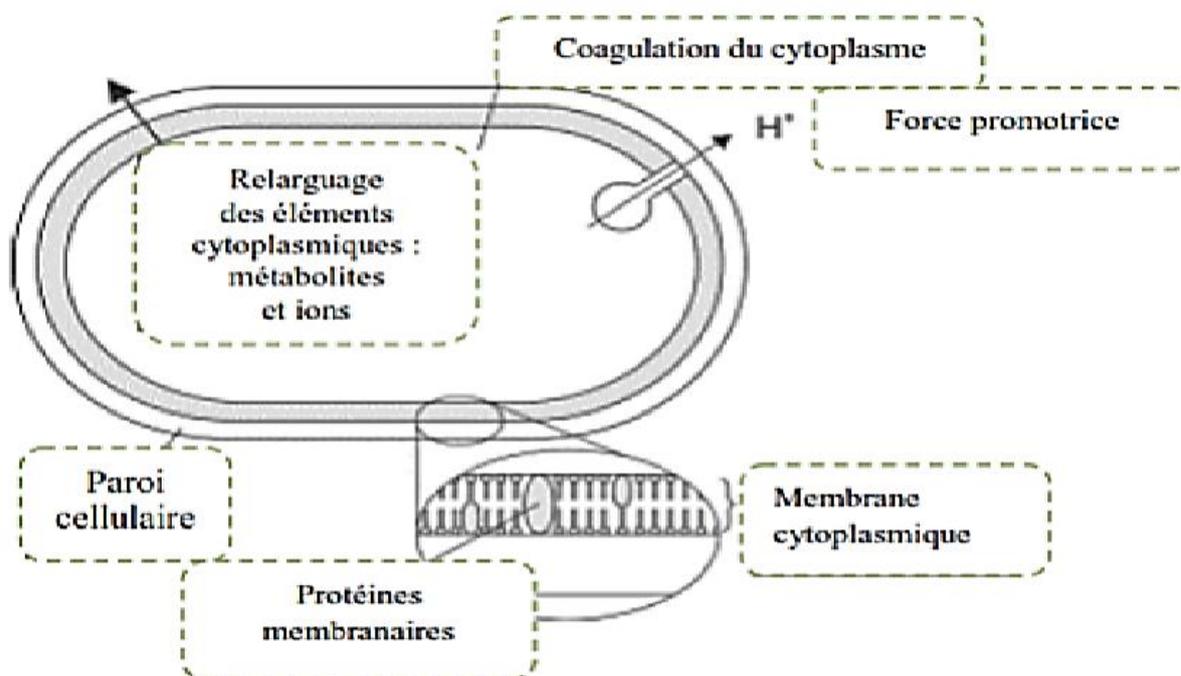


Figure 16 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

III.5.2. 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 la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2003).

Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des huiles essentielles.

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

III.6. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels : "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme" (PIOCHON, 2008), certaines huiles essentielles contenant des phénols, tels que le thym, la cannelle et le clou de girofle, devraient être employées avec prudence. La toxicité du foie peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé. Les cétones contenues dans l'armoise peuvent ainsi causer ce genre de problème (Himed, 2011).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale : une DL₅₀ comprise entre 2 et 5g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, etc.) ; d'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg. Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bouguerra, 2012).

Les huiles essentielles peuvent provoquer : agitation, tremblements généralisés, coma, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. Dans certains cas la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation.

En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants "allyl et propénylphénols" de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers (Benzeggouta, 2005).



Chapitre IV

IV. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

IV.1. Activité antibactérienne

IV.1.1. Généralités

L'homme vit dans un environnement peuplé de microorganismes qui sont présents dans l'air, le sol, les eaux douces, les eaux marines, à la surface de la peau et sur les muqueuses ainsi qu'au niveau du tube digestif, de l'arbre respiratoire et de l'appareil urinaire. Ces microorganismes sont constitués par les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. Ce sont soit des hôtes naturels de l'Homme et donc saprophytes (flore digestive par exemple), soit ils déterminent une infection et donc pathogènes (Khiati, 1998).

IV.1.2. Agents antimicrobiens

On désigne comme agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (Asada *et al.*, 1998). Il existe aussi des agents chimiothérapeutiques, qui inhibent le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux (Guillaume, 2000).

IV.2. Facteurs déterminants le degré d'activité des huiles essentielles

Plusieurs facteurs influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation antimicrobienne, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblés et leur éventuelle adaptation aux huiles essentielles.

IV.2. 1. Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi, la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

L'activité d'une huile essentielle est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme de composés

synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

Il est connu que ce sont les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes qui 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 hydrocarbonées.

IV.2. 2. Le type des microorganismes cible

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis des huiles essentielles. Parmi les microorganismes, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Gram positif), *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Candida albicans* (Levures) et *Aspergillus niger* (champignons) ont été les plus étudiés. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram négatif apparaissent plus résistants que les Gram positif vis-à-vis des huiles essentielles (Amaral *et al.*, 1998 ; Cox *et al.*, 2000). Inversement, *Escherichia coli* est plus sensible vis à vis de l'huile de *Melaleuca alternifolia* que *Staphylococcus aureus* (Hayes *et al.*, 1997). De même, certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile de genévrier que les bactéries (Chao *et al.*, 2000). Enfin, une sensibilité supérieure des bactéries anaérobies a été observée quel que soit les huiles essentielles par rapport à celles vivant en aérobiose (Juven *et al.*, 1994 ; Amaral *et al.*, 1998).

IV.2.3. Mode d'action des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force

motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+) : ce mécanisme a été observé avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*) et les bactéries à coloration de Gram à négative (*Escherichia coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* (Cox *et al.*, 2000 ; Carson *et al.*, 2002).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Knobloch *et al.*, 1989 ; Sikkema *et al.*, 1995). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (Zani *et al.*, 1991). Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes : en général, les bactéries Gram à négatif sont plus résistantes que les Gram à positif grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram à négatif est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux de Gram négatif qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaires comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupements fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman, 2000).

IV.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

IV.3.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HES à une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des HES dans l'eau, de leurs volatilités et de la nécessité de les tester à faibles concentrations.

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide (Rhayour, 2002).

IV.3.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide :

Dans le test de diffusion en gélose, l'huile essentielle à tester est placée sur une surface d'agar. Deux techniques existent : dans la première, l'huile essentielle est placée sur un disque en papier ; Dans le second, un trou est creusé en surface de gélose et l'huile essentielle est placée dans le trou (Baser et Buchbauer, 2015).

A. Par la méthode de diffusion en disque (aromatogrammes)

La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949. Cet examen se fait de la même manière qu'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues (Bachiri *et al.*, 2016). Dans cette méthode, les disques de papier filtrant stérilisés de 6 mm sont saturés avec un extrait de plante stérilisé filtré de la concentration souhaitée. Les disques imprégnés sont ensuite placés sur la surface d'un milieu d'agar solide approprié comme Mueller Hinton. Les médias ont été pré inoculés avec des organismes d'essai. La taille standard de l'inoculum est de 1×10^8 UFC/ml de bactéries pour les plaques de diffusion d'inoculation qui est égale à la norme de turbidité McFarland 0.5. Certains chercheurs imprègnent le disque en papier avec l'extrait végétal avant de mettre les plaques inoculées tandis que d'autres préfèrent après. Les plaques sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C (Bactéries) et 48 h à 25 °C (Champignons). Après l'incubation, le diamètre de la zone est mesuré au millimètre entier le plus proche au point où il y a une réduction importante de la croissance de 80% (Das *et al.*, 2010).

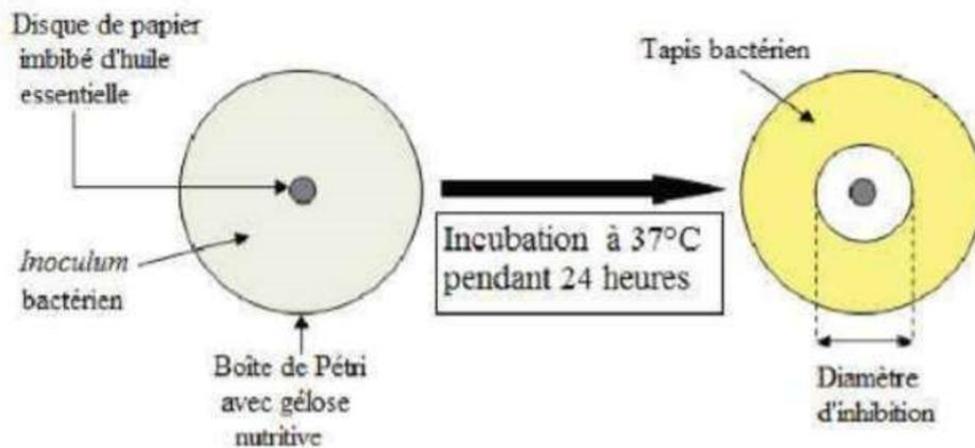


Figure 17 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Ganou, 1993).

- Intérêt de l'aromatogramme

Il permet un choix judicieux, en adaptant la prescription d'essences à chaque syndrome infectieux. Il permet une aromathérapie véritablement sur mesure et appropriée à chaque cas particulier (Gazengel et Orecchioni, 1999).

B. Par la méthode de diffusion en puits

Le principe de cette technique est similaire à celui de la diffusion sur disque. Elle consiste à creuser un trou de 6 à 8 mm de diamètre dans la gélose. Un volume fixe d'extrait végétal est ensuite introduit dans le puits d'agar perforé et incubé à une température et une durée optimales en fonction du microorganisme testé (Das *et al.*, 2010).

IV.3.1.2. Méthode en phase vapeur (ou Microatmosphère)

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Après incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque (zone d'inhibition) dont le diamètre est mesuré par cm ou mm (Degryse *et al.*, 2008).

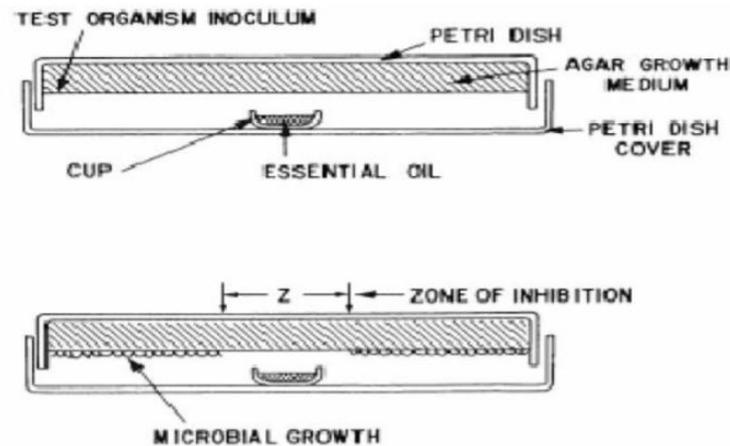
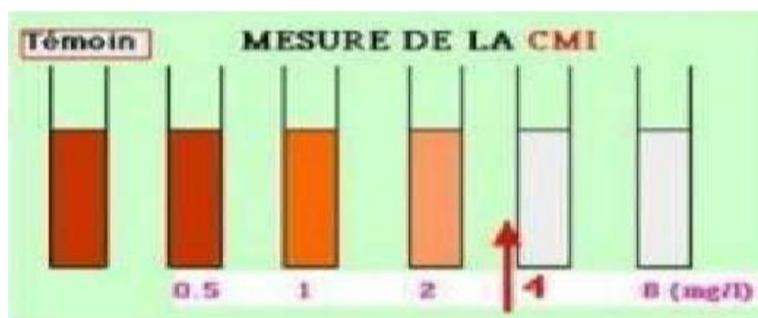


Figure 18 : Illustration de la méthode de micro-atmosphère (Zaika, 1988).

IV.3.2. Méthode de dilution (Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI))

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant de 18-24 (Andrews, 2001). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories : "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire"(Genné et Siegrist Hans, 2003).



Dans cet exemple : CMI=4mg/L

Figure 19 : Méthode de lecture de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales inhibitrice (CMI) d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure (Rios *et al.*, 1988). Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (la micro-dilution ou la macro-dilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons (Balouiri *et al.*, 2016).

IV.3.2.1. Technique de macro-dilution en milieu liquide

La méthode de macro-dilution était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence. Le principe de base de ce dosage est le même que le dosage de la micro-dilution au bouillon. Mais le test est effectué dans des tubes à essai contenant des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume. Les tubes sont inoculés avec des microorganismes d'essai à des concentrations standard. Tous les tubes de dosage doivent être incubés pendant 18-24 h dans un incubateur d'air ambiant à 35-37 °C. Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'extrait de plante peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé (Schwalbe *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010).

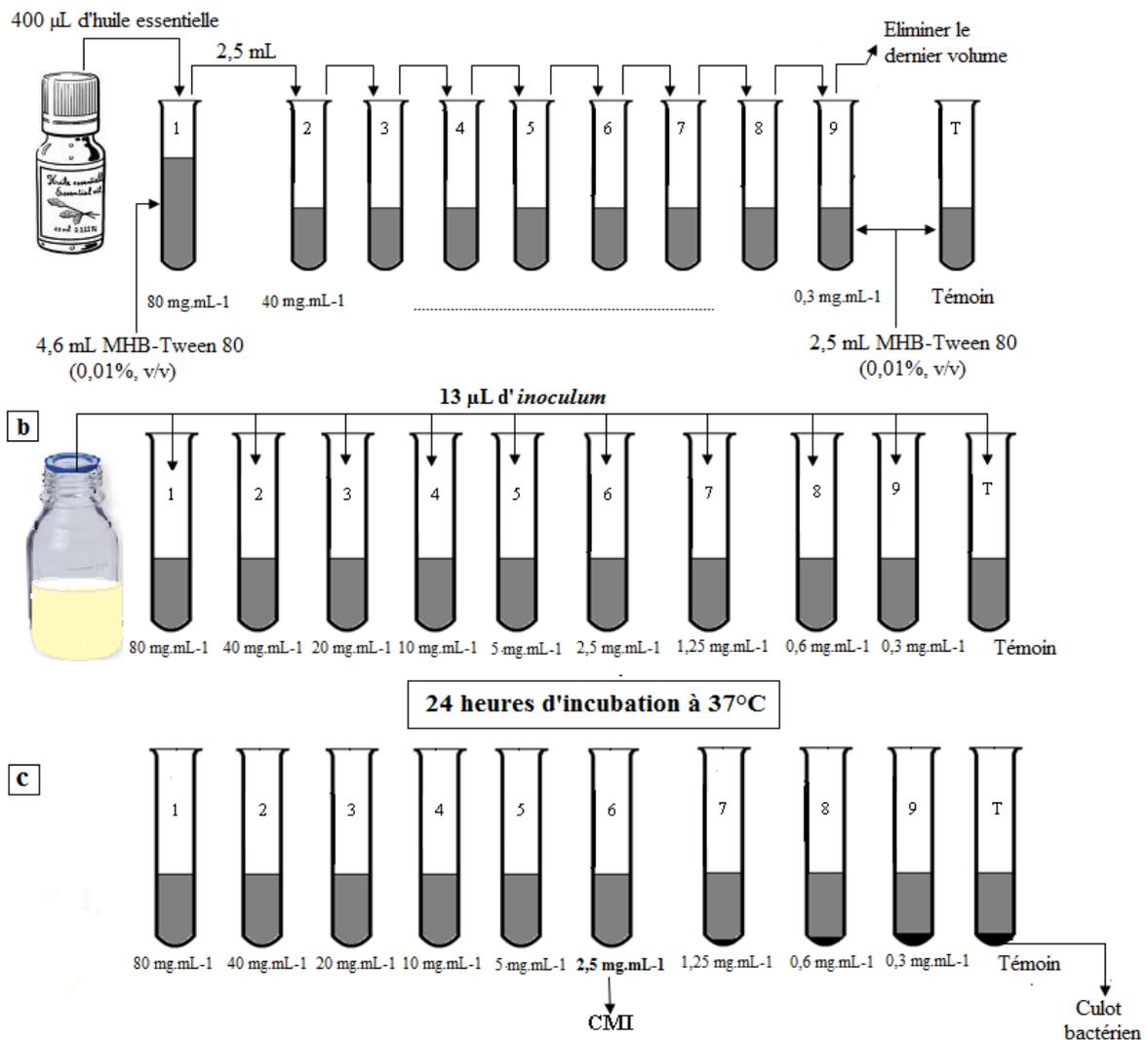


Figure 20 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de macro-dilution en milieu liquide (Elodie, 2010).

IV.3.2.2. Technique de micro-dilution en milieu liquide

C'est une méthode plus simple et plus économique que la méthode de macro-dilution au bouillon. Elle est maintenant considérée comme la méthode internationale de test de sensibilité de référence (Schwalbe *et al.*, 2007). Cette technique repose sur l'utilisation d'un émulsifiant ou un solvant dans le milieu d'essai pour assurer le contact entre les microorganismes d'essai et l'agent pour la durée de l'expérience. Les agents les plus utilisés sont tween 80, tween 20, éthanol et le DMSO. Après 18-24h d'incubation, la mesure de la turbidité peuvent être déterminés visuellement, ou par spectrophotométrie, soit l'utilisation d'un indicateur de viabilité cellulaire (eg : sels de tétrazolium ou le colorant de résazurine) (Wilkinson, 2006 ; Elshikh *et al.*, 2016).

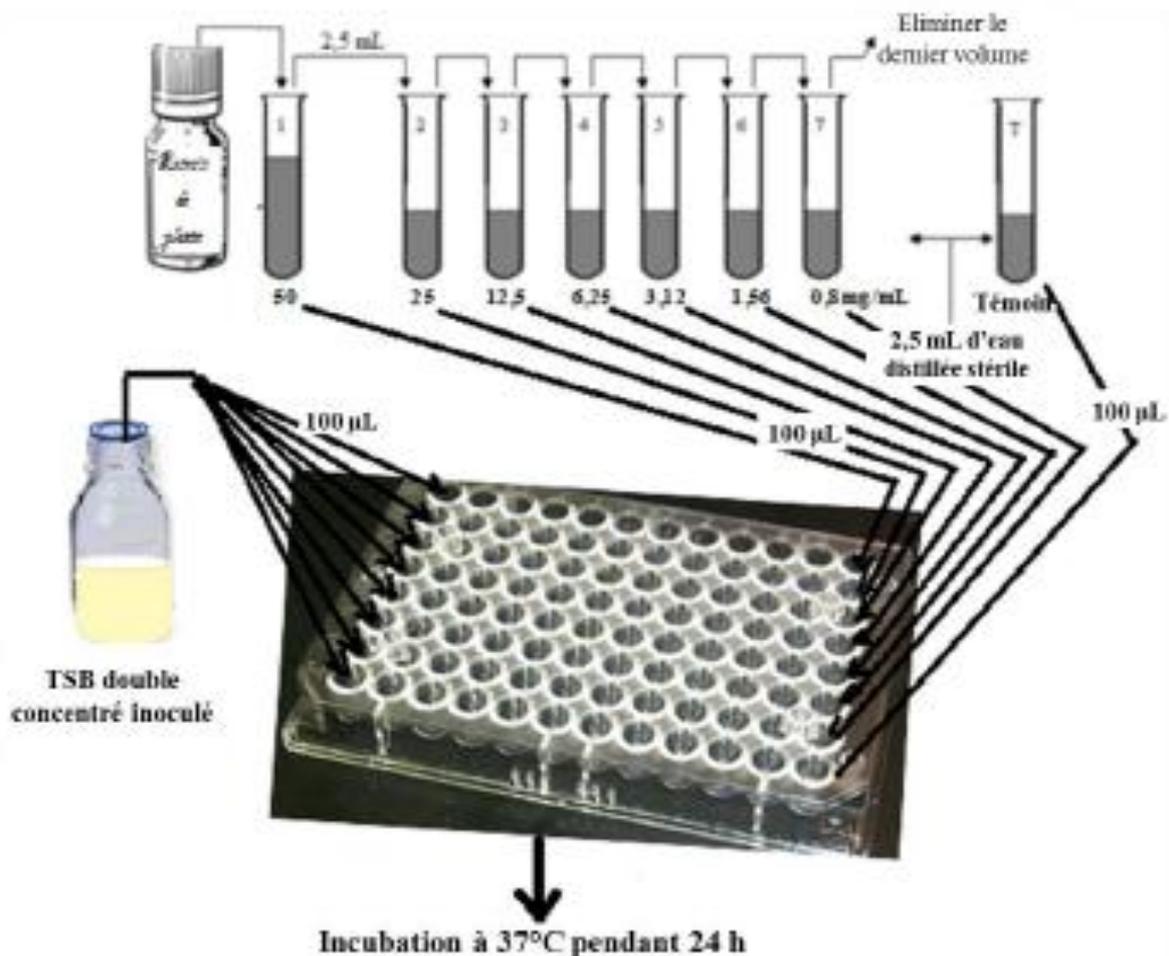


Figure 21: Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide (Aicha, 2018).

- **Le test à la résazurine**

Le test de la resazurine, présenté par Mann et Markham en 1998, est un dosage unique de micro-dilution de bouillon approprié pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne et la détermination du CMI des huiles essentielles. Ce dosage utilise un stabilisant chimiquement et microbien inerte et un indicateur capable de prédire de manière fiable la CMI soit visuellement soit à l'aide d'un appareil spécifique (Baby et George, 2009).

IV.3.2.3. Technique de macro-dilution en milieu solide

Cette technique a été effectuée par Baron et Bruckner 1984 pour déterminer la susceptibilité des bactéries anaérobiques à l'aide de la dilution d'agar (Rios *et al.*, 1988). Dans cette méthode, la substance d'essai est incorporée à des concentrations connues dans la gélose et, une fois définies, des bactéries sont appliquées sur sa surface. De cette façon, un grand nombre de bactéries peuvent être criblées dans une seule opération de dosage. Les boîtes sont incubées pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange extrait/agar est marquée soit présente ou absente de la croissance microbienne. Les points finaux des CMI sont enregistrés comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées (Wilkinson, 2006 ; Balouiri *et al.*, 2016).

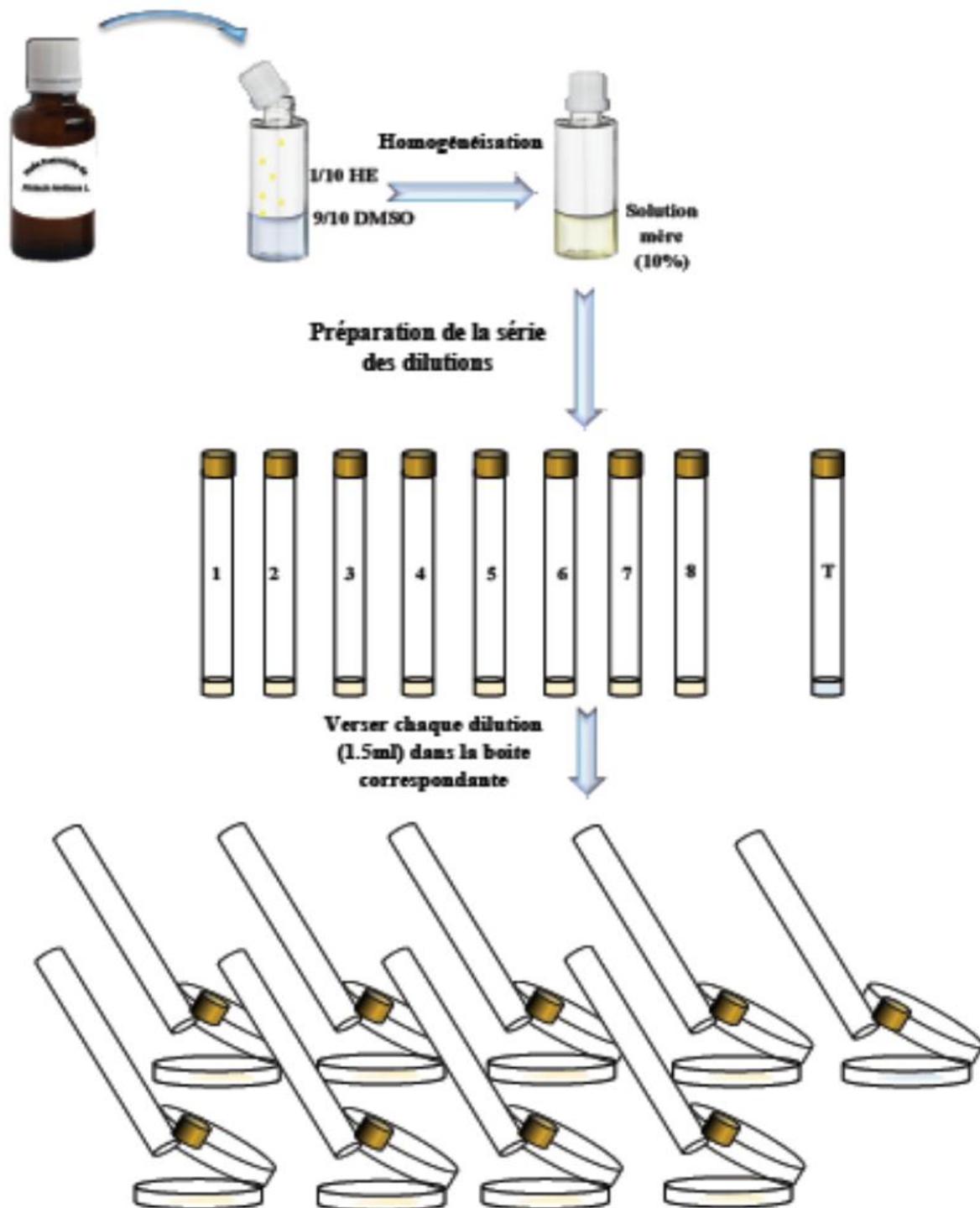


Figure 22 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de macro-dilution en milieu solide (Abed, 2018)

- **La méthode de E-test (Méthode de diffusion et de dilution)**

E-test est une technique basée sur la combinaison de deux concepts : diffusion du disque et de la dilution de gélose. Elle a été développée en Suède et présentée à la communauté scientifique lors de la conférence Interscience sur les agents antimicrobiens et la chimiothérapie (ICAAC) en 1988. Elle consiste en l'application d'une bandelette imprégnée de concentration croissante d'un antibiotique sur un inoculum bactérien standardisé.

Après 24h d'incubation, la zone d'inhibition à la forme d'une ellipse et la lecture est alors directe sur la bandelette là où celle-ci rencontre la zone d'inhibition. Cette technique est réalisable au quotidien au laboratoire de bactériologie (Joly-Guillou, 2006 ; Schwalbe *et al.*, 2007).

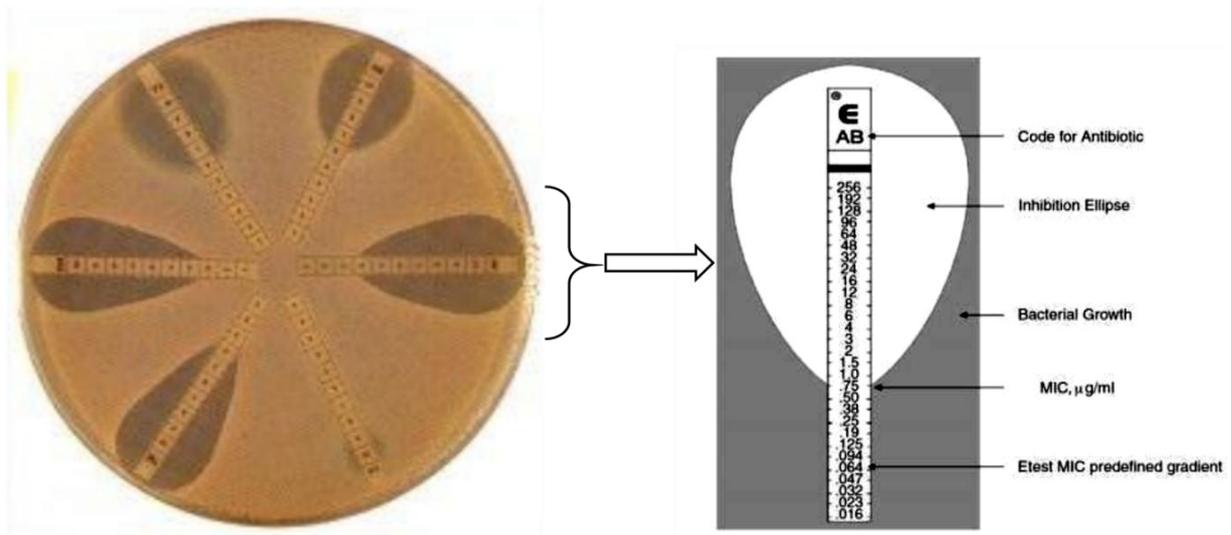


Figure 23 : Présentation de la méthode E-test (Méthode de diffusion et de dilution).

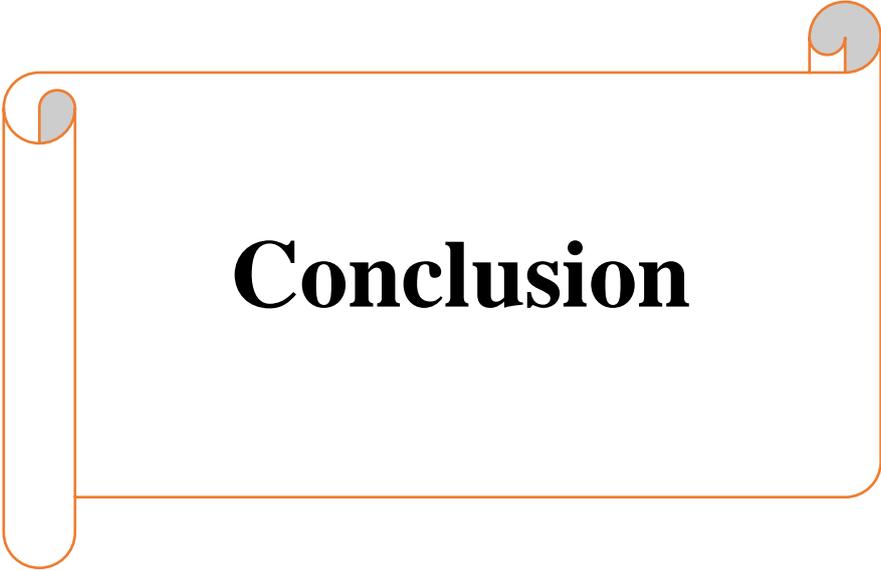
IV.3.2.4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) en milieu solide

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants).

La CMB est déterminée secondairement à la CMI, on dénombre les bactéries survivantes en présence de concentrations d'antibiotique supérieures à la CMI. Pour sa

détermination, des prélèvements sont effectués dans chacun des puits dépourvus de trouble bactérien puis déposés « en stries » sur milieu gélosé puis incubés à 37°C. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures (Biyiti *et al.*, 2004). D'après Woolfrey et Lally (1986) il serait préférable d'utiliser la méthode en micro-dilution plutôt qu'en macro-dilution, ceci permettrait de diminuer les variations de résultats dues à la technique.

Le rapport CMB/CMI permet de savoir si l'antibiotique a un effet bactéricide (CMB/CMI inférieur à 2) ou bactériostatique (CMB/CMI très supérieur à 2) et on définit une souche comme tolérante lorsque que son rapport CMB/CMI est supérieur à 32.



Conclusion

Conclusion

L'usage extensif des agents antibactériens dans la médication humaine a conduit à l'apparition de souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers des nouvelles molécules (Mebareki, 2010).

Pendant de nombreuses années, il est bien connu que les plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour prévenir ou guérir les maladies infectieuses. Cependant, au cours des dernières années, de nombreuses études de recherche ont signalé les propriétés d'utilisation des extraits de plantes pour lutter contre les agents pathogènes en les éradiquant ou en inhibant les mécanismes de virulence (Kalia, 2013).

Dans ce cadre nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur quelques espèces bactériennes, mais à cause le cas exceptionnelle de cette année cette étude ne pote que la partie bibliographique.

Dans cette étude et selon la recherche bibliographique, il ressort que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* ont présenté des propriétés antibactériennes contre des déférentes souches bactériennes.

Plusieurs facteurs influencent le degré d'activité des huiles essentielles, tels que la méthode d'évaluation antimicrobienne, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblés et leur éventuelle adaptation aux huiles essentielles.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées :

Etablir la partie pratique de cette étude pour pouvoir déterminer l'effet antibactérien de *Mentha pulegium* et déterminer la composition chimique des huiles essentielles de la plante pour pouvoir connaître leur composition et comprendre leur mode d'action.



Références bibliographiques

- **Abed ARABI.** 2018. Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat es sciences, Université de Mostaganem, Algérie. 181 p.
- **Addadi hanaa et Ferradji siham milouda.** 2014. extraction d'huile essentielle d'une plante médicinale « la menthe ». Mémoire de master chimie organique université Dr Molay tahar Saida faculté de science département de chimie.
- **Agnihotri VK, Agarwal SG, Dhar PL, Thappa Baleshwar RK, Kapahi BK, Saxena RK. & Qazi GN.**2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Frag. J.* 20: 607–610.
- **Aicha LATTAB.** 2018. Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat es sciences, Université de Mostaganem, Algérie. 215 p.
- **AFNOR (Association Française de Normalisation).** 2000. Recueil des normes françaises "huiles essentielles". Monographies relatives aux huiles essentielles, Paris
- **Alekshun MN, Levy SB.** 2007. Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 128(6): 1037-1050.
- **Amaral JA, Ekins A, Richards SR & Knowles R.** 1998. Effect of Selected Monoterpenes on Methane Oxidation, Denitrification, and Aerobic Metabolism by Bacteria in Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 520-525.
- **Amiar M, Bendjana I.** 2011. Les infections nosocomiales. Mémoire de master département d'écologie et génie de l'environnement, université de Guelma, 70p.
- **Amiot J.** 2005. *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier, 136 p.
- **Andreas B.** Guides des plantes du bassin méditerranéen. 1998. EUGEN ULMER, 400
- **Andrews JM.** 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- **Anonym 1 :**
http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12_fre.pdf
 2002(consulté le 20/02/2014)
- **Anonyme 2 :** www.bacteriainphotos.com
- **Anonyme 3 :** www.futura sciences.com
- **Anonym 4 :** www.textbookofbacteriology.net

- **Anonyme 5 :** http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/cours_dcem1/pseudomonas.htm
(Consulter le 8-4-2014).
- **Anonyme 6 :**
http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca98/html/ca98_39/98_039.htm (Consulter le 2-4-2014)
- **Anonyme 7 :** Faire ses huiles et ses hydrolats :
<http://www.cfaitmaison.com/sante/faire-huiles-essentielles.html>
- **Anton R, Lobstein A, Eberhard T.** 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. .
- **Arvy MP & Gallouin F.** 2003. Epices, aromates et condiments. *Ed. Belin, Paris*, 412p
- **Asada Y., Oshikawa T, Welli P.** 1998. Mémoire de magister université SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE ET SCIENCES DE LA MATIERE.
- **Baba Aissa F.** 2000. Encyclopédie des plantes utiles. Librairie Moderne, Rouiba, 368p
- **Baba Aissa F.** 1999. Encyclopedie des plantes utiles. Flore d'Algerie et du Maghreb. Edition : Librairie Moderne- ROUIBA. 368p.
- **Baby S, George V.** 2009. Essential oils and new antimicrobial strategies. *New strategies combating bacterial infection*, 165-203.
- **Bachiri L, Echchegadda G, Ibijbijen J, Nassiri L.** 2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal*, 12(30), 313-333.
- **Bakkali F, Averbek S and Averbek D.** 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 446–475.
- **Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK.** 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- **Baser KHC et Buchbauer G.** 2010. Handbook of essential oils : Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
- **Baser KHC et Buchbauer G.** 2015. Handbook of essential oils : Science, technology, and applications. CRC Press.
- **BEAUDRY FM.** 2011. Etude sur les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline chez le porc à l'abattoir au Québec Canada. Mémoire de Master : Microbiologie. Montréal : Université de Montréal, 96p.

- **Bekhechi C.** 2008 : Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse Doctorat. Université de Tlemcen, 205p.
- **Bekhechi C et Abdelomahid D.** 2010 : Les huiles essentielles .Ed : № 5145. Office des publications universitaires, 55 p
- **Belaiche P.** 1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **Bellakhdar J.** 1978. Médecine traditionnelle et toxicologique Ouest Saharienne, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Ed. Technique nord africaines, Rabat.
- **Beloued A.** 1998. Plantes médicinales d'Algérie. OPU, Alger, 270.
- **Bencheikh D.** 2012. Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria camomilla* L. Magister en Biochimie., Université Ferhat Abbes Setif. 89 p.
- **Benjilali B.** 2004. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- **Benzeggouta N.** 2005, Etude de l'activité antibactérienne des huiles Infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. 153p.
- **Besombes C.** 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, : 289p.
- **Bernier LJ.** 2015. Prévalence et caractérisation de Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline d'origine aviaire au Québec. Mémoire de Master : Microbiologie. Montréal : Université de Montréal, 112p.
- **Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzc V, Amvam Zollo PH.** 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 13 : 11-20.
- **Bouchikhi Z.** 2010. Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd – Tlemcen, 169p.

- **Bouguerra A.** 2012, Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire, Mémoire de Magister, Université Mentouri, Constantine, 128p.
- **Boukenna M et Bouzidi M.** 2007. Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Mentha viridis* L (Menthe verte) et de la *Mentha pulegium* (Menthe pouliot). Mémoire d'Ingénieur en Agronomie UMMTO.
- **Boukhalfa M.** 2014. Etude de l'activité antioxydant (test d'ABTS) des huiles essentielles et la pédologie haloxylon *Scoparium pomel* (remth) de la région de Naâma. Mémoire de master en production et amélioration végétal. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie, 70p.
- **Bremness L.** 2001. Plantes aromatiques et médicinales, BORDAS, France, 303p.
- **Bruneton J.** 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 632-915.
- **Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. p: 484-488.
- **Buagnicont F.** 1995. à. Laboratoire d'analyse biochimique , le cahier des techniques l'INRH , p 23.67.
- **Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL.** 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*: Rockville, MD, 1367.
- **Burt S.** 2004 : Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of food microbiology*, 94(3) : 223-253.
- **Carson CF, Mee BJ & Riley TV.** 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1914–1920.
- **Chaker H.** 2012. Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Thèse de doctorat : Grenoble: Université de Grenoble : Science agricole, 291p.
- **Chao SC, Young DG & Oberg CJ.** 2000. Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 639-649.

- **Chemat F, Lucchesi ME, Smadja J and Visionsi F.** 2006. Microwave accelerated stream distillation of essential oil from lavender : a rapid clean and environmentally friendly approach. *Anal Chim. Acta* 555 : 157-160.
- **Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR & Wyllie SG.** 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88 : 170-175.
- **Crouzilles C.** 2011. Les essentiels en IFSI: Infectiologie et hygiène – Soins infirmiers et gestion des risques. 7, UE 2.5-4.5.
- **Das K, Tiwari R, Shrivastava D.** 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents : current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4 : 104-111.
- **Davidson PM.** 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In : M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington. *Food Microbiology*. 520-556 p.
- **Degryse A, Delplala I et Voinier M.** 2008. Risques et bénéfices possible des huiles essentielles. Ecole des Hautes Etudes En Santé Publique. pages 94p., ann., réf. 7p., .
- **Delille L.** 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger. 240 p.
- **Diaz-Maroto MC, Castillo N, Castro-Vazquez L, Gonzalez-Vinas MA. & Perez-Coello MS.** 2007. Volatile composition and olfactory profile of pennyroyal (*Mentha pulegium L.*) plants. *Flavour Frag. J.* 22: 114-118.
- **Djelouat S.I :** 2011. Les *Escherichia coli*. Blogspot. P : 1.
- **Dolarras C.** 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc. Paris. P : 289, 476.
- **Dorman HJ & Deans SG.** 2000. Antimicrobial agents from plants : antimicrobial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- **Elodie G.** 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de CORSE-PASQUALE PAOLI, 148p.
- **Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, Banat IM.** 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters* 38(6), 1015-1019.

- **Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 7687-7692.
- **Essawi T, & Srour M.** 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology.* 70, pp. 343-349.
- **Eyquen AI et Montgner L.** 2000. Traitement microbiologique chimique, édition Lanor Paris, P66-121.
- **Faurs E.** 2002. Les infection nosocomiales. disponible sur : <http://www.caducee.net/dossierspecialises/infection/nnosocomiales.asp>
- **Fernandez X et Chemat F.** 2012 : La chimie des huiles essentielles. Ed. Vuibert . p : 274
- **Fouché JG, Marquet A and Hambuckers A.** 2000. Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman, Liège, pp. 1-18.
- **Fournel L.** 2017. Les infections du site opératoire Surgical site infections, *Revue Francophone de Cicatrisation*, 1(2) : 27-30.
- **Ganou, L.** 1993. Contribution à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de l'INP Toulouse, France, 273p.
- **Garnero J.** 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et normalisation, Edition technique. Encyclo. Med. Nat . Paris, France 9-20 59.
- **Gazengel JM, Orecchioni, AM.** 1999. Le préparateur en pharmacie. Guide théorique et pratique. 2ème.
- **Genné D, Siegrist Hans H.** 2003. De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*, 20 ; 464-468.
- **Gerenutti M, Modesto L, Valessandra carrara V, Alves magalhães, S.** 2014. Maternal exposure to aqueous extract of *Mentha pulegium* L. inducing toxicity to embryo development in rats. *Full Length Research Paper*, 8(22) : 609-614.
- **Gessard C.** Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Rev Infect Dis.* 1984 Sep-Oct;6 Suppl 3:S775-66.
- **Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, van Breda M, Baker LJ, Cars O, Davey PG.** 2006. National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 62: 373-379.

- **Guardabassi L., Courvalin P.** 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press : Washington, 1-18.
- **Guignard JL & Dupont F.** 2004. Botanique : Systématique moléculaire, 13^{ème} éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.
- **Guignard JL and Potier P.** 2000. Biochimie végétale, 2^{ème} ED, ed. T. 2. : Dunod.
- **Guillaume.** 2000. Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie / microbiologie cours.
- **Guinoiseau, E.** 2010 : Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université de Corse, 149p
- **Gutteridge JM, Halliwell B. Ann NY Acad Sci.** 2000, 136-47in revue medicine /science, 2006, 22, 266-272.
- **Hayes AJ, Leach DN, Markham JL, & Markovic BJ,** 1997. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. *Essential Oil Research.* 9: 575-582.
- **Himed L.** 2011, Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine, Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine. 91p.
- **Joly-Guillou ML.** 2006. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation* 15 : 237-240.
- **Jouault S.** 2012. La qualité des huiles essentielles et sont influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Faculté de pharmacie. Université de Lorraine, France, 147p.
- **Juliano RL, Ling VA.** 1976 Surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 152-162.
- **Juven BJ, Kanner J, Schved F, & Weisslowicz H.** 1994. Factors That Interact with the Antibacterial Action of Thyme Essential Oil and Its Active Constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.
- **Kalemba D, Kunicka A.** 2003, Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem*, 10, p 813-829.
- **Kalia VC.** 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances.* 31(2), 224-245.

- **Kara TI.** 2014. Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat : Biologie. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen, 84p.
- **Kebissi H.** 2004. Encyclopédie des herbes et plantes médicinales , Dar AL-Kotob AL-Ilyah, Beyrouth-Liban, 566p.
- **Khiati M.** 1998: Guide des maladies infectieuses et parasitaires. OPU, Alger.
- **Knobloch K, Pauli A, Iberl B, Weigand H & Weis N,** 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1: 119-128.
- **Lahlou M.** 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research.* 18 : 435-448.
- **Lamaison JL, Petitjean-Freytet C, Carnat A.** 1990. Teneurs en rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Boraginacées et les Lamiacées médicinales. *Ann Pharm Fr*, 48:103-108.
- **Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, & Carde JP.** 1994. Biogénèse des monoterpènes, I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 133: 69-78.
- **Lambert PA.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1471-1485.
- **Lamin A, Lhaloui S, Bendjilali B, Brradi M.** 2001. Field corps Research., 71, 9-15
- **Laouer H.** 2004. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Ammoides pusilla et de Magydaris pastinacea. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Leclerc H,** 1976. Précis de phytothérapie, Masson, Paris 363p.
- **Le Minor L, et Véron M.** 1984. Bactériologie Médicale. Flammarion Médecine-sciences. Paris. P : 214, 215, 244, 246-253, 367, 371-383, 511, 513, 514, 525.
- **Lemordant D, Boukef K, Bensalem M.** 1977. Plantes utiles et toxiques de Tunisie, *Fitoterapia*, 48 : 191-214.
- **Levy SB, Mc Murry L.** 1978. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature*, 276: 90-92.
- **Lis-Balchin M.** 2003. Lavender: the genus Lavandula, CRC press.

- **List PH, Horhammer L, Roth HJ et Schmid W.** 1980. Hagers Hundbuch der Pharmazeutischen Praxis, 4. Aufl., Bde. Ibis VIII, Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- **Lorenzi H, Matos, FJA.** 2002. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exoticas cultivadas. *Instituto Plantarum*, 512 p.
- **Lucchesi ME.** 2005. Extractions sans solvants assistée par micro-onde conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en chimie. Faculté des Science et Technologies. Université de la Reunion, 147p
- **Luicita LR.** 2006. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France. 335p.
- **Mebarka L.** 2007. Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Tinguarra sicula. Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas-Setif.
- **Mehdi S.** 2008. La fréquence des bactéries multi résistante a l'hôpital Hassan ii de Settat .THESE.[en ligne] .Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie. RABAT : UNIVERSITE MOHAMMED VFACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE, 48-51p.
- **Mengel P, Beh D, Bellido GM et Monpon B.** 1993. VHMD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes .*Parf. Cosm. Arom.* 114 : 66-67.
- **Morales.** 2002. The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the Thymus. Ed. Taylor & Francis, London. évolutive des composés secondaires. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de montpellier. pp. 1-43.
- **Nait AK.** 2012. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'eucalyptus poussant dans la région de tiziouzou. Thèse de magistère en chimie appliquée, université Mouloud mameri; pp:13.
- **Narishetty STK. Panchagnula R.** 2004. Administration transdermique de zidovudine: effet des terpènes et leur mécanisme d'action. *Journal of controlled release*, 95(3) : 367-379.
- **Nauciel Cet vildé JL.** 2005. Bactériologie médicale vétérinaire ,2eme édition, Paris ,P52.
- **Nikaido H.** 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem*, 78 : 119-146.

- **Normak HB, Normak S.** 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med*, 252: 91-106.
- **Noudin C, Grumbach N.** 2000. Larousse médicale, Larousse & Bardas, Paris, 1203p
- **Pellerine P.**1991. Supercritical extraction of nature raw materiels for the flavour and perfum industry. *Perfum*, 16(4) : 37-39.
- **Piochon M.** 2008. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse, Mémoire de la maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec A Chicoutimi. 213p.
- **Platzer N.** 2002. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- **Poole K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 12-26.
- **Prescott W, Harley S et Klein W.** 2010. Microbiologie. 3em édition. deboeck. Bruxelles. P : 843, 845.
- **Quézel P & Santa S.** 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- **Rahal S.** 2004. Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.16
- **Raymond J, Aujard Y.** 2000. Nosocomial Infections in Pediatric Patients: A European, Multicenter Prospective Study. European Study Group. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 21(4): 260–263.
- **Rebiahi S.** 2012. Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibiorésistance au niveau du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. 158p.
- **Rebiahi S.A. ; Rahmounam. ; Seddikib S.M.L. ; Kadia K. ; Belhadjic F. ; Chabnic N. ; Kunkeld D.** 2014. Infections nosocomiales causées par *Staphylococcus aureus* producteur de biofilm dans l'unité de néonatalogie de l'établissement hospitalier spécialisé mère-enfant de Tlemcen, Algérie. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 27: 228-235.
- **Rhayour K.** 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 170p.

- **Rios J, Recio M, Villar A.** 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23 : 127-149.
- **Salle JL et Pelletier J.** 1991. Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.
- **Salzer UJ.** 1977. The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings- a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 9: 345-373.
- **Samah D.** 2012. Les huiles essentielles Des mystérieux métabolites secondaires ; Deutsche National bibliografie ; page 64.
- **Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC.** 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press.
- **Siebert C, Cruzilles C.** 2010. Les essentiels en IFSI: Processus inflammatoires et infectieux. Vol 14, UE 2.5.
- **Sikkema J, De Bont JAM & Poolman B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222
- **Singh SB, Barrett JF.** 2006. Empirical antibacterial drug discovery - foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol*, 71(7): 1006-1015.
- **Stammn E.** 1986. Nosocomial urinary tract infection Bennt. Rachman.P.S hospital infection. 347-384.
- **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, WestbrookWadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000 Aug 31;406(6799):959-64.
- **Suffredini J B, Sader H S., Goncalves A G, Reis A O, Gales A C, Varella AD et al.** 2004. Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. *Brazil. J.Med. Biol. Res.* 37, pp. 379-384.
- **Teuscher E, Anton R & Lobstein A.** 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Technique et Documentation, Edition Lavoisier, Paris

- **Tomi F, Bradesi P, Bighelli A & Casanova J.** 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.*, 1: 25-34.
- **Tongnuanchan P, & Benjakul S.** 2014. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249.
- **Tucker A, Rfcnacz I.** 2007. *Mentha : Un Aperçu De La Classification Et Les Relations.*
- **Valnet J.** 1984. *Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes.* Maloine S.A. éditeur. Paris p 544.
- **Wendakoon CN & Sakaguchi M.** 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58: 280-283.
- **Wilkinson JM.** 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine. Turning medicinal plants into drugs*, 8 : 157-171
- **Wright GD.** 2005. Bacterial resistance to antibiotics : enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57: 1451-1470
- **Yagupsky P.** 2006. Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 25: 974-976
- **Zaika L.** 1988. Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination». In : risques et bénéfices possible des huiles essentielles. *Journal of Food Safety*, 9: 97-118.
- **Zani F, Massimo G, Benvenuti S, Bianchi A, Albasini A, Melegari M, Vampa G, Bellotti A & Mazza P.** 1991. Studies on the Genotoxic Properties of Essential Oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/Microsome Reversion Assay. *Planta Medica*, 57: 237-241.
- **Zargari A.** 1990. *Herbal Medicines.* Publication of Tehran University, Iran. pp: 14-18.