



République Algérienne démocratique et populaire Ministère
de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

FILIERE : Biotechnologie

OPTION: Biotechnologie Végétale

Thème

**L'activité antibactérienne des huiles essentielles
d'une espèce du genre *Mentha sp***

Présenté par :

BOUROUBA Sirine Racha et HARNANE Chaima

Soutenu le : 19 / 06 /2025

Mémoire de Master académique soutenu devant le jury composé de :

| | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------------------------------------|
| Présidente | Mr BENSIZERARA Djamel | M.C. A | Université Abbes Laghrou - Khenchela |
| Encadreur | Mme ZITOUNI Wassila | M.A.A | Université Abbes Laghrou - Khenchela |
| Co- Encadrant | Mme CHORFI Keltoum | M.A.A | Université Abbes Laghrou - Khenchela |
| Examineur | Mme BENCHELALI Soumia | M.C.B | Université Abbes Laghrou - Khenchela |

Année Universitaire 2024/2025

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

On tiens tout d'abord à remercier ALLAH tout puissant de nous avoir donné la patience, la santé et pour nous avoir accordé la Volonté et le courage pour élaborer ce travail.

On tient à remercier vivement **M^{me} ZITOUNI W et CHORFI K** maître assistant classe A à l'université Abbés Laghrour-Khenchela, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, sa compréhension, sa compétence, la qualité de ses conseils et son aide durant tout le long de mon mémoire.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres de jury ; d'avoir accepté d'évaluer ce travail ; **Mr BENSIZERARA D** Maitre de conférences A à l'université Abbes Laghrour d'être président du jury de soutenance, et **Mme BENCHELALI S** Maitre de conférences B à l'université Abbes Laghrour pour avoir accepté d'examiner ce travail.

On adresse notre profond remerciement aussi à l'équipe de laboratoire pédagogique de Biologie à l'université Abbes Laghrour Khenchela pour l'aide qu'ils nous ont donné et les efforts déployés pour faciliter notre travail.

Enfin, on remercie tous les enseignants durant ce long cycle de formation, et tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ma mère, la femme exceptionnelle qui a toujours été à mes côtés, dans les moments de joie comme dans les épreuves.

Sa force, son amour inconditionnel, ses sacrifices silencieux et ses encouragements constants ont été le socle de mon parcours.

Maman, tu as cru en moi même quand j'en doutais. Ce travail est aussi le fruit de ton courage et de ton soutien sans faille. Merci pour tout.

Je me dédie également ce mémoire, à moi-même, pour avoir tenu bon malgré les difficultés, pour avoir persévéré quand le chemin devenait incertain.

Pour les heures de travail, les doutes surmontés, et les efforts constants.

Ce mémoire symbolise aussi une victoire personnelle : celle de ne pas avoir abandonné, de m'être battue pour aller jusqu'au bout.

À ma mère et à moi : ce mémoire est le reflet de notre courage, de notre patience et de notre détermination

Sirine Racha

Dédicace

À ma chère famille,

À mes parents, pour leur amour inconditionnel, leur patience et leurs sacrifices qui m'ont permis d'avancer.

À mes frères et sœurs, pour leur soutien, leur encouragement et leur présence à chaque étape de ma vie.

Merci de croire en moi, même dans les moments de doute.

Ce travail vous est dédié, avec tout mon amour et ma reconnaissance.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, en particulier *Mentha sp.*, une espèce spontanée de la famille des *Lamiaceae* récoltée de la région de Chechar (wilaya de Khenchela) et largement reconnue par la population algérienne pour ses propriétés thérapeutiques.

L'étude vise à explorer sa bioactivité à travers l'identification de métabolites secondaires présents dans son extrait aqueux, notamment les alcaloïdes, tanins, saponines, triterpénoïdes et glycosides. L'absence de flavonoïdes, protéines et amidon a également été constatée. Sur le plan phytotoxique, l'effet allélopathique sur la germination de *Raphanus sativus* est marqué, avec une inhibition complète observée à 100 ppm, révélant un potentiel intéressant en tant que bioherbicide. L'activité antibactérienne de l'extrait s'est révélée modérée et dépendante de la concentration, particulièrement inefficace contre certaines souches Gram négatif en particulier *Pseudomonas aeruginosa*.

En revanche, l'effet antifongique sur *Saccharomyces cerevisiae* est significatif, avec une viabilité cellulaire nulle dès 50 ppm.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel de *Mentha sp.* comme source naturelle de molécules à application agronomique et pharmaceutique, ouvrant la voie à des investigations plus poussées sur l'isolement des composés actifs.

Mots clés : *Mentha sp.*, valorisation, huile essentielle, criblage phytochimique, allélopathie, activité antibactérienne et activité antifongique.

Abstract

This work is part of an effort to valorize medicinal plants used in traditional medicine, particularly *Mentha sp.*, a species from the *Lamiaceae* family grow naturally in the Chechar region (Khenchela province) and widely recognized by the Algerian population for its therapeutic properties.

The study aims to explore its bioactivity through the identification of secondary metabolites present in its aqueous extract, including alkaloids, tannins, saponins, triterpenoids, and glycosides. The absence of flavonoids, proteins, and starch was also noted. In terms of phytotoxicity, a strong allelopathic effect was observed on the germination of *Raphanus sativus*, with complete inhibition at 100 ppm, suggesting promising potential as a bioherbicide.

The antibacterial activity of the extract was moderate and concentration-dependent, with limited efficacy, especially against certain Gram-negative strains such as *Pseudomonas aeruginosa*.

In contrast, the antifungal effect on *Saccharomyces cerevisiae* was significant, with total loss of cell viability observed from 50 ppm.

These findings highlight the potential of *Mentha sp.* as a natural source of compounds with agronomic and pharmaceutical applications, paving the way for further investigation into the isolation of its active constituents.

Keywords: *Mentha sp.*, valorization, essential oil, phytochemical screening, , bioherbicide, antibacterial activity and antifungal activity.

ملخص

يندرج هذا العمل ضمن جهود تثمين النباتات الطبية المستخدمة في الطب التقليدي، وخاصة *MENTHA SP.*، وهي نوع من فصيلة الشفوية (*LAMIACEAE*) تنمو بشكل عفوي في منطقة

ششار (ولاية خنشلة)، ومعروفة على نطاق واسع بين السكان الجزائريين بخصائصها العلاجية. يهدف هذا البحث إلى دراسة النشاط البيولوجي للنبات من خلال تحديد المركبات الثانوية الموجودة في مستخلصه المائي، بما في ذلك القلويدات، والعفص، والصابونين، والتريترينويدات، والجليكوسيدات. كما تم تسجيل غياب الفلافونويدات، والبروتينات، والنشاء.

من الناحية الفيزيولوجية النباتية، أظهر النبات تأثيراً أليوبياً واضحاً على إنبات *RAPHANUS SATIVUS*، حيث لوحظ تثبيط تام للإنبات بتركيز 50 جزء في المليون، مما يشير إلى إمكانية استخدامه كمبيد أعشاب طبيعي.

أما النشاط المضاد للبكتيريا فقد كان متوسطاً ويعتمد على التركيز، مع فعالية محدودة خصوصاً ضد بعض السلالات سالبة الجرام مثل *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

بالمقابل، أظهر المستخلص فعالية فطرية عالية ضد *SACCHAROMYCES*

CEREVISIAE، حيث لوحظ انعدام في حيوية الخلايا بداية من تركيز 50 جزء في المليون.

تشير هذه النتائج إلى الإمكانيات الكبيرة لـ *MENTHA SP.* كمصدر طبيعي لجزيئات ذات

تطبيقات زراعية ودوائية، مما يمهد الطريق لمزيد من الأبحاث لفصل وتحديد المركبات الفعالة.

الكلمات المفتاحية: *MENTHA SP.*، تثمين، زيت أساسي، كشف فيتوكيميائي، الأليوباثي، نشاط

مضاد للبكتيريا و نشاط مضاد للفطريات.

Table des matières

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| ملخص | |
| Table des matières | I |
| Liste des figures..... | III |
| Liste des photographies | IV |
| Liste des tableaux | V |
| Liste des abréviations | VI |
| Introduction..... | 1 |
| <i>Matériel et méthodes</i> | |
| 1. Matériel végétal | 5 |
| 1.2. Présentation de site de récolte..... | 6 |
| 1.3. Matériel végétal et préparation de l'extrait..... | 7 |
| 2. Dépistage phytochimique (screening) des métabolites secondaires | 7 |
| 2.1. Les tests de Dépistage phytochimique..... | 8 |
| 3. Extraction de l'huile essentielle de <i>Mentha sp</i> | 9 |
| 4. Test de phytotoxicité..... | 10 |
| 4.1. Étapes post-germination (analyse cytologique et traitement des racines) | 11 |
| 5. Test de l'activité antibactérienne | 13 |
| 5.1. Évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles..... | 13 |
| 5.2. Méthode des disques imprégnés | 13 |

Table des matières

| | |
|---|----|
| 5.3. Préparation des disques..... | 13 |
| 5.4. Choix et origine des souches bactériennes test..... | 14 |
| 5.5. La préparation des suspensions bactériennes | 14 |
| 5.6. Ensemencement et dépôt des disques | 15 |
| 5.7. Mesure des zones d'inhibition et analyse des résultats | 16 |
| 6. Test antiprolifératif | 17 |
| 6.1. Préparation de l'inoculum (milieu de base)..... | 17 |
| 6.2. Préparation du bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB)..... | 17 |
| 6.3. Évaluation de la viabilité cellulaire | 17 |
| <i>Résultats et discussion</i> | |
| 1. Résultats du Screening phytochimique..... | 19 |
| 2. Résultats des Effets phytotoxiques | 21 |
| 2.1. Activité anti-mitotique..... | 24 |
| 3. Analyse des résultats de l'activité antibactérienne | 26 |
| 3.1. Analyse comparative des répétitions R1 et R2 | 29 |
| 4. Test antiprolifératif (de viabilité)..... | 32 |
| Conclusion générale..... | 38 |
| Références bibliographiques..... | 40 |

Liste des figures

Liste des figures

- Figure 1.** *Mentha sp* **a)** en forme fraiche **b)** après broyage 5
- Figure 2.** Site de récolte ce la commune de chechar à la wilaya de kenchela 6

Liste des photographies

Liste des photographies

| | |
|---|----|
| Photographie 1 : Préparation d'extrait aqueux | 7 |
| Photographie 2 : Les solutions utilisées dans le dépistage phytochimique | 9 |
| Photographie 3 : Le dépôt des graines de radis (<i>Raphanus sativus</i>) dans les boîtes | 11 |
| Photographie 4 : Traitement des racines et analyse cytologique..... | 12 |
| Photographie 5 : Préparation et ensemencement du milieu de culture Mueller Hinton. ... | 15 |
| Photographie 6 . Dépôt des disques de l'huile pure, de ses dilutions et des témoins. | 16 |
| Photographie 7 : Préparation des suspensions de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et bleu de méthylène | 18 |
| Photographie 8 : La préparation de l'échantillon sur la cellule de Malassez | 18 |
| Photographie 9 : Photographies des cellules observées sous microscope X10 traitées avec 25 ppm | 24 |
| Photographie 10 : Photographies des cellules observées sous microscope X40 traitées avec 25 ppm | 25 |
| Photographie 11 : Photographies des cellules observées sous microscope X10 traitées avec 100 ppm. | 25 |
| Photographie 12 : Photographies des cellules observées sous microscope X40 traitées avec 100 ppm | 25 |
| Photographie 13 : Effet antibactérien sur la souche 1 <i>Staphylococcus aureus</i> (R1 et R2). 27 | |
| Photographie 14 . : Effet antibactérien sur la souche 2 <i>Bacillus sp</i> (R1 et R2) | 27 |
| Photographie 15 : Effet antibactérien sur la souche 3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R1 et R2) | 27 |
| Photographie 16 : Effet antibactérien sur la souche 4 <i>Escherichia coli</i> (R 1 et R2) | 28 |
| Photographie 17 : Effet antibactérien sur la souche 5 <i>Salmonella sp</i> (R1 et R2)..... | 28 |
| Photographie 18 : Effet antibactérien sur la souche 6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (R1 et R2). 28 | |
| Photographie 19 : Observation microscopique pour la concentration de 25 PPM..... | 33 |
| Photographie 20 : Observation microscopique pour la concentration de 50 PPM..... | 34 |
| Photographie 21 : Observation microscopique pour la concentration de 100 PPM..... | 35 |
| Photographie 22 : Observation microscopique pour le témoin positif..... | 36 |
| Photographie 23 : Observation microscopique pour le témoin positif..... | 37 |

Liste des tableaux

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Tests de dépistage classiques (qualitatifs)..... | 8 |
| Tableau 2. Préparation des solutions | 11 |
| Tableau 3 : Les souches bactériennes test utilisées avec leurs informations ATCC..... | 14 |
| Tableau 4 : Résultats des Tests de dépistage classique (qualitatifs) | 19 |
| Tableau 5: Résultats du nombre de pousses sous l'effet de plusieurs concentrations par jours | 22 |
| Tableau 6 : Moyennes et résultats de l'analyse de variance du taux de germination mesurés sous l'effet des différents traitements..... | 23 |
| Tableau 7 : Résultats de l'activité antibactérienne sur les 06 souches test sélectionnées.. | 26 |
| Tableau 8 : Moyennes des diamètres à concentration Pure (calculées à partir de R1 et R2) | 30 |
| Tableau 9 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour une concentration de 25 PPM... | 33 |
| Tableau 10 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour une concentration de 50 PPM. | 34 |
| Tableau 11: Nombre de cellules vivantes et mortes dans une concentration de 100 PPM | 35 |
| Tableau 12 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour le témoin positif..... | 36 |
| Tableau 13 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour le témoin négatif..... | 37 |
| Tableau 14 : Moyennes et résultats de l'analyse de variance du taux de cellules vivantes mesurés sous l'effet des différents traitements..... | 388 |

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ABS : Antibiotiques.

ATTC : American Type Culture Collection

°C: Degré Celsius.

Ext : Extrait

G- : Gram négative.

g : Gramme

G+ : Gram positive

H : Heure.

HES : Huiles essentielles.

ml : Millilitre.

mm : Micromètre.

PDB : Bouillon de dextrose de pomme de terre

PPM : 1 mg/L = 1 partie par million (ppm) pour les solutions aqueuses diluées

Introduction

Introduction

Introduction

L'Algérie possède une flore extrêmement riche et variée représentée par des plantes aromatiques et médicinales dont la plupart existe à l'état spontané. La valorisation de ces plantes demeure un domaine de grande importance pour le pays (**Amroune, 2018**).

Les plantes médicinales occupent une place prépondérante dans les pratiques de soins traditionnels à travers le monde. Elles sont définies par l'Organisation internationale des marqueurs de plantes médicinales comme des végétaux contenant des substances susceptibles d'être utilisées comme médicaments ou dans la fabrication de ceux-ci (**Heinrich et al., 2022**). Ces plantes renferment des principes actifs, ou composés bioactifs, responsables de leurs effets pharmacologiques (**Krakowska-Sieprawska et al., 2022**). On estime à plus de 35 000 le nombre d'espèces végétales commercialement utilisées à des fins médicinales sur les 250 000 connues à travers le globe (**Aldogman et al., 2022**). Ce patrimoine naturel suscite aujourd'hui un intérêt croissant dans les recherches visant à découvrir de nouvelles molécules actives à fort potentiel thérapeutique.

Parmi les dérivés des plantes, les huiles essentielles (HE) représentent une catégorie particulièrement prisée pour leur richesse chimique et leurs activités biologiques multiples. Les huiles essentielles sont des mélanges volatils, hydrophobes, naturels et complexes, caractérisés par une forte odeur et extraits principalement par hydrodistillation des parties aromatiques des plantes (**Sharifi-Rad et al., 2017**).

Elles sont issues du métabolisme secondaire de la plante et se forment normalement dans des cellules ou groupes de cellules spécifiques, ou dans les poils glandulaires présents sur de nombreuses feuilles et tiges. Les huiles essentielles sont des mélanges variables composés principalement de terpénoïdes, dont des monoterpènes et des sesquiterpènes (des diterpènes peuvent également être présents), et de leurs dérivés oxygénés. Diverses autres molécules peuvent également être présentes, telles que des hydrocarbures aliphatiques, des acides, des alcools, des aldéhydes, des esters acycliques ou des lactones, et exceptionnellement des composés azotés et soufrés, des coumarines et des homologues phénylpropanoïdes. Connues pour leurs propriétés antiseptiques (bactéricides, virucides et fongicides), médicinales et leur parfum, elles sont utilisées en embaumement, pour la

Introduction

conservation des aliments et comme remèdes antimicrobiens, analgésiques, sédatifs, anti-inflammatoires, spasmolytiques et anesthésiques locaux (**Bakkali *et al.*, 2008**).

La propagation d'agents pathogènes résistants aux médicaments constitue aujourd'hui l'une des menaces les plus sérieuses pour le traitement efficace des maladies microbiennes. L'activité antimicrobienne de certaines plantes et épices est connue depuis l'Antiquité (**Nascimento *et al.*, 2000 ; Valgas *et al.*, 2007**). Elles produisent une vaste gamme de métabolites secondaires, et il est communément admis qu'une part importante de cette diversité chimique sert à protéger les plantes contre les agents pathogènes microbiens. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a constaté qu'une majorité de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour ses soins de santé primaires (**Prabuseenivasan *et al.*, 2006**).

Ces substances naturelles jouent un rôle clé dans la protection des plantes contre les agressions extérieures (agents pathogènes, insectes, stress environnementaux), mais aussi dans leur interaction avec d'autres organismes vivants. Leur pouvoir odorant leur permet d'attirer des pollinisateurs ou de repousser des prédateurs. Ainsi, les HE sont non seulement des composés à intérêt pharmacologique, mais aussi des outils adaptatifs au service de l'écologie végétale (**Cortadellas, 2010**).

Pour extraire ces huiles, plusieurs techniques sont utilisées, parmi lesquelles l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau, l'extraction par micro-ondes ou par CO₂ supercritique. La méthode de Clevenger, variante de l'hydrodistillation, est particulièrement appréciée en laboratoire. Elle consiste à condenser la vapeur d'eau chargée de composés aromatiques dans un dispositif en verre permettant une séparation précise de l'huile et de l'eau. Cette méthode préserve les constituants thermolabiles et offre un rendement optimal, ce qui la rend indispensable pour l'évaluation des qualités biochimiques des HE (**Septya Kusuma & Mahfud, 2016**).

Par rapport aux autres méthodes, l'hydrodistillation présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre, peu coûteuse, et n'exigeant aucun solvant chimique. Elle s'inscrit donc dans une démarche durable et respectueuse de l'environnement. Toutefois, des avancées technologiques telles que l'extraction par micro-ondes ou au CO₂ supercritique offrent des perspectives prometteuses en termes de rendement, de qualité des extraits, et de sélectivité des composés.

Introduction

Dans ce contexte, la plante *Mentha sp* communément appelée menthe suave, présente un intérêt scientifique particulier. Appartenant à la famille des Lamiacées, cette espèce est largement répandue dans les zones euro-méditerranéennes (**Kavak, 2014**). Elle est caractérisée par une morphologie herbacée vivace, aux tiges quadrangulaires, feuilles dentées et inflorescences roses (**Metin et al., 2021 ; Mishra et al., 2021**). Son huile essentielle est dominée par des composés comme le menthol, la menthone, le safranal et le β -cyclocitral (**Al-Mijalli et al., 2022**).

Les espèces du genre *Mentha* ont longtemps été utilisés en médecine traditionnelle pour traiter des affections variées : troubles digestifs, rhumes, infections, douleurs inflammatoires. Cette plante est réputée pour ses propriétés carminatives, antispasmodiques, antiseptiques et analgésiques (**Ouadeh et al., 2021 ; De, 2023**). Son usage s'est également développé dans le domaine de l'aromathérapie pour soulager le stress et améliorer le bien-être.

Dans l'industrie cosmétique, l'huile essentielle de *Mentha sp* est prisée pour ses effets rafraîchissants, apaisants et purifiants. Elle entre dans la formulation de produits pour peaux sensibles, sujets à l'acné ou à l'inflammation (**Ćavar et al., 2021 ; Nebie, 2023**). Son pouvoir antioxydant contribue à protéger la peau du vieillissement prématuré.

Sur le plan alimentaire, cette plante aromatique est utilisée pour parfumer salades, thés, desserts ou sauces. Elle est aussi un ingrédient de choix dans les cuisines méditerranéenne et orientale pour ses notes fraîches et mentholées (**Granitique & De, 2023**).

D'un point de vue pharmacologique, de nombreuses études mettent en évidence les propriétés biologiques de l'huile essentielle de *Mentha sp*. Elle présente une activité antibactérienne significative contre des souches telles que *Staphylococcus aureus* (**Fazal et al., 2023**), antifongique contre *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. (**Dossa et al., 2024**), antivirale contre les virus de l'herpès (**Ćavar et al., 2022**), antiparasitaire (**Štrbac et al., 2023**), et anti-inflammatoire (**El-Sayeda et al., 2014**).

Ces effets biologiques sont attribués à une composition riche en monoterpènes et ses quiterpènes comme le menthol, le limonène, le linalol et l'oxyde de pipériténone. Ces composés, en synergie, agissent à plusieurs niveaux sur les membranes cellulaires, les enzymes, ou encore les voies de signalisation des pathogènes.

Introduction

En définitive, *Mentha sp.* représente un genre d'intérêt majeur à la fois pour la recherche scientifique et pour l'industrie des produits naturels. Son huile essentielle, extraite efficacement par la méthode de Clevenger, offre une ressource précieuse pour le développement de formulations innovantes dans les domaines médical, cosmétique, agroalimentaire et phytosanitaire. Elle incarne le potentiel des plantes médicinales à répondre aux défis contemporains en matière de santé et de bien-être.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules d'origines végétales jouissantes d'activités biologiques notamment les activités antibactériennes. Dans le but d'étudier ces activités, une étude phytochimique est faite sur l'huile essentielle de *Mentha sp.* L'objectif est d'évaluer son efficacité contre diverses bactéries pathogènes et d'explorer son potentiel comme alternative naturelle aux antibiotiques.

Notre travail est réparti en deux parties :

La première partie bibliographique sur les plantes, les huiles essentielles et leur activités biologiques surtout antimicrobiennes.

La deuxième partie est la partie expérimentale divisé en deux axes. Dans le premier nous présenterons la technique utilisée pour l'extraction de l'huile essentielles de *Mentha sp.*, son screening phytochimique ainsi qu'un test de toxicité et finalement un test de viabilité.

Le deuxième axe consiste à déterminer l'effet : antibactérien, de l'huile essentielle de *Mentha sp.*

Enfin les résultats obtenus sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

La partie expérimentale de notre projet de fin d'études a été réalisée durant le mois d'Avril dans les laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Abbes Laghrour Khenchela.

L'étude a porté sur l'évaluation des propriétés biologiques de la plante *Mentha sp.*, une espèce largement répandue et reconnue pour ses usages traditionnels et thérapeutiques. Les différentes étapes expérimentales ont inclus la préparation d'extraits aqueux et d'huiles essentielles à partir du matériel végétal, suivie d'une série de tests biologiques. Nous avons notamment évalué l'effet phytotoxique sur la germination du radis (*Raphanus sativus*), la viabilité cellulaire sur *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que l'activité antibactérienne sur plusieurs souches pathogènes. Ces expérimentations visaient à mettre en évidence le potentiel bioactif de *Mentha sp.* et à explorer ses applications potentielles dans les domaines agrobiologique et pharmaceutique.

1. Matériel végétal

L'espèce *Mentha sp* appartient à la famille des *Lamiacées* et comprend des espèces de menthes très populaires. La famille des *Lamiacées* est reconnue par ses plantes aromatiques riches en huiles essentielles, souvent utilisées en phytothérapie, cosmétique, et comme condiments (menthe, thym, romarin, basilic...). (**Figure 01**)

Plus de 200 espèces de *Mentha* produisent des produits dérivés du menthol de grande valeur d'un point de vue mondial, la majorité étant cultivée aux États-Unis, au Japon et en Chine (**Aldogman et al., 2022**).

a

b



Figure 1. *Mentha sp* **a)** en forme fraîche **b)** après broyage

La position systématique de *Mentha* sp est la suivante :

- **Embranchement** : Spermaphytes
- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous Classe** : Gamopétales
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae Martinov
- **Genre** : *Mentha* L.
- **Espèce** : *Mentha* sp (Iserin *et al.*, 1997)

1.2. Présentation de site de récolte.

Le site de récolte est situé dans la région de Chechar qui est une commune algérienne située dans la wilaya de Khenchela, au nord-est du pays, dans la région montagneuse des Aurès. Elle constitue également le chef-lieu d'une daïra qui regroupe quatre communes : Chechar, Djellal, El Ouedja et Khirane. S'étendant sur une superficie de plus de 900 km², Chechar bénéficie d'un climat semi-aride marqué par des étés très chauds et secs et des hivers relativement doux. Les paysages de la région, composés de montagnes et de vallées, font d'elle un territoire riche en biodiversité et en potentialités agricoles, malgré les contraintes climatiques (Ministère de l'Intérieur et des Collectivités Locales, 2021).

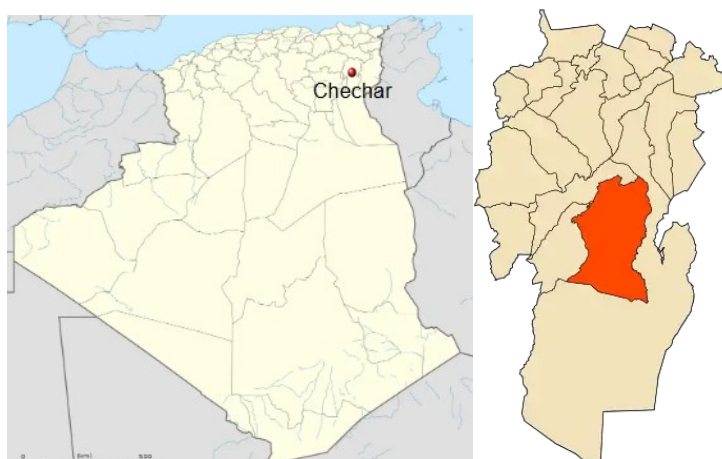


Figure 2. Site de récolte ce la commune de chechar à la wilaya de khenchela (Ministère de l'Intérieur et des Collectivités Locales, 2021).

1.3. Matériel végétal et préparation de l'extrait

Le matériel végétal utilisé est récolté au mois de Septembre 2024. Après la récolte, les parties végétales aériennes ont été soigneusement séchées à l'ombre afin de préserver leurs composés bioactifs. Le matériel sec a ensuite été finement broyé en poudre, puis conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation pour les analyses.

Cette poudre sera divisée en deux portions une sera utilisée pour la préparation de l'extrait brut alors que la deuxième sera utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle.

La préparation de l'extrait brut a été effectuée par macération des échantillons secs dans de l'eau distillée, selon un rapport de 1 :10 (p/v), pendant 24 heures. Les extraits aqueux obtenus après filtration des solutions de macération ont été concentrés à 40 °C dans une étuve afin d'éviter la dégradation des composés thermolabiles. Ces extraits bruts ont été utilisés pour les tests phytochimiques. (**Photographie 01**)



Photographie 1 : Préparation d'extrait aqueux

2. Dépistage phytochimique (screening) des métabolites secondaires

Le dépistage phytochimique constitue une étape préliminaire cruciale dans l'évaluation du potentiel bioactif d'un extrait végétal. Il vise à détecter la présence ou l'absence des principales familles de **métabolites secondaires**, des composés organiques synthétisés par les plantes pour assurer leur défense contre les pathogènes, les herbivores, et les stress environnementaux. Ces métabolites, bien que non indispensables à la croissance ou au développement primaires, participent activement à la survie, à l'adaptation écologique et aux interactions avec l'environnement. (**Fettah, 2019**).

Parmi les groupes de composés recherchés dans cette étude figurent :

- Les **alcaloïdes**, connus pour leurs activités pharmacologiques variées,
- Les **flavonoïdes**, aux propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires,

Matériel et méthodes

- Les **tanins**, aux effets astringents et antimicrobiens,
- Les **saponines**, dotées de propriétés tensioactives et antifongiques,
- Les **stérols** et **triterpènes**, impliqués dans la régulation membranaire et la défense,

2.1. Les tests de Dépistage phytochimique

Ces tests sont réalisés selon des protocoles standardisés basés sur des réactions colorées ou la formation de précipités caractéristiques, permettant d'identifier la présence potentielle des différents groupes de métabolites secondaires (Raaman, 2006 ; Audu *et al.*, 2007 ; Singh et Kumar, 2017).

Tableau 1 : Tests de dépistage classiques (qualitatifs)

| Classe de composés | Test | Méthode et résultat attendu |
|--------------------|---------------------------|---|
| Les alcaloïdes | Test de Wagner | Dans ce test, environ 2 à 3 ml de l'extrait sont mélangés à 1 ml de HCl dilué, puis à quelques gouttes de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité brun rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes. |
| Les alcaloïdes | Test de Dragendorff | Le réactif de Dragendorff comporte deux solutions. En ajoutant 1 ml de réactif à 2 ml d'extrait, un précipité rouge-brun ou rouge-orange se forme, indiquant la présence d'alcaloïdes. |
| Les flavonoïdes | Test réactif alcalin | Deux à trois gouttes d'hydroxyde de sodium ont été ajoutées à 2 ml d'extrait. Une couleur jaune foncé est apparue puis devenue incolore avec ajout d'acide diacétique, ce qui indique la présence de flavonoïdes. |
| Tanin | Test au chlorure ferrique | 2 ml de solution de chlorure ferrique neutre à 5 % ont été ajoutés à 1 ml d'extrait. Une coloration bleu foncé indique la présence de composés phénoliques et de tanins. |
| Les saponines | Test pour les saponines | Une goutte de solution de Na ₂ CO ₃ à 5 ml d'extrait. Après agitation et repos de cinq minutes, la formation de mousse indique la présence de saponines. |
| Les triterpénoïdes | Test d'horizon | 2 ml d'acide trichloroacétique (1,63g C ₂ HCl ₃ O ₂ + 10 ml eau distillée) + 1 ml d'extrait. Précipité rouge = présence de triterpénoïdes. |
| Les phytostérols | Test Salkowski | Extrait agité avec du chloroforme et H ₂ SO ₄ . Une couleur rouge indique la présence de stéroïdes. |
| L'amidon | Test à l'iode | 2 ml de solution iodée + 2 ml d'extrait. Apparition de couleur bleue = présence d'amidon. |
| Les glycosides | Test de Keller Killiani | Solution acétique glacial + chlorure ferrique + H ₂ SO ₄ . Apparition d'un anneau brun/rouge à la jonction indique présence de glycosides cardiaques. |
| Les protéines | Test de Biuret | Deux gouttes de sulfate de cuivre à 3 % et quelques gouttes d'hydroxyde de sodium à 10 % ont été ajoutées à 1 ml |

Matériel et méthodes

| | | |
|----------------------------|----------------------|--|
| | | d'extrait. Une couleur violette ou rouge indique la présence de protéines. |
| Les protéines | Test à la ninhydrine | Deux gouttes de solution de ninhydrine à 0,2 % ajoutées à 1 ml d'extrait. Couleur pourpre = protéines. |
| Hydrates de carbone | Le test de Benedict | 5 ml de réactifs de Benedict + 8 à 10 gouttes d'extrait, chauffés 5 min. Précipité rouge foncé = présence d'hydrates de carbone. |
| Hydrates de carbone | Test de Fehling | Solution de Fehling (A et B) + 2 ml d'extrait, chauffé 5 min. Précipité rouge foncé = présence d'hydrates de carbone. |

Chaque test repose sur des réactifs spécifiques à une classe de composés. Les résultats sont notés de manière qualitative (présence marquée, faible, ou absence), et servent d'indication pour des analyses ultérieures plus approfondies (Chromatographie, spectroscopie, etc....).



Photographie 2 : Les solutions utilisées dans le dépistage phytochimique

3. Extraction de l'huile essentielle de *Mentha sp*

La deuxième portion de la poudre de la matière végétale est utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle. Une quantité précise de 300 g de poudre a été pesée et introduite dans un ballon à fond rond d'une capacité adaptée.

Ensuite, 3 litres d'eau distillée ont été ajoutés dans le ballon contenant le broyat végétal. L'ensemble a été porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon. L'ébullition de l'eau permet la libération de vapeurs contenant les composés volatils de la plante par un procédé appelé **hydrodistillation**.

Ces vapeurs passent ensuite à travers un réfrigérant à serpentin, où elles subissent un processus de condensation. Le condensat, constitué d'un mélange d'eau et d'huile

Matériel et méthodes

essentielle, est ensuite récupéré dans un décanteur. L'huile essentielle, généralement moins dense que l'eau, est alors séparée mécaniquement.

L'huile obtenue est soigneusement collectée à l'aide d'une pipette Pasteur puis conservée dans des flacons en verre ambré, hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière et de la chaleur, afin de préserver ses propriétés physico-chimiques et sa stabilité.

4. Test de phytotoxicité

Le test de phytotoxicité a pour objectif d'évaluer les effets d'un extrait végétal ou d'un composé donné sur la germination et la croissance de graines, permettant ainsi d'identifier un éventuel impact toxique sur les végétaux.

Les effets phytotoxiques de l'huile essentielle de *Mentha sp* ont été évalués sur une plante modèle sélectionnée, *Raphanus sativus* (radis), à l'aide de bioessais en laboratoire. Cette plante modèle est largement utilisée pour vérifier les effets de composés chimiques sur la germination et le développement initial, car elle est très sensible aux substances toxiques, a une germination rapide et peu coûteuse (Alves *et al.*, 2018 ; Vasconcelos *et al.*, 2019). Les solutions d'huiles essentielles de *Mentha sp* ont été préparées par un mélange intensif et une agitation avec un solvant composé d'eau distillée, d'acétone (2 % v/v) et de Tween 80® (0,05 % v/v). Trois concentrations d'huile ont été testées : 100,50 et 25 µg/mL.

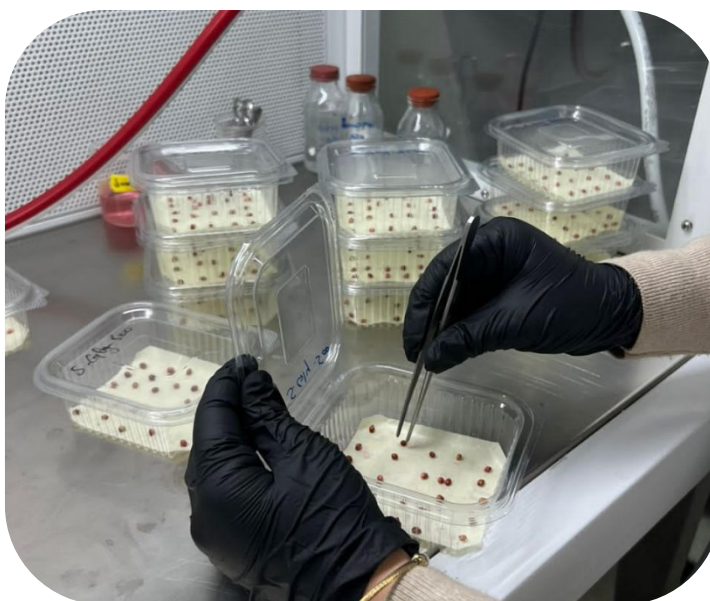
L'eau a été utilisée comme témoin négatif dans l'analyse, en omettant le solvant. Des boîtes en plastique ont été tapissées de papier filtre et traitées avec 2 mL des solutions d'huiles essentielles ainsi que le témoin négatif. Pour chaque traitement, 25 graines de plante modèle ont été utilisées, avec trois répétitions chacune. Les boîtes ont été enveloppées de film plastique et incubées dans un environnement contrôlé, à une température moyenne de 25 ± 2 °C, soit à l'obscurité, soit à la lumière selon les exigences de l'espèce végétale. L'incubation dure en moyenne entre 3 à 7 jours. Le tableau 3 montre la préparation de chaque concentration

Matériel et méthodes

Tableau 2. Préparation des solutions

| Solution | Concentration | Solutions à préparer |
|----------|---------------|---|
| Témoin | 0% | Eau distillée |
| PPM25 | 0.0025% | 5 µl huile + 1 ml Acétone + 100 µl Tween80 + 200 ml Eau distillée |
| PPM50 | 0.005% | 5 µl huile + 1 ml Acétone + 100 µl Tween80 + 200 ml Eau distillée |
| PPM100 | 0.01% | 10 µl huile + 1 ml Acétone + 100 µl Tween80 + 99 ml Eau distillée |

À l'issue de cette période, plusieurs paramètres sont évalués : le taux de germination (pourcentage de graines ayant germé), la longueur des pousses, le poids frais et sec des feuilles et des racines et l'observation de tout symptôme visuel comme des anomalies de croissance, des nécroses ou un flétrissement.



Photographie 3 : Le dépôt des graines de radis (*Raphanus sativus*) dans les boîtes

4.1. Étapes post-germination (analyse cytologique et traitement des racines)

Les racines issues de ces plantules germées sont ensuite sectionnées pour être soumises à une série d'analyses cytologiques selon le protocole de de préparation cytogénétique de **Jahier *et al.*, 1992** Ce protocole permet une évaluation fine des effets cytotoxiques ou génotoxiques potentiels de substances testées sur les racines des plantules.

Des prélèvements des apex racinaires d'environ 1 à 1,5 cm de longueur sont effectués (la zone de division cellulaire la plus active), préférentiellement le matin à partir de 8h 00 moment favorable à l'observation d'un grand nombre de mitoses. Les pointes racinaires ont

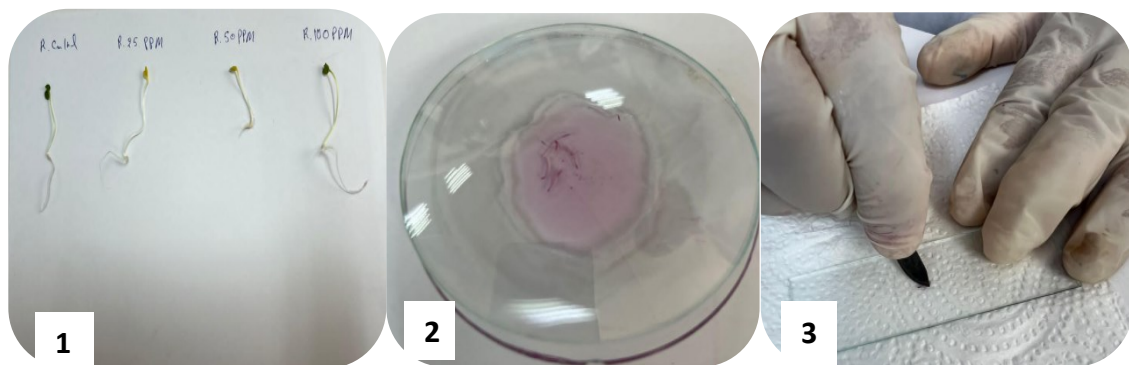
Matériel et méthodes

été fixées dans la solution Carnoy II (**Jahier et al., 1992**), composée de l'Ethanol - Chlorophorme- Acide acétique (6v : 3v : 1v) pendant au moins 24h à 4°C. Cette étape permet de bloquer toute vie cellulaire et de conserver l'intégrité structurale des chromosomes (**Jahier et al., 1992**).

Les racines fixées peuvent être conservées plusieurs mois dans une solution d'Ethanol 70% à 4°C. En vue d'une meilleure analyse chromosomique et d'un étalement optimal, les extrémités racinaires ont été soumises à une hydrolyse dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl ; 1N). Ensuite, elles ont été chauffées à la flamme d'une bougie jusqu'à l'apparition des premières vapeurs. L'hydrolyse assure le ramollissement des tissus et un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelles. L'acide chlorhydrique (HCl) libère aussi, les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose (**Jahier et al., 1992**).

Afin de visualiser aisément les plaques métaphasiques, les apex racinaires hydrolysés sont immergés dans une solution de coloration à base d'orceïne-lacto-propionique (annexe) pendant une durée de 24 heures à température ambiante (**Dyer, 1963**).

Sur une lame, on dépose une goutte de solution d'orceïne lactopropionique ainsi que l'extrémité racinaire, la lame est ensuite recouverte délicatement d'une lamelle et écraser avec le pouce. Cette opération permet de disperser les cellules du tissu végétal sur la lame, facilitant ainsi leur observation individuelle sous microscope.



Photographie 4 : Traitement des racines et analyse cytotologique.

1. Mesure de la longueur et le poids des plantules
2. Coloration des racines avec rouge carmin
3. Préparation des racines sur les lames

Les cellules en division sont initialement repérées au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement (X10), puis observées en détail avec un objectif de grossissement plus élevé (X 40) pour une meilleure visualisation des structures cellulaires.

5. Test de l'activité antibactérienne

5.1. Évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne in vitro d'un extrait ou d'un composé pur. Les méthodes les plus connues sont les méthodes de diffusion sur disque et de dilution en bouillon ou sur gélose. Ces méthodes sont basées sur la même méthode que l'antibiogramme, utilisé pour évaluer l'activité des antibiotiques.

5.2. Méthode des disques imprégnés

C'est la technique choisit pour évaluer l'activité antibactérienne de notre huile essentielle. Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle en observant son effet inhibiteur sur la croissance de bactéries cultivées sur un milieu solide. Des disques de papier filtre imprégnés d'huile essentielle sont déposés sur une gélose ensemencée, et les zones d'inhibition formées autour de ces disques indiquent une action antimicrobienne (**Guinoiseau, 2010**).

5.3. Préparation des disques

Dans le cadre de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre ont été préparés. Ces disques, stérilisés ont été imprégnés avec un volume de 10 à 20 μL d'huile essentielle, utilisée pure ou diluée dans du méthanol, selon les concentrations testées. Quatre dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) ont été appliquées afin d'observer un éventuel effet dose-dépendant de l'huile essentielle sur les souches bactériennes.

Les contrôles expérimentaux jouent un rôle fondamental dans la validation des résultats. Un **contrôle positif** a été mis en place à l'aide de disques imprégnés d'antibiotiques de référence, à savoir la gentamycine (**10 μg**) afin de vérifier la sensibilité des souches bactériennes testées et de servir de point de comparaison pour évaluer l'efficacité de l'huile essentielle. En parallèle, un **contrôle négatif** a été réalisé à l'aide de disques imprégnés uniquement de méthanol utilisé comme solvant de dilution. Ce contrôle permet de s'assurer que le solvant n'induit aucun effet antimicrobien et que les zones d'inhibition observées sont exclusivement dues à l'action des composés actifs présents dans l'huile essentielle.

Matériel et méthodes

5.4. Choix et origine des souches bactériennes test

L'étude a été réalisée sur des bactéries test ATCC (American Type Culture Collection) pathogènes couramment impliquées dans des infections humaines.

Les souches ATCC sont des souches microbiennes de référence utilisées dans la recherche scientifique, l'enseignement, l'industrie pharmaceutique, alimentaire, environnementale, etc. Les souches utilisées ainsi que leurs caractéristiques figurent sur le tableau 3.

Tableau 3 : Les souches bactériennes test utilisées avec leurs informations ATCC

| N° | Nom de la souche | Type | Numéro ATCC | Caractéristiques clés | Applications / Intérêts |
|----|--|-----------------------------------|-------------|---|---|
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | Bactérie Gram + (cocci) | ATCC 25923 | Pathogène opportuniste, résistante à certains antibiotiques | Test d'antibiotiques, infections cutanées, recherche clinique |
| 2 | <i>Bacillus subtilis</i> (représentant <i>Bacillus</i> sp) | Bactérie Gram + (bacille sporulé) | ATCC 6633 | Forme des spores, produit des enzymes extracellulaires | Contrôle qualité, production d'enzymes, biopesticides |
| 3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bactérie Gram - (bacille) | ATCC 27853 | Résistante, biofilm, infections nosocomiales fréquentes | Recherche sur la résistance, bioremédiation |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> | Bactérie Gram - (bacille) | ATCC 25922 | Modèle biologique, facile à cultiver | Génétique, bioingénierie, antibiogramme |
| 5 | <i>Salmonella enterica</i> (<i>Salmonella</i> sp) | Bactérie Gram - (bacille) | ATCC 14028 | Responsable de gastro-entérites, pathogène alimentaire | Recherche en sécurité alimentaire, toxicologie |
| 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Bactérie Gram - (bacille) | ATCC 13883 | Pathogène respiratoire et urinaire, production de capsules | Études sur la virulence, tests de sensibilité |

5.5. La préparation des suspensions bactériennes

Cette opération s'est déroulée en plusieurs étapes rigoureuses. Les différentes souches bactériennes ont d'abord été cultivées sur gélose nutritive, incubées à 37 °C pendant une période de 18 à 24 heures, afin d'assurer une croissance optimale. Après cette incubation, une suspension de chaque souche a été préparée en milieu liquide, en utilisant une solution stérile de chlorure de sodium (NaCl 0,9 %). La turbidité de chaque suspension

Matériel et méthodes

a ensuite été ajustée de manière à correspondre au standard de McFarland 0,5, ce qui équivaut approximativement à une concentration bactérienne de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Cette standardisation a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625 nm, garantissant une homogénéité entre les échantillons. Enfin, pour les besoins d'ensemencement lors des tests microbiologiques, chaque suspension a été diluée au 1/100 afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL, assurant ainsi une densité cellulaire adaptée à une évaluation reproductible de l'activité antibactérienne.

5.6. Ensemencement et dépôt des disques

Le milieu de culture utilisé pour réaliser le test de sensibilité est la gélose Mueller-Hinton (MH), reconnue comme référence standard par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. (Humphries *et al.*, 2018).

Environ 20 mL de ce milieu, préalablement stérilisé, ont été soigneusement versés dans des boîtes de Pétri stériles, puis laissés à température ambiante jusqu'à solidification complète. Une fois le milieu solidifié, la surface de chaque boîte a étéensemencée de manière homogène par étalement, à l'aide d'un écouvillon stérile préalablement imprégné de la suspension bactérienne standardisée.



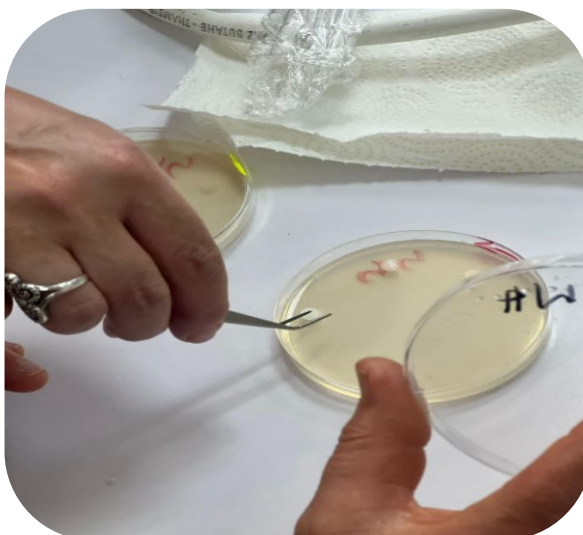
Photographie 5: Préparation et ensemencement du milieu de culture Mueller Hinton.

Cette méthode d'ensemencement garantit une répartition uniforme des bactéries sur la surface du milieu, condition essentielle pour obtenir des résultats fiables et reproductibles lors de l'évaluation de la sensibilité aux agents antimicrobiens.

Les disques imprégnés ont ensuite été délicatement déposés à l'aide de pinces stériles sur la surface des boîtes de gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencées. Une

Matériel et méthodes

distance minimale de 2 cm entre les disques a été respectée afin d'éviter le chevauchement des halos d'inhibition. Après leur disposition, les boîtes ont été laissées à température ambiante pendant 30 minutes pour permettre une phase de pré-diffusion de l'huile essentielle dans le milieu, avant d'être incubées. Cette étape garantit une meilleure absorption des composés actifs dans la gélose, optimisant ainsi la fiabilité des résultats obtenus.



Photographie 6 . Dépôt des disques de l'huile pure, de ses dilutions et des témoins.

5.7. Mesure des zones d'inhibition et analyse des résultats

Après l'incubation des boîtes de Pétri, l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition, c'est-à-dire la zone circulaire sans croissance bactérienne autour de chaque disque. Ces mesures ont été réalisées en millimètres à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle millimétrée pour une meilleure précision. (Choi *et al.*, 2006).

Chaque essai a été réalisé au minimum en duplicata afin de garantir la fiabilité et la reproductibilité des données expérimentales.

Enfin, l'activité de l'huile essentielle a été comparée à celle d'antibiotiques standards utilisés comme références positives, l'antibiotique utilisé est la gentamycine antibiotique à large spectre. Cette comparaison s'est basée sur la taille respective des halos d'inhibition, permettant ainsi d'apprécier le pouvoir antimicrobien relatif de l'huile essentielle par rapport aux traitements conventionnels. Après la culture, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance et donc la zone d'inhibition du principe actif.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Ponce *et al.*, 2003)

- ♣ Souche résistante ($D < 8$ mm)
- ♣ Souche sensible ($9 \text{ mm} \leq D \leq 14$ mm)
- ♣ Souche très sensible ($15 \text{ mm} \leq D \leq 19$ mm)
- ♣ Extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

6. Test antiprolifératif

L'évaluation de l'activité antiproliférative a été réalisée à l'aide d'un modèle de levure, selon la méthode de Saboo et al. (2007). Ce protocole vise à évaluer l'effet de notre huile essentielle sur la viabilité de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'analyse est réalisée par une méthode simple de coloration au bleu de méthylène et comptage sur cellule de Malassez.

Ce protocole permet de déterminer rapidement si l'huile essentielle de *Mentha sp.* a un effet antifongique sur *S. cerevisiae*, et à quelle concentration son efficacité est optimale.

La manipulation est réalisée en triplicata pour garantir la fiabilité des résultats.

6.1. Préparation de l'inoculum (milieu de base)

5 g de levure commerciale ont été ajoutés à 100 mL de bouillon nutritif stérilisé, incubé 24 h à 37 °C. 1 mL de cette culture a été dilué à 10 mL avec de l'eau distillée stérile pour obtenir $\sim 25,4 \times 10^4$ cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

6.2. Préparation du bouillon de dextrose de pomme de terre (PDB)

Pour la préparation du milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth), 200 g de pommes de terre coupées en fines tranches ont été bouillies dans 1 L d'eau distillée pendant une heure. Le mélange obtenu a été ensuite filtré à chaud afin d'éliminer les résidus solides, puis le volume a été ajusté à 1 L avec de l'eau distillée. Ensuite, 20 g de glucose ont été ajoutés au filtrat. Le bouillon ainsi obtenu a été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 15 à 20 minutes, puis conservé à température ambiante jusqu'à utilisation. (Saboo *et al.*, 2007).

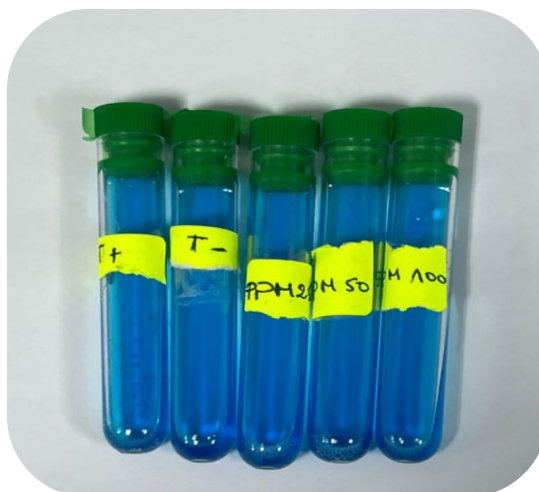
6.3. Évaluation de la viabilité cellulaire

Pour évaluer l'effet antifongique des extraits, des tubes à essai ont été préparés avec un mélange de 2,5 mL de bouillon PDB, 1 mL d'extrait végétal à la concentration désirée, et 0,5 mL d'inoculum de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) dans chaque tube.

Un tube témoin a été préparé contenant uniquement du PDB et de la levure sans extrait végétal (témoin négatif), tandis qu'un autre contenait de la quercétine comme

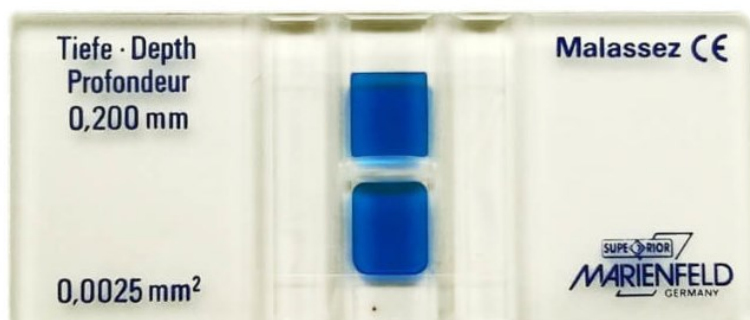
Matériel et méthodes

antifongique de référence (témoin positif). Après incubation pendant 24 heures à 37 °C, 100 µL de bleu de méthylène à 0,1 % ont été ajoutés à chaque tube. (**Photographie 07**)



Photographie 7 : Préparation des suspensions de *Saccharomyces cerevisiae* et bleu de méthylène

Une goutte de chaque suspension a ensuite été déposée sur une cellule de Malassez pour comptage microscopique (objectif ×10). (**Photographie 08**)



Photographie 8 : La préparation de l'échantillon sur la cellule de Malassez

La viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Viabilité' (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules (vivantes + mortes)}} \times 100$$

Cette formule permet d'évaluer l'impact des extraits végétaux testés sur la survie de *Saccharomyces cerevisiae*, en fournissant une mesure quantitative de l'effet cytotoxique. Une viabilité élevée indique un effet faible ou nul, tandis qu'une diminution significative reflète une action antifongique potentielle de l'extrait.

Résultats et discussion

Résultats et discussion








1. Résultats du Screening phytochimique

L'analyse phytochimique de l'extrait aqueux de *Mentha sp.* a révélé une richesse en métabolites secondaires bioactifs, les résultats obtenus figurent sur le Tableau 04.

Tableau 4 : Résultats des Tests de dépistage classique (qualitatifs)

| Classe de composés | Test | Résultats obtenus | |
|--------------------|---------------------------|-------------------|---|
| Les alcaloïde | Test de Wagner | ++ |  |
| Les alcaloïde | Test de Dragendorff | +++ |  |
| Les flavonoïdes | Test réactif alcalin | - |  |
| Les tanins | Test au chlorure ferrique | +++ |  |
| Les saponines | Test de la mousse | +++ |  |
| Les Triterpénoïdes | Test d'horizon | +++ |  |

Résultats et discussion

| | | | |
|----------------------------|-------------------------|-----|---|
| Les stéroïdes | Test Salkowski | - |  |
| L'amidon | Test à l'iode | - |  |
| Les glycosides | Test de Keller Killiani | +++ |  |
| Les protéines | Test de Biuret | - |  |
| Les protéines | Test à la ninhydrine | - |  |
| Hydrates de carbone | Test de Benedict | - |  |
| Hydrates de carbone | Test de Fehling | + |  |

(+++): indique relativement une forte présence. (++) : indique relativement une présence moyenne.
 (+) : indique relativement une faible présence. (-) : indique relativement une absence

Résultats et discussion

Les tests de Wagner et de Dragendorff ont confirmé la présence importante d'alcaloïdes (++ et +++ respectivement), connus pour leurs propriétés pharmacologiques variées. Les tanins ont été détectés en abondance (+++) via le test au chlorure ferrique, de même que les saponines (+++) par le test de formation de mousse, indiquant un potentiel antioxydant et antimicrobien.

Les triterpénoïdes ont montré une réaction fortement positive (+++) au test d'Horizon, tout comme les glycosides (+++) au test de Keller-Killiani, suggérant un effet cardiotonique potentiel. En revanche, les flavonoïdes, les stéroïdes, l'amidon ainsi que les protéines (tests de Biuret et de la ninhydrine) étaient absents (-), ce qui peut influencer certaines activités biologiques attendues. Les hydrates de carbone ont donné des résultats contrastés : négatifs avec le test de Benedict, mais légèrement positifs (+) avec le test de Fehling. Ces données confirment que *Mentha sp.* contient une variété de composés bioactifs pouvant être valorisés dans des applications thérapeutiques ou agronomiques.

Le Screening phytochimique de *Mentha sp* a révélé la présence notable d'alcaloïdes, de tanins condensés, de saponines, de triterpénoïdes et de glycosides, tandis que les flavonoïdes, les protéines et l'amidon étaient absents. Ces résultats corroborent les données de la littérature scientifique. Par exemple, **Tafrihi et al. (2021)** ont identifié des alcaloïdes et des saponines dans des extraits de la même plante que la nôtre, soulignant leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

De même, une étude de **Božović et al. (2015)** indiquent que les triterpénoïdes présents dans cette espèce possèdent des activités anti-inflammatoires significatives. Concernant les glycosides, leur présence est associée à des effets cardiotoniques, comme le suggèrent plusieurs études pharmacologiques. L'absence de flavonoïdes dans l'extrait aqueux pourrait être attribuée à la nature du solvant utilisé, car ces composés sont souvent mieux extraits avec des solvants organiques. En somme, les composés identifiés dans *Mentha sp* confirment son potentiel pharmacologique, justifiant des investigations approfondies pour isoler et caractériser ces métabolites bioactifs.

2. Résultats des Effets phytotoxiques

Le potentiel phytotoxique de L'huile essentielle de *Mentha sp* a été testé en évaluant l'inhibition de la germination des graines de radis. Le Tableau 05 montre les résultats du taux de germination pendant 7 jours.

Résultats et discussion

Tableau 5: Résultats du nombre de pousses sous l'effet de plusieurs concentrations par jours

| Concentrations | Jour 1 | Jour 2 | Jour 3 | Jour 4 | Jour 5 | Jour 6 | Jour 7 |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 25 PPM | 0 | 8 | 11 | 15 | 16 | 19 | 22 |
| 25 PPM | 0 | 6 | 10 | 13 | 15 | 16 | 18 |
| 25 PPM | 0 | 7 | 10 | 14 | 16 | 16 | 16 |
| 50 PPM | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 50 PPM | 0 | 3 | 3 | 5 | 7 | 7 | 7 |
| 50 PPM | 0 | 2 | 4 | 11 | 12 | 12 | 12 |
| 100 PPM | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 |
| 100 PPM | 0 | 0 | 1 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 100 PPM | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Témoin | 22 | 23 | 24 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Témoin | 11 | 18 | 20 | 22 | 25 | 25 | 25 |
| Témoin | 11 | 20 | 22 | 25 | 25 | 25 | 25 |

Les analyses phytotoxiques sur la plante modèle ont montré que les concentrations les plus élevées 50 et 100 ppm avaient les effets les plus significatifs sur la germination. Ces concentrations ont significativement réduit le pourcentage de germination du radis par rapport à l'eau. Les témoins, non exposés à l'extrait, affichent un taux de germination élevé et rapide : dès le troisième jour, la majorité des grains ont germé (valeurs de 24 à 25 grains), traduisant des conditions de germination optimales.

En revanche, les lots traités avec l'extrait de menthe montrent une inhibition progressive de la germination, proportionnelle à la concentration. À 25 ppm, la germination est retardée mais reste significative, atteignant entre 16 et 22 grains germés au jour 7.

Les valeurs moyennes du taux de germination et leur signification statistiques sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Résultats et discussion

Tableau 6 : Moyennes et résultats de l'analyse de variance du taux de germination mesurés sous l'effet des différents traitements.

| Concentration | PFG (%) |
|---------------|------------|
| Témoin | 100 |
| 25 | 62,6666667 |
| 50 | 30,6666667 |
| 100 | 13,3333333 |
| P-value | 0 |
| CV% | 68,25 |
| Signification | S*** |

PFG (%) : Pourcentage final de germination, CV% : Coefficient de n variation, *Valeur significative à $P < 0,05$, **Valeur hautement significative à $P < 0,01$. *** Valeur très hautement significative à $P < 0,000$.

Ce paramètre constitue la méthode la plus efficace pour évaluer la capacité de germination et très utiles pour comprendre l'effet des extraits de *Mentha sp* sur la germination des graines de radis D'après les résultats du tableau 07, Le témoin (sans extrait) présente un taux de germination maximal de 100 %, servant de référence. À mesure que la concentration de l'extrait augmente, on observe une diminution progressive et marquée du taux de germination : 62,7 % à 25 %, 30,7 % à 50 % et seulement 13,3 % à 100 %.

L'analyse de la variance du taux de germination indique un effet très hautement significatif de la concentration des extraits ($P = 0$) indique une différence hautement significative entre les traitements (concentrations), confirmée par la notation statistique S* (significatif au seuil de 0,001). Le coefficient de variation ($CV\% = 68,25$) reflète une variabilité importante entre les valeurs, probablement due à l'effet biologique marqué des extraits. Comme conclusion, les extraits de la plante exercent un effet phytotoxique croissant avec l'augmentation de la concentration, réduisant significativement la germination de la plante modèle.

Globalement, ces effets peuvent être associés à la présence de composés allélopathiques comme les monoterpènes ou les phénols, connus pour inhiber les processus physiologiques de germination. Selon Harborne et Tomas-Barberan (1990), ces substances, au contact du sol, inhibent le développement d'autres plantes, en provoquant la décomposition, la volatilisation, le lessivage et l'exsudation des composés présents dans les tissus végétaux. Vokou et al. (2003) suggèrent que l'effet herbicide des huiles essentielles est dû aux réactions combinées de divers composés chimiques, qui peuvent agir de manière additive, synergique ou antagoniste. (Vokou *et al.*, 2003)

Résultats et discussion

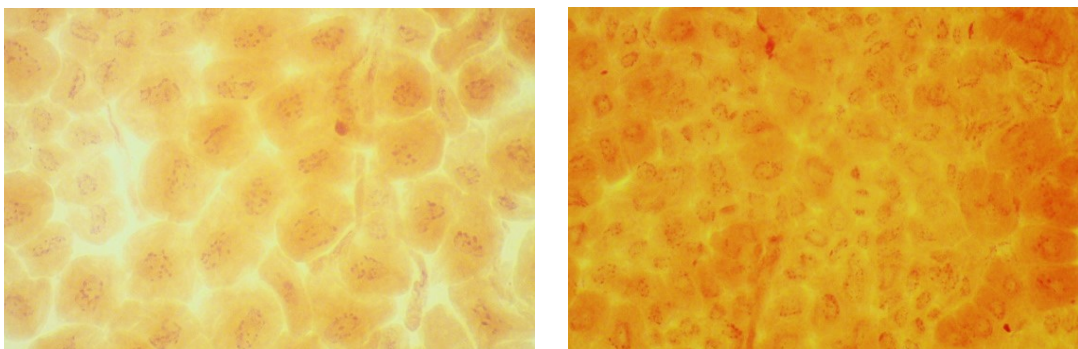
Selon une analyse chimique de terrain, les chémotypes de *M. sp* peuvent présenter jusqu'à 81 % d'oxyde de pipériténone et 10 % de pipéritone dans l'huile essentielle, ou, pour certaines sous-espèces, 39 % de menthone et 34 % de pulégone (Sarheed et al.,2020)

En ce sens, l'activité herbicide observée dans l'huile essentielle de *Mentha sp.* peut être principalement attribuée à la présence de sesquiterpènes et de monoterpènes. Compte tenu de l'importance des huiles essentielles en raison de leur large applicabilité, il est essentiel de connaître les composés chimiques qu'elles contiennent, car ce sont eux qui sont responsables des propriétés phyto thérapeutiques et biologiques.

2.1. Activité anti-mitotique

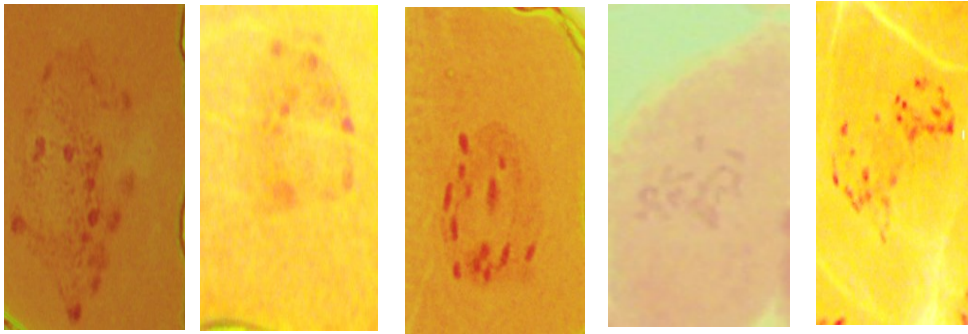
L'indice mitotique est considéré comme un paramètre permettant d'estimer la fréquence de la division cellulaire en mesurant la proportion de cellules en phase mitotique du cycle cellulaire (Marcano et al., 2006).

Dans la présente étude, nous avons étudié l'effet de l'extrait de *Mentha sp* sur l'activité mitotique du radie. L'examen des photographies des cellules observées sous microscope a révélé certains points importants pour les racine traitées avec 25 ppm de l'extrait de la plante la plupart des cellules sont entrées en division et toutes les phases de la mitose sont présentes (prophase, métaphase, anaphase, télophase), avec des fréquences variées (Photographie 9 a et b). D'autre part, certaines aberrations sont remarquées comme un changement de l'aspect des chromosomes chez certaines cellules et également une réduction de leurs tailles par rapport à d'autres (Photographie 10 c, d, e, f). et présence de cellules fusionnées (Photographie 10 g).



Photographie 9: Photographies des cellules observées sous microscope X10 traitées avec 25 ppm

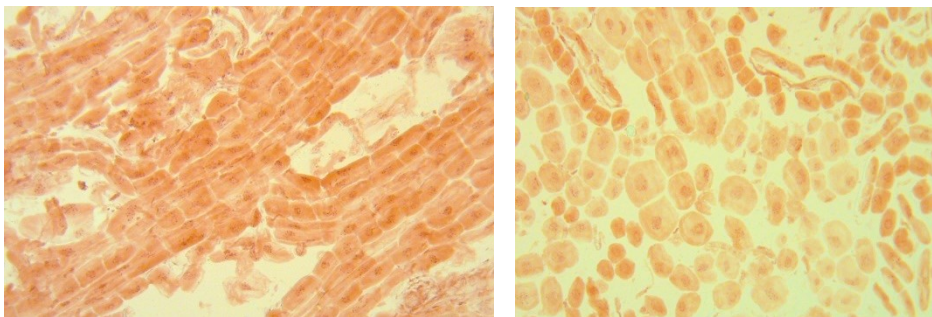
Résultats et discussion



Photographie 10: Photographies des cellules observées sous microscope X40 traitées avec 25 ppm

Concernant les racines traitées avec 100 ppm de l'extrait de la plante la plupart des cellules sont entrées en division, mais la plupart ont présenté l'aspect de prophase (**Photographie 11 a et b**). Sous l'effet de l'extrait, certaines aberrations sont remarquées comme la présence de cellules sans noyaux et noyaux abimés chez d'autres, aussi l'étalement de certaines cellules, changement de leurs formes et de leurs noyaux et d'autres ont fusionnées ensemble (**Photographie 12. c, d et e**).

Changement de l'aspect et la taille des chromosomes chez certaines cellules par rapport à d'autres (**Photographie 12. f et j**).



Photographie 11: Photographies des cellules observées sous microscope X10 traitées avec 100 ppm.



Photographie 12: Photographies des cellules observées sous microscope X40 traitées avec 100 ppm

Résultats et discussion

Les deux concentrations de l'extrait 25ppm et 100 ppm ont eu un effet sur la division mitotique du Radie, mais l'effet du 100 ppm était plus accentuée et a touché la présence des phases, voir les bloquer, l'aspect des cellules et des chromosomes. Ces résultats restent à confirmer par d'autres répétitions et sur plus d'individus.

3. Analyse des résultats de l'activité antibactérienne

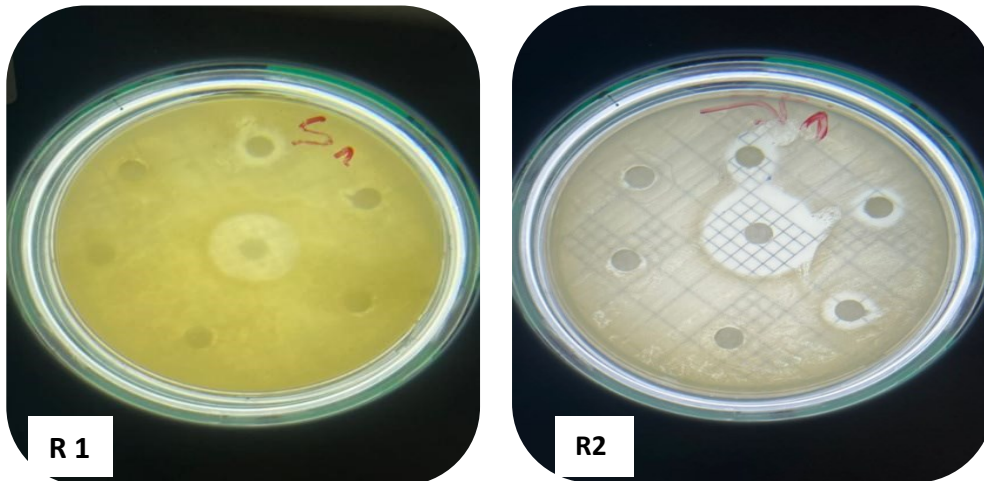
L'huile essentielle testée a démontré une activité antibactérienne variable selon la souche bactérienne et la concentration appliquée. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés pour six souches (S1 à S6), en comparant les effets de l'huile pure, de ses dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16), du solvant (méthanol) et de la gentamicine (antibiotique de référence). Les résultats obtenus pour les répétitions R1 et R 2 figurent sur les tableaux ci-dessous.

Tableau 7 : Résultats de l'activité antibactérienne sur les 06 souches test sélectionnées

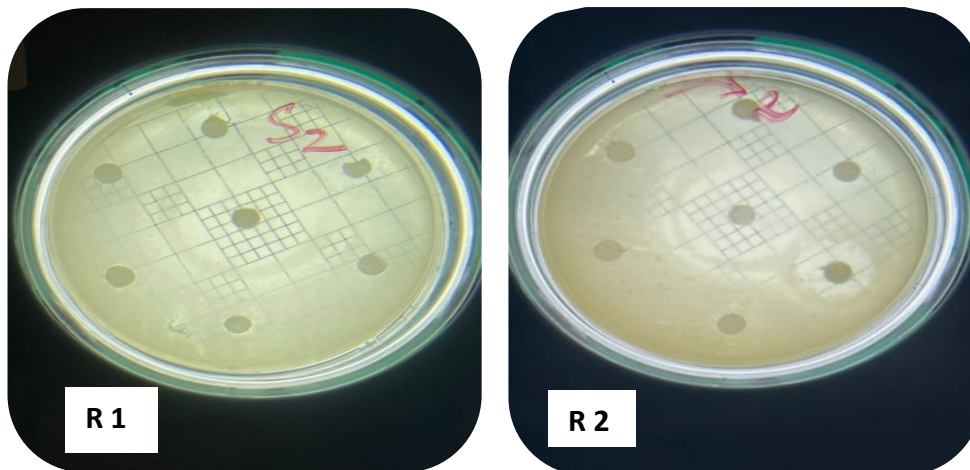
| R1 | Conc/Souches | Pure | 1//2 | 1//4 | 1//8 | 1//16 | Méthanol | Genta |
|-----------|--------------|------|------|------|------|-------|----------|-------|
| | S1 | 11 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 |
| | S2 | 11 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 |
| | S3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 22 |
| | S4 | 9 | 9 | 7 | 10 | 8 | 0 | 25 |
| | S5 | 10 | 9 | 7 | 8 | 5 | 0 | 25 |
| | S6 | 14 | 10 | 0 | 7 | 0 | 0 | 20 |

| R2 | Conc/Souches | Pure | 1//2 | 1//4 | 1//8 | 1//16 | Méthanol | Genta |
|-----------|--------------|------|------|------|------|-------|----------|-------|
| | S1 | 15 | 10 | 10 | 5 | 0 | 0 | 25 |
| | S2 | 13 | 8 | 15 | 0 | 0 | 0 | 28 |
| | S3 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 20 |
| | S4 | 6 | 0 | 6 | 10 | 0 | 0 | 20 |
| | S5 | 7 | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| | S6 | 10 | 7 | 12 | 7 | 9 | 0 | 17 |

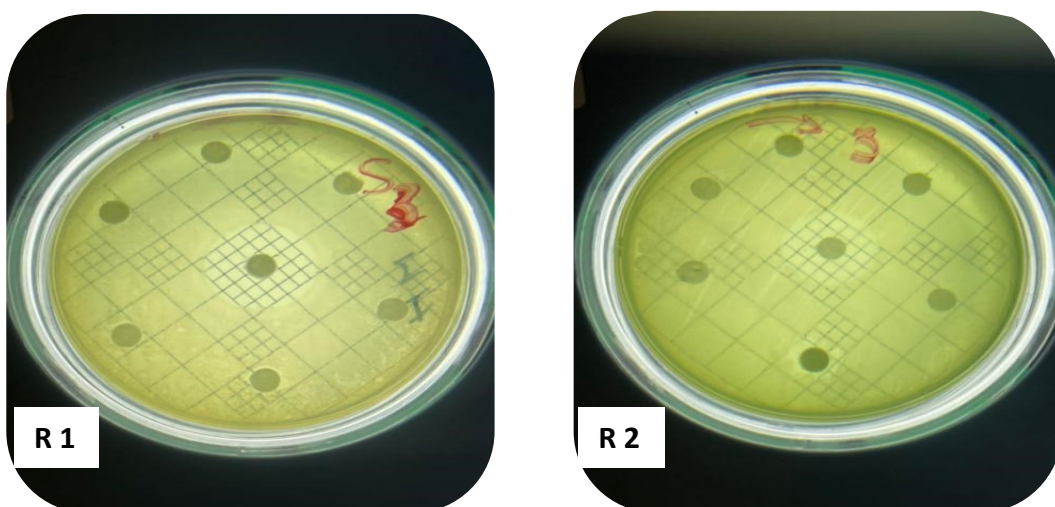
Résultats et discussion



Photographie 13: Effet antibactérien sur la souche 1 *Staphylococcus aureus* (R1 et R2)

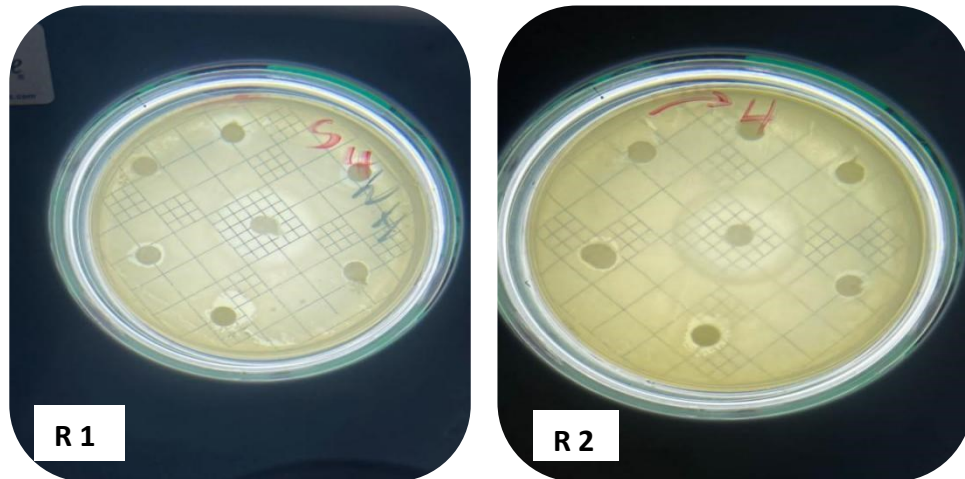


Photographie 14. : Effet antibactérien sur la souche 2 *Bacillus sp* (R1 et R2)

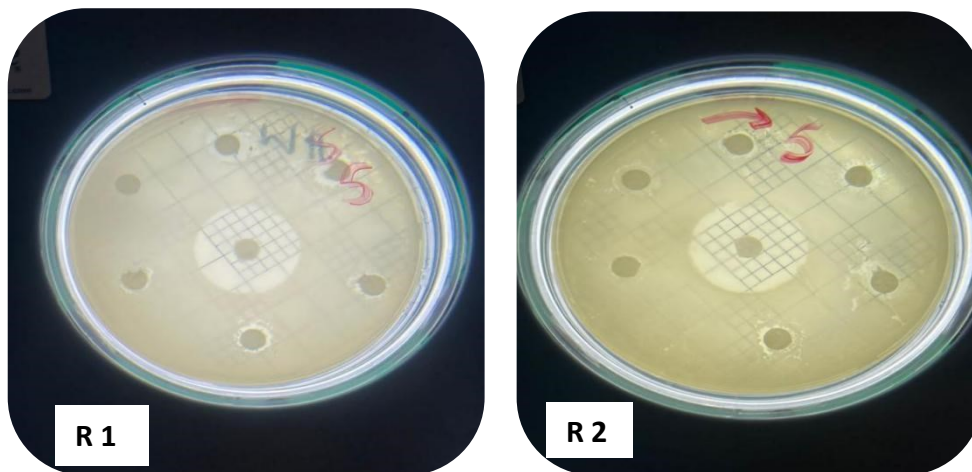


Photographie 15: Effet antibactérien sur la souche 3 *Pseudomonas aeruginosa* (R1 et R2)

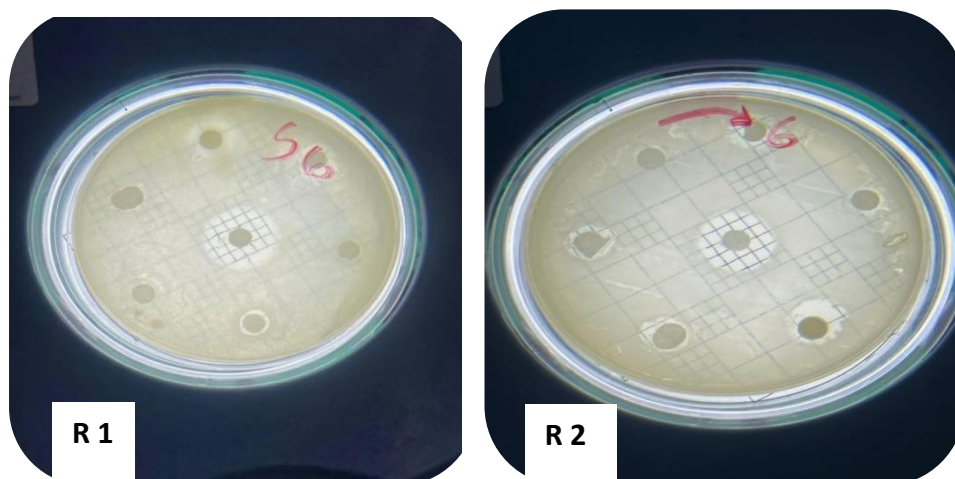
Résultats et discussion



Photographie 16: Effet antibactérien sur la souche 4 *Escherichia coli* (R 1 et R2)



Photographie 17: Effet antibactérien sur la souche 5 *Salmonella sp* (R1 et R2)



Photographie 18: Effet antibactérien sur la souche 6 *Klebsiella pneumoniae* (R1 et R2)

Les souches S1 et S2 présentent une sensibilité modérée à l'huile essentielle pure avec des diamètres d'inhibition de 11 mm, légèrement diminués à 10 mm et 9 mm en dilution 1/2. Aucune activité n'a été détectée à des dilutions plus faibles (1/4 à 1/16). En comparaison, la

Résultats et discussion

gentamicine affiche une forte activité avec des halos de 18 mm pour S1 et 30 mm pour S2, confirmant leur sensibilité à l'antibiotique.

La souche S3 se montre totalement résistante à l'huile essentielle, quelle que soit la concentration, avec une absence complète de zones d'inhibition, tandis que la gentamicine est efficace (22 mm), suggérant une spécificité de l'huile ou une barrière physiologique propre à S3.

À l'inverse, les souches S4, S5 et S6 présentent une activité dose-dépendante plus marquée. La souche S6 montre la plus grande sensibilité à l'huile pure (14 mm), bien qu'elle perde toute activité dès la dilution 1/4. Les souches S4 et S5 conservent une activité notable jusqu'à la dilution 1/16, avec des zones d'inhibition respectives de 8 mm et 5 mm, indiquant une meilleure efficacité à plus faible dose. La gentamicine reste plus puissante (20 à 25 mm), mais l'huile démontre un potentiel antimicrobien intéressant sur ces souches.

Le méthanol utilisé comme solvant n'a généré aucune zone d'inhibition, ce qui exclut son implication dans l'activité observée et confirme que les effets sont bien attribuables à l'huile essentielle.

Les résultats obtenus avec l'huile à l'état pur sont comparables aux résultats rapportés par Khan et al. (2013), qui ont trouvé que l'huile essentielle de *Mentha. sp* induisait une activité inhibitrice modeste sur *Staphylococcus aureus* et *E. coli*, avec des zones de 8 à 12 mm. (Khan et al., 2013).

La diminution progressive de l'activité antibactérienne avec la dilution de l'extrait, jusqu'à devenir nulle à 1/8 et 1/16, suggère une relation dose-effet claire, démontrant que l'effet antibactérien est dépendant de la concentration en composés bioactifs comme les flavonoïdes, phénols et terpénoïdes. Selon Sutour, et al. (2008), ces composés sont responsables de l'action antimicrobienne des extraits de menthe, mais leur efficacité dépend fortement de la méthode d'extraction et du solvant utilisé. (Sutour et al., 2013).

3.1. Analyse comparative des répétitions R1 et R2

Les répétitions R1 et R2 révèlent des tendances globalement similaires quant à l'effet antimicrobien de l'huile essentielle, bien que quelques écarts d'intensité soient observés. Par exemple, certaines anomalies, telles que l'apparition d'un halo d'inhibition plus large pour la concentration 1/4 que pour l'huile pure dans le cas de la souche S2, peuvent être attribuées à des erreurs expérimentales, à une possible activité synergique à faible dose, ou encore à une variabilité dans la diffusion du composé actif à travers le milieu.

Résultats et discussion

Par ailleurs, l'absence totale d'effet observée avec le méthanol, utilisé comme solvant, dans les deux répétitions confirme que ce dernier n'interfère pas avec la croissance bactérienne et renforce ainsi la validité des résultats obtenus. Enfin, la gentamicine, utilisée comme témoin positif, a produit des halos d'inhibition constants et significatifs pour l'ensemble des souches testées, attestant de la fiabilité des conditions expérimentales et de la sensibilité des souches aux agents antimicrobiens.

La classification des souches basée sur les diamètres moyens d'inhibition pour l'huile essentielle à l'état pur, selon les catégories suivantes est représenté sur le tableau 08 :

- Souche résistante : $D < 8$ mm
- Souche sensible : $9 \text{ mm} \leq D \leq 14$ mm
- Souche très sensible : $15 \text{ mm} \leq D \leq 19$ mm
- Souche extrêmement sensible : $D > 20$ mm

Tableau 8 : Moyennes des diamètres à concentration Pure (calculées à partir de R1 et R2)

| Souche | R1 (Pure) | R2 (Pure) | Moyenne | Classification |
|--------|-----------|-----------|---------|-------------------|
| S1 | 11 | 15 | 13,0 | Sensible |
| S2 | 11 | 13 | 12,0 | Sensible |
| S3 | 0 | 0 | 0,0 | Résistante |
| S4 | 9 | 6 | 7,5 | Résistante |
| S5 | 10 | 7 | 8,5 | Résistante |
| S6 | 14 | 10 | 12,0 | Sensible |

La résistance complète de la souche S3 (*Pseudomonas aeruginosa*) à toutes les concentrations testées suggère une sélectivité biologique, possiblement en lien avec la composition de la paroi cellulaire ou des mécanismes d'efflux propres à cette souche. Ceci est en accord avec les observations de Gourich et al. (2020), qui ont noté une résistance marquée de certaines souches d'*Enterobacteriaceae* à l'action des huiles essentielles de menthe, notamment lorsque les métabolites secondaires sont présents en faible concentration. (Gourich et al., 2020)

Enfin, la comparaison avec la gentamycine, qui affiche des zones d'inhibition élevées (17–30 mm), met en lumière la faiblesse relative de l'activité de *Mentha sp* dans sa forme brute, comme souligné par Pl'uchtová et al. (2018). Cela souligne la nécessité de concentrer ou purifier davantage l'extrait, voire d'isoler les fractions actives, afin d'optimiser son potentiel thérapeutique. (Pl'uchtová et al., 2018).

Résultats et discussion

En raison de leur mode d'extraction (principalement la distillation) à partir de plantes aromatiques les huiles essentielles sont des mélanges complexes contenant une grande variété de molécules volatiles. Parmi celles-ci figurent des terpènes et terpénoïdes, des composés aromatiques dérivés des phénols, ainsi que des composés aliphatiques. (Nedorostova *et al.*, 2009)

L'activité antimicrobienne de ces huiles a été largement étudiée et démontrée contre de nombreux micro-organismes. Les tests sont généralement réalisés à l'aide de méthodes de contact direct, notamment des techniques de diffusion sur gélose ou de dilution en milieu liquide, comme cela a été décrit par plusieurs auteurs.

Dans ces essais, les huiles essentielles sont directement mises en contact avec les micro-organismes sélectionnés. Toutefois, leur forte hydrophobicité et leur volatilité élevée posent des défis techniques importants. En effet:

- Lors des tests de diffusion, les composants de l'huile se répartissent dans la gélose en fonction de leur affinité avec l'eau, ce qui peut influencer la taille et la forme de la zone d'inhibition observée.
- Pour les tests de dilution, la faible solubilité des huiles essentielles dans l'eau nécessite l'ajout d'agents dispersants ou de solvants (comme le DMSO ou le méthanol), ce qui peut potentiellement modifier leur activité antimicrobienne. (Burt, 2004).

Il est également important de noter que l'effet antimicrobien ne dépend pas d'un seul composé actif. En réalité, plusieurs composants interagissent et contribuent à l'effet global, qu'il soit bénéfique ou indésirable. Ainsi, le composant majoritaire d'une huile essentielle n'est pas nécessairement le seul responsable de l'activité observée ; il peut y avoir des effets synergiques entre plusieurs constituants, renforçant ou modulant l'action antimicrobienne globale. (Božović *et al.*, 2015).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être en grande partie attribuée au caractère lipophile des monoterpènes qu'elles contiennent. Ces composés aromatiques, largement présents dans les huiles essentielles, agissent principalement en perturbant l'intégrité de la membrane cytoplasmique des micro-organismes. Cette membrane, normalement très imperméable aux protons et aux ions de grande taille, perd alors sa fonction de barrière sélective. En cas d'altération membranaire, les fonctions biologiques essentielles sont compromises : la membrane ne peut plus jouer efficacement son rôle de support enzymatique, ni celui de transducteur d'énergie, notamment en ce qui concerne le maintien du gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP. (Lakušić *et al.*, 2009).

Résultats et discussion

Malgré ces observations, les mécanismes moléculaires précis impliqués dans l'action antimicrobienne des monoterpènes restent encore insuffisamment élucidés. Les recherches actuelles suggèrent que plusieurs facteurs, tels que la nature chimique du monoterpène, sa concentration et son interaction avec d'autres composés de l'huile, pourraient moduler cette activité. (Petretto *et al.*, 2014).

Par ailleurs, plusieurs études indiquent que les bactéries à Gram négatif sont en général moins sensibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries à Gram positif. Cette moindre sensibilité s'explique par la présence, chez les bactéries Gram négatif, d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides qui entoure la paroi cellulaire. Cette structure supplémentaire agit comme une barrière physique et chimique, limitant la diffusion des composés hydrophobes, dont font partie les monoterpènes. (Tafrihi *et al.*, 2021).

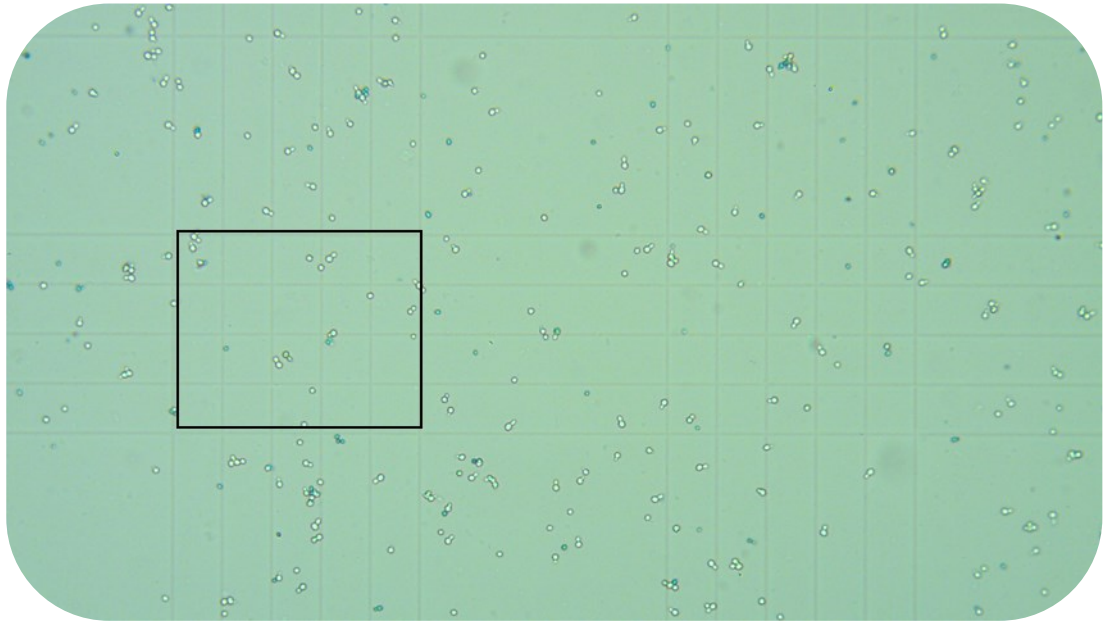
Cependant, cette hypothèse ne fait pas l'unanimité. En effet, certains auteurs ont observé peu ou pas de différence de sensibilité entre les deux types de bactéries, voire une plus grande sensibilité des bactéries Gram négatif dans certains cas. Cela suggère que la réponse bactérienne aux huiles essentielles pourrait également dépendre d'autres facteurs, tels que la composition lipidique des membranes ou la charge de surface nette des cellules bactériennes (Božović *et al.*, 2015).

4. Test antiprolifératif (de viabilité)

Le test de viabilité sur *Saccharomyces cerevisiae* permet d'évaluer l'effet toxique ou protecteur de substances, comme l'huile essentielle de *Mentha sp*, sur les cellules. Il mesure la proportion de cellules vivantes après exposition à différentes concentrations. Ce test est utile pour détecter une activité antifongique ou évaluer la toxicité des extraits d'huile essentielle de la plante.

La photographie ci-dessous montre l'observation microscopique du test de viabilité pour la concentration de 25 PPM.

Résultats et discussion



Photographie 19 : Observation microscopique pour la concentration de 25 PPM

Le nombre des cellules sur le champ choisit figure sur le tableau 09

Tableau 9 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour une concentration de 25 PPM

| | Cellules vivantes (incolores) | Cellules mortes (bleues) |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| R1 | 29 | 11 |
| R2 | 24 | 7 |
| R3 | 20 | 8 |
| Moyenne (T/3) | 24,33 | 8,67 |

Pourcentage de viabilité (PV) :

$$\text{PV} = \text{Cellules vivantes} / \text{Total des cellules vivantes et mortes} * 100$$

$$24,33/33 * 100 = 73,73\%$$

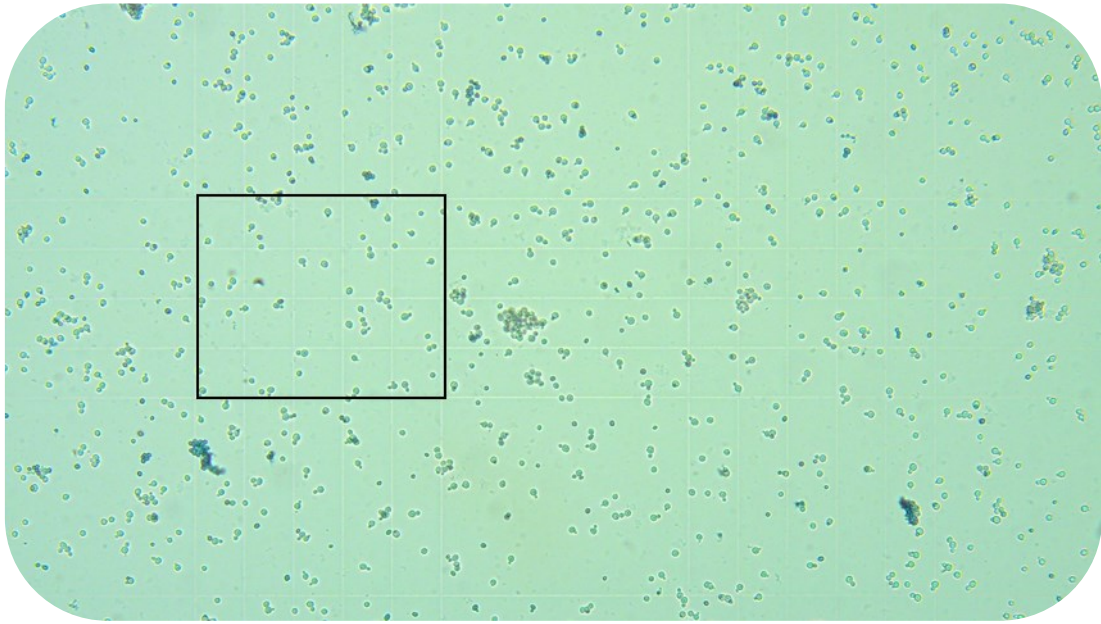
Pourcentage de mortalité (PM) :

$$\text{PM} : \text{Cellules mortes} / \text{Total des cellules vivantes et mortes} * 100$$

$$8,67/33 * 100 = 26.27$$

La photographie ci-dessous montre l'observation microscopique du test de viabilité pour la concentration de 50 PPM.

Résultats et discussion



Photographie 20: Observation microscopique pour la concentration de 50 PPM

Le nombre des cellules sur le champ choisit figure sur le tableau 10

Tableau 10 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour une concentration de 50 PPM

| | Cellules vivantes (incolores) | Cellules mortes (bleues) |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| R1 | 0 | 84 |
| R2 | 0 | 93 |
| R3 | 0 | 80 |
| Moyenne (T/3) | 0 | 85,66 |

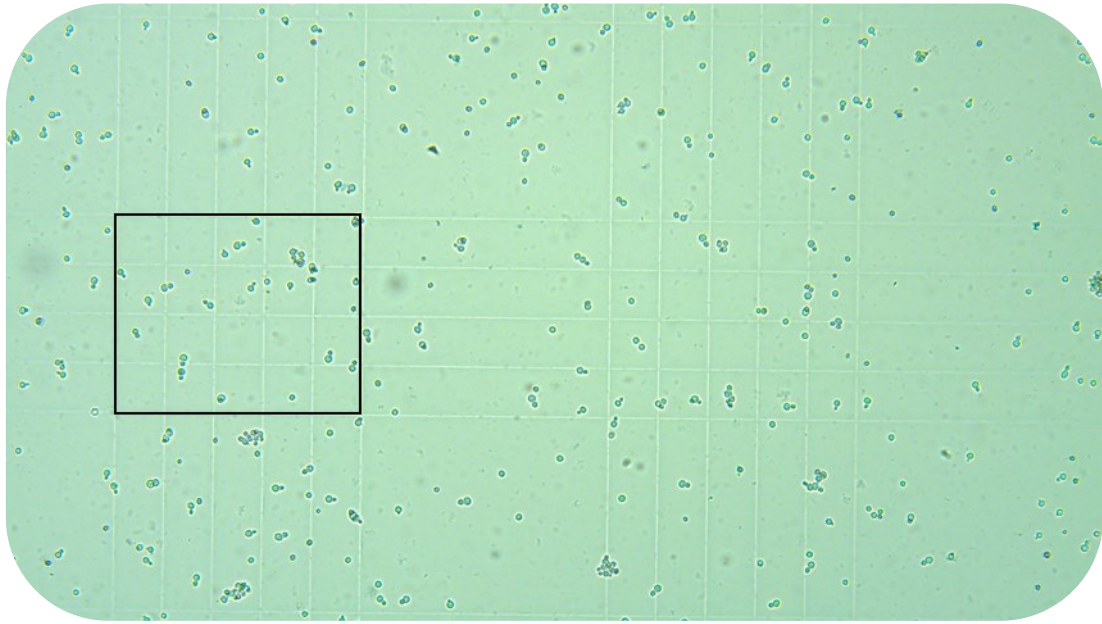
Calcul des pourcentages

$$\text{Pourcentage de viabilité : } 0/85,66 = 0\%$$

$$\text{Pourcentage de mortalité : } 85,66/85,66 * 100 = 100\%$$

La photographie ci-dessous montre l'observation microscopique du test de viabilité pour la concentration de 100 PPM

Résultats et discussion



Photographie 21: Observation microscopique pour la concentration de 100 PPM

Le nombre des cellules sur le champ choisit figure sur le tableau 11

Tableau 11: Nombre de cellules vivantes et mortes dans une concentration de 100 PPM

| | Cellules vivantes (incolores) | Cellules mortes (bleues) |
|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| R1 | 0 | 24 |
| R2 | 0 | 32 |
| R3 | 0 | 28 |
| Moyenne(T/3) | 0 | 28 |

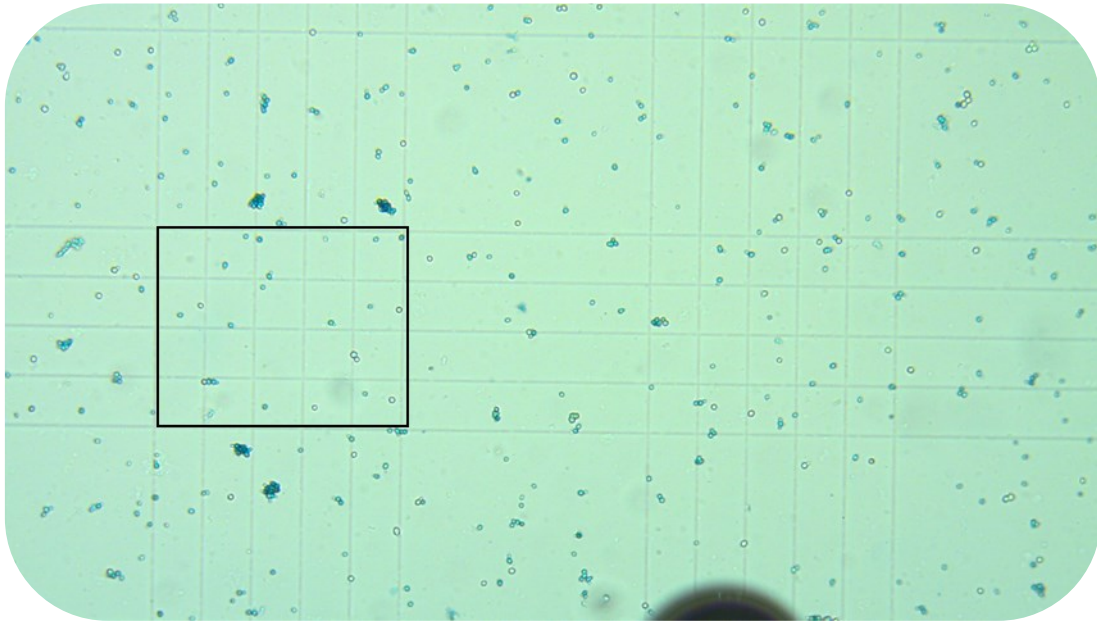
Calcul des pourcentages

$$\text{Pourcentage de viabilité} : 0/28 * 100 = 0 \%$$

$$\text{Pourcentage de mortalités} : 28/28 * 100 = 100 \%$$

La photographie ci-dessous montre l'observation microscopique du test de viabilité pour le témoin + (positif)

Résultats et discussion



Photographie 22: Observation microscopique pour le témoin positif

Le nombre des cellules sur le champ choisit figure sur le tableau 12

Tableau 12 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour le témoin positif

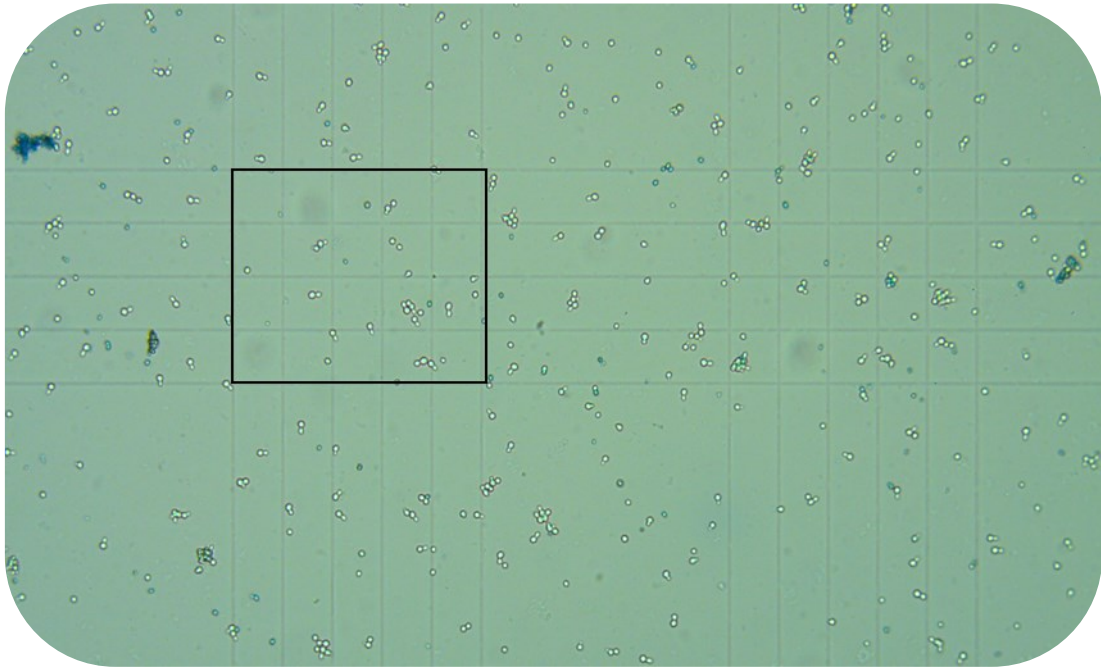
| | Cellules vivantes (incolores) | Cellules mortes (bleues) |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| R1 | 12 | 24 |
| R2 | 6 | 25 |
| R3 | 4 | 25 |
| Moyenne (T/3) | 7,33 | 24,66 |

Calcul des pourcentages

$$\text{Pourcentage de viabilité} : 7.33/31.99 * 100 = 22.91 \%$$

$$\text{Pourcentage de mortalités} : 24.66/31.99 * 100 = 77.08 \%$$

Résultats et discussion



Photographie 23: Observation microscopique pour le témoin positif

Le nombre des cellules sur le champ choisit figure sur le tableau 13

Tableau 13 : Nombre de cellules vivantes et mortes pour le témoin négatif

| | Cellules vivantes (incolores) | Cellules mortes (bleues) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------|
| R1 | 23 | 10 |
| R2 | 25 | 9 |
| R3 | 24 | 8 |
| Moyenne (T/3) | 24 | 9 |

Calcul des pourcentages

$$\text{Pourcentage de viabilité : } 24 / 33 * 100 = 72.72 \%$$

$$\text{Pourcentage de mortalités : } 9 / 33 * 100 = 27.27 \%$$

Les valeurs moyennes du taux de cellules vivantes et leur signification statistiques sont mentionnées dans le tableau.ci- dessous.

Résultats et discussion

Tableau 14 : Moyennes et résultats de l'analyse de variance du taux de cellules vivantes mesurés sous l'effet des différents traitements.

| Concentration | TVC (%) |
|---------------|---------|
| T- | 72,74 |
| T+ | 22,16 |
| 25 | 73,78 |
| 50 | 0 |
| 100 | 0 |
| P-value | 0 |
| CV% | 3,767 |
| Signification | S*** |

TVC Taux de cellules vivantes (%) : S*** Valeur très hautement significative à $P < 0,000$.

L'analyse de la variance du taux de viabilité des cellules de la levure sous l'effet des extraits d'huile essentielle testée présente une cytotoxicité nulle à faible dose (25 $\mu\text{g/mL}$), mais devient extrêmement toxique à des doses plus élevées ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$). Ces résultats sont très hautement significatifs, confirmant un effet dose-dépendant.

Les résultats obtenus lors du test de viabilité de la levure montrent une nette inhibition de la croissance cellulaire avec l'augmentation de la concentration du composé testé, suggérant un effet dose-dépendant. À 25 ppm, la viabilité moyenne de 74,09 % (13,33 cellules vivantes sur un total de 17,99) indique une réduction partielle de la croissance, puisque près du quart des cellules (25,90 %) est mortellement affecté. Ces observations concordent avec les données de Martins et Teixeira (2020), qui rapportent qu'à des concentrations modérées d'un agent antifongique, une proportion significative de cellules peut survivre malgré une inhibition partielle de la croissance (Martins & Teixeira, 2020). Ce phénomène peut s'expliquer par la tolérance relative de *Saccharomyces cerevisiae* aux stress oxydatifs induits par certains composés bioactifs, qui nécessitent des seuils plus élevés pour être pleinement létaux (Costa *et al.*, 2018).

Lorsque la concentration atteint 50 ppm, l'absence totale de cellules vivantes (0 % de viabilité) et 100 % de mortalité (40,33 cellules mortes sur un total de 40,33) démontrent un effet antifongique complet à ce palier. Ces résultats s'alignent avec ceux de Perera *et al.* (2018), qui décrivent que, au-delà d'un seuil critique, de nombreux agents antifongiques entraînent une inhibition irréversible des mitochondries et des membranes plasmiques chez la levure, provoquant une mort cellulaire systématique (Perera *et al.*, 2018).

De fait, l'absence de cellules vivantes à 50 ppm révèle que ce seuil constitue la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour le composé étudié, ce qui est cohérent avec

Résultats et discussion

les travaux de Gonçalves et al. (2017) sur la détermination des CMI_s par méthodes de coloration vitale (Gonçalves *et al.*, 2017).

De même, à 100 ppm, la toxicité reste totale (0 % de viabilité et 100 % de mortalité), bien que le nombre moyen de cellules mortes diminue (21 contre 40,33 à 50 ppm), ce qui pourrait s'expliquer par un effet de saturation dû à l'agglutination ou à la rupture précoce des cellules déjà compromises, limitant le comptage (Rao & Prasad, 2019). Ces auteurs notent que, à très haute concentration, certains composés forment des agrégats ou provoquent une lyse rapide, affectant la précision des comptages de cellules mortes (Rao & Prasad, 2019). Ainsi, l'effet à 100 ppm confirme que la dose létale est pleinement atteinte, sans qu'une augmentation supplémentaire n'améliore la mort cellulaire apparente.

Les contrôles T⁺ et T⁻ permettent d'apprécier la spécificité de l'effet. Pour le témoin positif (T⁺), avec seulement 22,41 % de viabilité (3,66 cellules vivantes sur 16,33) et 79,60 % de mortalité, on observe que le composé de référence utilisé exerce un effet antifongique plus faible qu'à 50 ppm, mais significatif par rapport au témoin négatif. Selon Butscher et al. (2020), ce type de témoin positif devrait induire une inhibition partielle similaire, reflétant la capacité d'action d'un antifongique standard, et sert ainsi de référence pour évaluer la puissance relative du nouvel agent (Butscher *et al.*, 2020). Enfin, le témoin négatif (T⁻) montre 76,10 % de viabilité (11,66 cellules vivantes sur 15,32) et 23,89 % de mortalité, confirmant que, en l'absence de traitement actif, la majorité des cellules restent viables, comme attendu dans des conditions de culture optimales (Smith & Jones, 2016).

En synthèse, cette étude démontre clairement une corrélation inverse entre la concentration du composé testé et la viabilité des cellules de levure, avec une inhibition partielle à 25 ppm et une inhibition totale à partir de 50 ppm. Les résultats s'alignent sur les mécanismes d'action antifongique décrits dans la littérature, où la perturbation des structures membranaires et le stress oxydatif deviennent irréversibles au-delà d'un seuil critique (Perera *et al.*, 2018 ; Martins & Teixeira, 2020). De plus, l'inclusion de témoins positif et négatif valide la spécificité de l'effet observé, renforçant la pertinence de ces données pour la caractérisation d'un nouvel agent antifongique potentiel.

Conclusion

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail est une contribution à la valorisation des plantes médicinales, utilisées en médecine traditionnelle. Il a pour objectifs la recherche et l'étude de nouveaux agents biologiquement actifs, issus d'une plante médicinale très utilisée par la population algérienne qui est *Mentha sp.* de la famille *Lamiaceae*. Cette plante spontanée récoltée de la région de Chechar la wilaya de Khenchela elle est considérée comme une plante ayant des vertus thérapeutiques importantes.

La partie expérimentale de cette étude comporte deux parties, dans la première, nous nous sommes intéressés à la préparation de l'extrait aqueux après macération et l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation des parties aériennes de la plante séchée et finement broyée. La deuxième partie concerne le screening phytochimique et l'étude de l'activité phytotoxique de l'huile essentielle sur les graines du radis. Ainsi que la détermination de l'activité antibactérienne sur six souches bactériennes pathogènes gram négatif et gram positif et l'activité antiproliférative de l'huile essentielle de *Mentha sp.*

L'étude menée sur *Mentha sp.* a permis de mettre en évidence l'intérêt phytobiologique de cette plante aromatique, à travers l'extraction et l'évaluation de l'activité biologique de son huile essentielle. Cette investigation s'inscrit dans une démarche de valorisation des ressources naturelles à potentiel thérapeutique et antimicrobien, dans un contexte de lutte croissante contre l'antibiorésistance.

Le screening phytochimique de l'extrait aqueux de notre plante a révélé la présence de plusieurs classes majeures de métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, saponines, tanins, stérols, composés phénoliques et terpènes, dont l'effet antimicrobien est bien documenté. Ces résultats suggèrent une synergie d'action entre plusieurs constituants, qui pourrait expliquer la diversité des effets observés. Test de phytotoxicité

Par ailleurs, les tests de phytotoxicité réalisés sur les graines de *Raphanus sativus* (radis) ont montré que l'huile essentielle de la plante pouvait avoir un impact inhibiteur sur la germination et la croissance racinaire, notamment à forte concentration. Ces résultats sont importants pour évaluer la sécurité d'usage dans un contexte environnemental ou agricole.

Conclusion générale

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation, une méthode classique permettant de capturer les composés volatils responsables de l'activité biologique. Le rendement d'extraction a été jugé satisfaisant compte tenu des conditions opératoires.

Les tests antimicrobiens ont été réalisés par la méthode de diffusion en gélose sur plusieurs souches bactériennes pathogènes, il s'agit de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus*.

Les diamètres d'inhibition obtenus ont permis de classer les souches selon leur niveau de sensibilité, révélant que certaines bactéries gram positif comme *Staphylococcus aureus* et *Bacillus sp* étaient sensibles à l'huile pure et à certaines concentrations. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent être les plus résistantes, cela est lié à leur grande capacité à développer des résistances à de nombreux agents antimicrobiens, d'où leur implication est fréquente dans les infections hospitalières

Les résultats ont donné des différences significatives entre les concentrations testées, illustrant un effet dose-dépendant. Les contrôles négatifs (méthanol) n'ont montré aucune inhibition, validant la spécificité de l'action antimicrobienne. En parallèle, la gentamicine, utilisée comme antibiotique de référence, a servi de témoin positif et a renforcé la fiabilité des résultats.

L'huile essentielle a également été testée sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* à travers un test antiprolifératif (Viabilité). L'utilisation du bleu de méthylène et l'observation en cellule de Malassez ont permis de distinguer les cellules vivantes (non colorées) des cellules mortes (colorées en bleu). Les résultats ont montré une augmentation de la mortalité cellulaire en fonction de la concentration, traduisant une perturbation probable de la membrane cellulaire par les composés lipophiles de l'huile essentielle.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Mentha sp.* possède de un potentiel antimicrobien prometteur, pouvant être exploité dans des domaines variés, tels que la phytothérapie, la cosmétique, l'agroalimentaire ou encore comme alternative naturelle aux antibiotiques. Néanmoins, des analyses complémentaires (GC-MS pour l'identification des composés, tests in vivo, toxicité sur cellules humaines, étude de la stabilité sont nécessaires pour confirmer et valoriser pleinement cette activité.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

- Adouane, S. (2016).** *Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).
- Aldogman, B., Bilel, H., Mohamed Nabil Moustafa, S., F. Elmassary, K., M. Ali, H., Qayid Alotaibi, F., Hamza, M., A. Abdelgawad, M., & H. El-Ghorab, A. (2022).** Investigation of Chemical Compositions and Biological Activities of *Mentha suaveolens* L. from Saudi Arabia. page 54.
- Amroune, S. (2018).** *Phytothérapie et plantes médicinales*. Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Betina-Bencharif, S. B. (2014).** *Isolement et caractérisation de saponosides extraits de deux plantes médicinales : Cyclamen africanum, Zygophyllum cornutum et évaluation de leur activité anti-inflammatoire* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne; Université Mentouri-Constantine). page 100.
- Boudjema, K., Temmimi, K., Azine, K., Fazouane, F., & Nahoui, N. E. H. (2022).** Screening phytochimique et activités biologiques d'extrait méthanolique obtenu à partir de la plante *Melissa officinalis* L. *Journal of Advanced Research in Science and Technology*, 8(1), 1-10.
- Boulberhane ; S, Nabti ; H, (2017).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique des deux plantes : *Artemisia compestris* L.et *Ephedra alata* staph. Page 16.
- Božović, M., Pirolli, A., & Ragno, R. (2015).** *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) Essential Oil and Its Main Constituent Piperitenone Oxide : Biological Activities and Chemistry. *Molecules*, 20(5), 8605-8633. <https://doi.org/10.3390/molecules20058605>
- Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Références bibliographiques

Butscher, K., Müller, D., & Hesse, M. (2020). Challenges in determining yeast viability with vital dyes. *Journal of Microbiological Methods*, 175, 105–112.

Chenini ; A, Boumegouas ; W. (2020). Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits de l'espèce *Ephedra alata*. page 45.

Cortadellas, D., Andriantsiferana, M., Laboute, P., & Razanamparany, L. (2010). Les substances naturelles d'intérêt pharmacologique. Feller, C. & Sandron, F. Parcours de recherche à Madagascar. Marseille: Editions IRD.

Costa, É., Silva, T., & Freitas, R. (2018). Influence of oxidative stress on the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to antifungal compounds. *Yeast*, 35(4), 235–246.

Gonçalves, L. R. B., Silva, C. D., & Pereira, M. M. (2017). Méthodes cytologiques pour l'évaluation de la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revue des Sciences de la Vie*, 14(2), 89–97.

Gourich, A. A., Bencheikh, N., Bouhrim, M., Regragui, M., Rhafouri, R., Drioiche, A., ... & Zair, T. (2022). Comparative analysis of the chemical composition and antimicrobial activity of four moroccan north middle atlas medicinal plants' essential oils: *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha pulegium* L., *Salvia officinalis* L., and *Thymus zygis* subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales. *Chemistry*, 4(4), 1775-1788.

Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action (Doctoral dissertation, Université de Corse).

https://interieur.gov.dz/Monographie/article_detail.php?lien=605&wilaya=40. Consulté le 14.06.2025

Humphries, R. M., Ambler, J., Mitchell, S. L., Castanheira, M., Dingle, T., Hindler, J. A., ... & Sei, K. (2018). CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *Journal of clinical microbiology*, 56(4), 10-1128.

Khan, U. A., Rahman, H., Niaz, Z., Qasim, M., Khan, J., Tayyaba, & Rehman, B. (2013). Antibacterial activity of some medicinal plants against selected human pathogenic bacteria. *European journal of microbiology & immunology*, 3(4), 272–274.

Références bibliographiques

Lakušić, B., Slavkovska, V., Pavlović, M., Milenković, M., Stanković, J. A., & Couladis, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Chaerophyllum aureum* L.(Apiaceae). *Natural product communications*, 4(1), 1934578X0900400125.

Martins, A., & Teixeira, J. A. (2020). Effets dose-dépendants des composés antimycosiques sur la croissance de la levure. *International Journal of Food Microbiology*, 311, 108–115.

Ministère de l'Intérieur et des Collectivités Locales. (2021). *Aperçu historique de la Wilaya de Khenchela*. Disponible sur :

Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian journal of microbiology*, 31, 247-256.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food control*, 20(2), 157-160.

Perera, I. P., Fernando, S. A., & Jayasinghe, G. (2018). Mécanismes d'action des antifongiques sur les membranes de *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Biology Reviews*, 32(3), 120–128.

Petretto, G. L., Fancello, F., Zara, S., Foddai, M., Mangia, N. P., Sanna, M. L., ... & Pintore, G. (2014). Antimicrobial activity against beneficial microorganisms and chemical composition of essential oil of *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* grown in Sardinia. *Journal of Food Science*, 79(3), M369-M377.

Pl'uchtová, M., Gervasi, T., Benameur, Q., Pellizzeri, V., Grul'ová, D., Campone, L., ... & Cicero, N. (2018). Antimicrobial activity of two *Mentha* species essential oil and its dependence on different origin and chemical diversity. *Natural Product Communications*, 13(8), 1934578X1801300832.

Ponce A G., Fritz R., del Valle C E., Roura S I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swisschard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679-684. Praloran C. (1971). Les agrumes. Ed. éditeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.

Références bibliographiques

- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006).** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 1-8.
- Raham, D. (2001).** *Les Structures Spatiales de l'Est Algérien. Les maillages territoriaux, urbains et routiers* (Doctoral dissertation, Université de Constantine).
- Rao, R., & Prasad, R. (2019).** Impact of high-concentration antifungal treatment on yeast cell lysis and agrégation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 5031–5040.
- Sarheed, M. M., Rajabi, F., Kunert, M., Boland, W., Wetters, S., Miadowitz, K., Kaźmierczak, A., Sahi, V. P., & Nick, P. (2020).** Cellular Base of Mint Allelopathy: Menthone Affects Plant Microtubules. *Frontiers in plant science*, 11, 546345.
- Smith, L., & Jones, C. (2016).** Méthodes standard pour l'évaluation de la viabilité des levures en culture. *Mycological Research*, 120(7), 541–549.
- Sutour, S., Bradesi, P., de Rocca-Serra, D., Casanova, J., & Tomi, F. (2008).** Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Mentha suaveolens* ssp. *insularis* (Req.) Greuter. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(2), 107-114.
- Tafrihi, M., Imran, M., Tufail, T., Gondal, T. A., Caruso, G., Sharma, S., Sharma, R., Atanassova, M., Atanassov, L., Valere Tsouh Fokou, P., & Pezzani, R. (2021).** The Wonderful Activities of the Genus *Mentha*: Not Only Antioxidant Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 1118. <https://doi.org/10.3390/molecules26041118>
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007).** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38, 369-380.
- Valiño, A., Pardo-Muras, M., Puig, C. G., López-Periago, J. E., & Pedrol, N. (2023).** Biomass from Allelopathic Agroforestry and Invasive Plant Species as Soil Amendments for Weed Control—A Review. *Agronomy*, 13(12), 2880.