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

ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE-KOUBA
El cheikh Mohamed El Bachir El Ibrahimi

Département de Chimie

N° d'ordre : 05/2021

T H È S E

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : **Chimie**

Option **: Chimie Organique Appliquée**

Présenté par

KEHILI Sarah

Thème

Potentielles Applications des Huiles Essentielles (Menthes, Eucalyptus) comme Conservateur et Antioxydant Naturels *in vitro* et dans une Matrice Alimentaire

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Institution	Statut
M^{me} A. HASSANI	Pr	ENS-Kouba	Présidente
M^{r} M.N. BOUKHATEM	MCA	Univ. Blida 1	Directeur de thèse
M^{r} M.A FERHAT	Pr	ENS-Kouba	Co-Directeur de thèse
M^{me} N. BOUDRIES	MCA	ENS-Kouba	Examinatrice
M^{me} Z. CHEMAT	MCA	Univ. Blida 1	Examinatrice
M^{r} A. BENCHAABENE	Pr	ENSA	Examinateur

Soutenance le : **17/03/2021 à 09h : 30**

RESUME

L'objectif assigné à notre étude consiste à évaluer le pouvoir antioxydant, antimicrobien, antiinflammatoire, analgésique et cicatrisant des huiles essentielles (HE) distillées des menthes verte (Mentha spicata) et poivrée (Mentha piperita), pour une éventuelle utilisation en aromathérapie antiinfectieuse et/ou comme conservateur alimentaire naturel. L'huile essentielle de menthe poivrée (HEMP), extraite à échelle industrielle par entrainement à la vapeur sous pression, a été analysée par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse afin de déterminer son profil chromatographique. Le menthol apparaît comme le constituant majoritaire de l'HEMP (54,47%), suivi par le menthone (16,75%). Pour l'huile essentielle de menthe verte (HEMV), elle est caractérisée par sa richesse en carvone (52,6%). Les activités antibactérienne et antifongique des essences aromatiques des menthes ont été vérifiées sur des souches microbiennes, isolées cliniquement (principalement des denrées alimentaires ou des infections humaines). En aromatogramme, l'HEMP est active sur Streptococcus agalactiae qui s'est révélé le germe le plus sensible avec un diamètre de zone d'inhibition (DZI) de 21,5±2,1 mm lors de l'application d'une faible quantité en HE (20 µL), et de 42,5±3,5 mm à forte dose (60 µL). Aussi, cette action inhibitrice est « dose-dépendante ». Concernant l'activité antifongique, l'HEMP est douée d'un pouvoir inhibiteur en particulier sur Rhodotorula sp., Saccharomyces cerevisiae et Candida tropicalis (Ct2) avec des DZI variant entre 17 et 85 mm à faible dosage. Pour l'HEMV, les DZI varient entre 12±1,4 mm et 20 mm à faible dose (20 µL) et entre 16,5±0,7 mm et 44±1,41 mm à forte dose. S. agalactiae demeure aussi le germe le plus sensible. A forte dose, c'est S. cerevisiae qui est la levure la plus sensible avec un DZI de 44±1,4 mm. Par ailleurs et contrairement en aromatogramme, de meilleurs résultats ont été obtenus en microatmosphère. Les DZI obtenus sont largement supérieurs en phase vapeur qu'en phase liquide, sauf exception pour Klebsiella pneumoniae. La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CM) a révélé que Rhodotorula sp. est le germe le plus sensible avec une CMI la plus faible (0,0078%), suivi par d'autres levures, à l'exemple de Candida tropicalis (Ct1) et Saccharomyces cerevisiae (0,5%). L'efficacité de l'HEMP a été vérifiée en l'incorporant, à différentes concentrations (1, 2 et 6 µL/L), dans une matrice alimentaire (boisson Orangina). Les activités anti-inflammatoires aigue et topique des HE ont été explorées, in vivo, par la méthode de l'œdème des pattes induit par la carraghénine et d'œdème des oreilles induit par le xylène. Le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité avec une forte dose d'HEMP (200 µL/kg) est celui qui a présenté le taux le plus élevé (12,27±3,94%), suivi par le contrôle positif (12,27±3,94%). C'est l'inverse pour l'HEMV où le groupe contrôle positif a présenté le taux le plus élevé, de l'ordre de 85,32%, suivi par le lot traité par une dose de 20 µL/mL d'HEMV (77,24%). Aucune différence, sur le plan statistique ($p > 0,05$), n'a été décelée entre ces deux groupes. Cette activité a été aussi confirmée, à échelle cellulaire, via des coupes histologiques au niveau des oreilles gauches de toutes les souris par la technique de coloration Hématoxyline-Eosine. L'efficacité du pouvoir cicatrisant des huiles a été réalisée grâce à des observations macroscopiques avec recours à des techniques de planimétrie, complétées par des prélèvements histologiques. Une cicatrisation totale et rapide a été enregistrée au 15ème jour après un traitement journalier avec la crème contenant l'HEMP (0,5%) alors qu'elle a été moins rapide et incomplète avec le contrôle négatif. En résumé, notre étude a confirmé les propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire et cicatrisante de l'HE de menthe poivrée. Son utilisation pourra trouver une place dans l'arsenal thérapeutique comme un ingrédient actif dans des préparations galéniques a visée thérapeutique. Reste à confronter ces données avec une étude cyto-toxicologique approfondie. Seul l'avenir nous confirmera l'impact réel de ces nouvelles acquisitions.

Mots-clés: Mentha spicata ; Mentha piperita ; Huiles essentielles ; Propriétés antimicrobiennes, Antiinflammatoire topique ; Menthol ; Carvone ; Crème dermique cicatrisante.

ABSTRACT

The objective of our study is to evaluate the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, analgesic and wound-healing properties of spearmint (Mentha spicata) (SEO) and peppermint (Mentha piperita) essential oils (PEO). The essential oils (EO) have been extracted using an industrial scale by steam distillation, and were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Menthol has been found to be the major compound of PEO with a rate of 54.47%, followed by menthone (16.75%). For SEO, carvone was detected in a high amount (52.6%). The in vitro antibacterial and antifungal activities of SEO and PEO have been assessed against different microbial strains isolated either clinically from human infection samples or from food. By using agar disc diffusion method, PEO is active against Streptococcus agalactiae which has been shown to be the most sensitive bacteria with an inhibition zone diameter (IZD) of 21.5±2.1 mm when applying a small amount of EO (20 µL), and 42.5±3.5 mm at high dose (60 µL). Further, this microbial inhibitory action is "dose-dependent". Regarding the fungal strains, PEO exhibited a potent antifungal effect, particularly on Rhodotorula sp., Saccharomyces cerevisiae and Candida tropicalis with IZD varying between 17 and 85 mm. For the SEO, the IZD vary between 12±1.4 mm and 20 mm at low volume (20 µL) and between 16.5±0.7 mm and 44±1.41 mm at high amount. At high doses, S. cerevisiae is the most sensitive yeast with an IZD of 44±1.4 mm. However, better results have been obtained using the disc volatilization method. The IZD obtained are much higher in the vapor phase than in the liquid phase, with the exception of Klebsiella pneumoniae. The determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) revealed that Rhodotorula sp. is the most sensitive strain with the lowest MIC value (0.0078%), followed by other yeasts, such as C. tropicalis and S. cerevisiae (0.5%). The antifungal effectiveness of the MPEO was confirmed by its incorporation in a real food system (Orangina juices) at different concentrations (1, 2 and 6 µL/L), alone or in combination with thermal treatment (80 °C/2 min). The in vivo acute and topical anti-inflammatory activities of EOs were evaluated using the carrageenan-induced paw edema and xylene-induced ear edema methods, respectively. Calculation of the percentage reduction in edema revealed that the mice treated with a high dose of PEO (200 µL/kg) had the highest rate (12.27±3.94%), followed by the positive control group (12.27±3.94%). However, in the case of SEO, the positive control group presented the highest level (85.32%), followed by the animals treated with a dose of 20 µL/mL of SEO (77.24%). No statistical difference ($p > 0.05$) was detected between these two groups. This activity was also confirmed at the cellular level using histological examinations in the animal ears by the hematoxylin-eosin staining technique. The wound-healing effect of EOs was assessed using macroscopic observations and planimetry techniques, followed by histological examinations. Total and rapid healing was recorded on the 15th day after daily treatment with the cream containing PEO (0.5%), while it was slower and incomplete with the negative control group. In conclusion, our results support the use of PEO in the development of pharmaceuticals for the management of human infection, inflammation and pain. Additional cellular and molecular assays will be done to investigate the real mechanism of EOs including its active components. The data of our research may offer an experimental base for additional systematic studies and clinical application of EOs resources.

Keywords: Mentha spicata ; Mentha piperita ; Essential oils ; Antimicrobial properties ; Topical antiinflammatory ; Menthol ; Carvone ; Healing dermal cream.

ملخـص

تم إجراء هذا البحث من أجل تقييم بعض الخصائص العلاجية للزيوت الأساسية المستخلصة من نبتة النعناع الأخضر spicata) Mentha) والنعناع الحار piperita Mentha))،حيث تمت دراسة فعاليتها في تثبيط نمو الجراثيم مخبريا من أجل إستخدامها كمحافظات غذائية طبيعية، بالإضافة إلى قدرتها على التخفيف من حدة الإلتهابات الموضعية و التشنجات البطنية و في إلتآم الجروح الجلدية لدى الحيوانات المخبرية .تم إستخلاص الزيوت الأساسية على نطاق صناعي بإستخدام طريقة التقطير بالبخار تحت الضغط. كما كشف التحليل الكروماتوجرافي الغازي على وجود مركب المنثول بصفة معتبرة في الزيت العطري للنعناع الحار 47,54) ،)٪يليه المينثون (75,16 .(٪أما بالنسبة لزيت النعناع الأخضر، فقد كشف التحليل عن غناه بمركب سيتوني من نوع الكارفون بنسبة 6,52 .٪و من أجل معرفة مدى فعالية تلك الزيوت في تثبيط نمو البكتيريا والفطريات المعزولة بشكل رئيسي من المواد الغذائية أو من التعفنات البشرية، قمنا بإجراء طريقة" aromatogramme" التي أظهرت على أن زيت النعناع الحار فعال في الحد من نمو بعض الجراثيم بالخصوص" Streptococcus agalactiae " حيث بلغ قطر منطقة تثبيط النمو 5,21 ± 1,2 ملم (20 ميكرولتر) و 5,42 ± 5,3 ملم (60 ميكرولتر .(كذلك فقد تميزت هذه الزيوت في فعاليتها في تثبيط نمو مختلف الفطريات و الخمائر بالخصوص sp Rhodotorula و cerevisiae Saccharomyces و tropicalis Candida مع وجود مناطق تثبيط يتراوح قطرها ما بين 17 و 85 ملم. من جهة أخرى، فقد كشف هذا الفحص المخبري عن فعالية زيت النعناع الأخضر في تثبيط نمو بكتيريا " agalactiae Streptococcus"حيث تراوحت أقطار التثبيط ما بين 12 ± 4,1 ملم و 20 ملم (20 ميكرولتر) و ما بين 5 ± 7,0 ملم و 44 ± 41,1 ملم (60 ميكرولتر). و تعتبر خميرة" cerevisiae Saccharomyces" من بين الفطريات الأكثر حساسية حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 44 ± 4,1 ملم. أما فيما يتعلق بإستخدام طريقة microatmosphère"،"فقد تحصلنا على نتائج أفضل بكثير بإستثناء بكتيريا. pneumoniae Klebsiella كذلك فقد كشف تحديد الحد الأدنى من التراكيز المثبطة) CMI) أن sp Rhodotorula.هي الأكثر حساسية مع تسجيل أدنى قيمة CMI قدرت ب 0,0078 ،٪تليها الخمائر الأخرى، مثل tropicalis Candidaو(. 5.0 Saccharomyces cerevisiae ٪)كما تم التحقق من فعالية الزيوت العطرية للنعناع الحار من من خلال دمجه في عصير ثمري من نوع Orangina"،"و ذلك بغية الحد من نمو الفطريات المتسببة في تلف المشؤوبات السكرية .من جهة أخرى فيمكن إعتبار الزيوت العطرية من بين المركبات الحيوية الطبيعية ذات خصائص علاجية بالخصوص ضد الإلتهابات الجلدية المحلية و التشنجات البطنية. حيث كشفت النتائج المخبرية الأولية عن تراجع الإلتهاب القدمي بنسبة 27,12 ± 94,3 ٪عند إستخدام زيت النعناع الحار بجرعات عالية (200 ميكرولتر/كغ)، و بنسبة 32,85 ٪لدى الحيوانات المخبرية المعالجة بجرعة 20 ميكرولتر/كغ من زيت النعناع الأخضر. كما تم التأكد من نجاعتها في معالجة الإلتهاب الموضعي المتمركز بأذن تلك الحيوانات. حيث كشفت النتائج عن تراجع الإلتهاب وبصفة معتبرة و هذا ما تم التأكد منه على المستوى الخلوي. و في نفس السياق فقد تم التأكد، من خلال هذا البحث، من فعالية هذه الزيوت ضد الآلام و التشنجات البطنية لدى الحيوانات المخبرية و بالتالي يمكن إعتبارها كبديل طبيعي في التخفيف من حدة الآلام و الإلتهابات الموضعية. كذلك فقد تم تركيب مستحلب صيدلاني محب للماء من نوع كريم جلدي يحتوي على الزيوت الأساسية كمادة فعالة و ذلك من أجل دراسة مدى فعاليتها في إلتآم الجروح الجلدية الدائرية لدى فئران التجارب المخبرية Wistar)،)و ذلك مقارنة مع كريم جلدي من نوع". 1% Madécassol" كذلك فقد تم وضع المراهم الجلدية على مستوى الجروح المتمركزة بالمنطقة الظهرية للفئران بصفة يومية منتظمة و لمدة 15 يوما. أما بالنسبة لتطور إلتآم الجروح فقد تم قياسها بتقنية " numérique planimétrie"من خلال أخذ بصمات الجروح بصفة منتظمة و تحديد مساحتها. كشفت النتائج المتحصل عليها عن تراجع ملحوظ لمساحة الجروح لدى الفئران التي تمت معالجاتها بإستخدام كريم الجلد الذي يحتوي على 5.0% من الزيوت الأساسية . أخيرا و من خلال ما ورد ذكره فيما يتعلق بالفوائد العلاجية و الخصائص المضادة لنمو الجراثيم الغذائية، يمكن تصنيف الزيوت العطرية لنبتة النعناع الحار كمادة حافظة طبيعية ذات أهمية علاجية

.الكلمات الرئيسية spicata Mentha : ، piperita Mentha، الزيوت الأساسية العطرية ، مضادات الجراثيم ، مضادات الإلتهابات الموضعية ، Menthol، Carvone، كريم إلتآم الجروح الجلدية.