



Mémoire en vue de l'obtention d'un Diplôme de Mater L.M.D.

Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Biologie Appliquée
Option : Biochimie appliquée

Thème

Évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle extraite à partir de la Mentha Spicata

Présenté par

Nadia Louafi

Meriem Boualleg

Devant le jury

M^{me} HAMIRI	MAA	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Président
M^{me} SEGHIER Hanene	MCB	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Examineur
M^{me} Messaadia Amira	MCB	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Promoteur

Date de soutenance : 16.06.2019

Note 16 /20

Remerciement

Nous tenons à remercier tout d'abord, Dieu qui nous a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

Un travail n'est jamais l'œuvre de son ou de ses auteurs...Nous remercions tous ceux qui par leur aide, par leurs conseils, leurs discussions ou leurs encouragements nous avons réalisé ce travail,

Notre première pensée va tout naturellement à notre encadreur Dr. Messaadia Amira qui nous a apporté aides et conseils pour la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements vont également aux membres de jury de thèse pour avoir accepté de nous assister et évaluer.

On exprime nos plus vifs remerciements à l'égard de Mme Bouzeraa Professeur en botanique à l'université Badji mokhtar Annaba, de nous avoir aidé à identifier notre plante.

Nous tenons à remercier Dr. Mechai, Dr. Azzizi et Dr. Belhadj Enseignants chercheurs à l'université Larbi Telessi -Tebessa- de nous avoir fourni aimablement les souches microbiennes, sans eux une grande partie du travail n'aurait pas été accomplie.

On ne remercierait jamais assez « M^{me} Souad » Ingénieur du laboratoire de Biochimie pour les nombreux services qu'elle nous a rendus durant la réalisation de ce travail. Ainsi « Mr. Hassen » Ingénieur du laboratoire de géologie pour l'aide précieuse et l'accueil chaleureux.

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail à

Nos chers parents qui nous ont offert leur amour et leur soutien et qui n'ont cessé de nous encourager et nous enseigner persévérance durant toute les années d'études.

Nos frères, sœurs et amis

Tous nos camarades de la promotion 2019 Biochimie Appliquée, Et à tous les enseignants qui nous ont enseigné durant nos années d'études.

Nadia & Meriem

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Position systématique de la Menthe	03
02	Les différents groupements chimiques présents dans les mono-terpènes.	08
03	Composition de l'huile essentielle extraite à partir de la menthe verte dans différente région du monde	10
04	Condition opératoire de la chromatographie en phase gazeuse	27
05	Les souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE	32
06	Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle extraite à partir de <i>Mentha spicata</i>	40
07	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> de la région de berrahel -Annaba-	42
08	Résultats IC ₅₀ de l'huile essentielle « <i>Mentha spicata</i> » et le BHT	44
09	Pourcentage d'inhibition mycélienne	46
10	Diamètre d'inhibition (mm) des différentes souches testées dans l'aromatogramme en milieu solide	48
11	Détermination de la CMI de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> sur les souches testées	49

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Répartition de la Menthe dans le monde	03
02	Repartition des huiles essentielle dans la menthe	06
03	Structure chimique de certains composés d'huiles essentielles	09
04	Montage d'hydrodistillation	11
05	Montage de distillation à la vapeur d'eau	11
06	Expression à froid des huiles essentielles	12
07	Extraction de l'HE par enfleurage	12
08	Principe de l'extraction par les solvants volatils	13
09	Principe d'extraction par CO ₂ supercritique	13
10	Montage d'une distillation par micro-onde	14
11	Arbrisseau de Menthe	18
12	Situation géographique de Berrahel	19
13	Diagramme climatique de la région de Berrahel	19
14	Préparation du matériel végétal	21
15	Synoptique de l'obtention et de l'analyse de l'huile essentielle extraite à partir de menthe	22
16	Galerie des photos résumant les étapes de l'hydro-distillation	24
17	Méthode de conservation des propriétés physicochimiques	25
18	Réfractomètre	26
19	Galerie des photos résumant les étapes de chromatographie en phase gazeux	28
20	Réduction du radical DPPH par un antioxydant	29
21	Galerie des photos résumant le test de piégeage du radical libre DPPH	31
22	Galerie des photos résumant les étapes de l'aromatogramme	34
23	Galerie des photos résumant les étapes de la dilution par gélose	36
24	Galerie des photos résumant les étapes de l'activités antifongique de l'huile	39

25	Aspect de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> L.	40
26	Rendement en huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> obtenue par hydro-distillation	40
27	Pourcentage d'inhibition de l'HE et BHT	44
28	Effet de l'huile essentielle sur la croissance de <i>Aspergillus niger</i>	46
29	Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	47
30	Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> .	49
31	Résultats du test de détermination de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testées	50

Liste des abréviations

AAI	:	Indice de l'activité antioxydante
AFNOR	:	Association française de normalisation
ATCC	:	American Type Culture Collection
BHT	:	Hydroxytoluène butylé
CMB	:	Concentration minimale bactéricide
CMI	:	Concentration minimale inhibitrice
CPG	:	Chromatographie en phase gazeuse
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DPPH	:	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
FID	:	Détecteur d'ionisation de flamme
GN	:	Gélose nutritive
HE	:	Huile essentielle
IC₅₀	:	Concentration d'inhibition à 50%
Ir p	:	Indice de rétention polaire
Ir a	:	Indice de rétention apolaire
IPP	:	Isopentylpyrophosphate
MH	:	Milieu Muller Hinton
MS	:	Spectrométrie de masse
PDA	:	Potato-dextrose-agar
PEP	:	Phosphoenolpyruvate

Table des matières

Remerciement et dédicace	
Résumé (arabe-anglais-français)	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Rappels bibliographiques	
Chapitre I : Matériel végétal	
1.1. Quelques mots de l'histoire	03
1.2. Position systématique	03
1.3. Aires de répartition	03
1.4. Conditions de culture	04
1.4.1. Photopériode	04
1.4.2. Température	04
1.4.3. Sol	04
1.4.4. Altitude	04
1.4.5. Fertilisation	04
1.4.6. Irrigation	04
1.4.7. Mode de propagation	04
1.4.8. Ennemis de la menthe	04
1.5. Utilisations	05
1.5.1. En phytothérapie	05
1.5.2. Dans l'industrie	05
Chapitre II : Huile essentielle	
2.1. Définition	06
2.2. Répartition dans la plante	06
2.3. Les caractéristiques physicochimiques des HE	06
2.4. Composition chimique de l'huile essentielle	07
2.4.1. Les composés terpéniques	07
2.4.1.1. Les monoterpènes	07
2.4.1.2. Les sesquiterpènes	08
2.4.2. Les phénylpropanoïdes	08
2.4.3. Composés d'origine divers	08
2.5. Notion de chémotype	10
2.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles	10
2.6.1. Hydrodistillation simple	10
2.6.2. Entraînement à la vapeur d'eau	11
2.6.3. Extraction par expression à froid	12

2.6.4.	Extraction par enfleurage	12
2.6.5.	Extraction par les solvants volatils	13
2.6.6.	Extraction au fluide supercritique	13
2.6.7.	Extraction par micro-onde	14
2.7.	Activités biologiques de l'huile essentielle	14
2.7.1.	Activités antibactérienne, antifongique et antivirale	14
2.7.2.	Activité antioxydante	15
2.7.3.	Activité anti-inflammatoire	15
2.7.4.	Activité anti-cancérogènes	15
2.8.	Toxicité des huiles essentielles	15
2.9.	Analyse de la composition chimique de l'HE par (CPG)	16

Partie expérimental

Chapitre III : Matériels et Méthodes

3.1.	Matériel végétal	18
3.1.1.	Critères de choix de la plante	18
3.1.2.	Récolte	18
3.1.3.	Situation géographique du site de récolte	19
3.1.4.	Identification	20
3.1.5.	Description botanique	20
3.1.5.1.	La tige	20
3.1.5.2.	Les feuilles	20
3.1.5.3.	Les fleurs	20
3.1.6.	Conservation	21
3.2.	Méthodes	23
3.2.1.	Extraction de l'huile essentielle	23
3.2.1.1.	Principe	23
3.2.1.2.	Mode opératoire	23
3.2.1.3.	Calcul du rendement	23
3.2.2.	Conservation des HE	25
3.2.3.	Détermination des propriétés physicochimique	25
3.2.3.1.	pH	25
3.2.3.2.	Densité relative 20	25
3.2.3.3.	Indice de réfraction	26
3.2.4.	Identification chimique des huiles essentielles	26
3.2.4.1.	Principe	26
3.2.4.2.	Condition opératoire	27
3.2.5.	Etudes des activités biologiques	29
3.2.5.1.	Evaluation de l'activité antioxydante test DPPH	29
3.2.5.1.1.	Principe	29
3.2.5.1.2.	Mode opératoire	30
3.2.5.1.3.	Expression des résultats	30
3.2.5.2.	Mesure de l'activité antimicrobienne de l'HE	32
3.2.5.2.1.	Activité antibactérienne	32
3.2.5.2.2.	Activité antifongique	37

Chapitre IV : Résultats et discussion		
4.1.	Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE	40
4.2.	Etude de la composition chimique de l'HE	41
4.3.	Evaluation de l'activité antioxydante	43
4.4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	45
4.4.1.	Activité antifongique	45
4.4.2.	Activité antibactérienne	48
Conclusion		52
Références bibliographiques		53

Résumé

La Menthe (*Mentha spicata*) de la famille des *Lamiaceae*, est une plante médicinale très abondante, poussant à l'état spontané dans la région de Berrahel de la wilaya d'Annaba à l'Est algérien. Utilisé en médecine populaire comme analgésique, antispasmodique et anti-inflammatoire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle extraite par hydro-distillation.

La composition chimique de l'huile essentielle est déterminée par la chromatographie en phase gazeuse CPG/FID. Plus de 30 composés sont identifiés, dominée par le cavnone.

L'étude du pouvoir antioxydant par le test DPPH a démontré que notre huile essentielle possède une activité antioxydant modérée, est reste inférieur que celle de BHT.

L'activité de l'huile essentielle sur sept souches microbiennes pathogènes dont 06 bactéries et 01 champignon montre que le pouvoir antimicrobien est très important et se caractérise par une action bactéricide et antifongique considérable contre les germes testés.

Mots clés : *Mentha spicata* ; Huile essentielle ; Activité antioxydante ; Activité antimicrobienne ; Hydro distillation.

الملخص

النعناع الأخضر (*Mentha spicata*) من عائلة الشفويات *Lamiaceae* ، نبات طبي جد منتشر، وينمو تلقائيا في منطقة برحال بولاية عنابة في شرق الجزائر. يستخدم في الطب الشعبي باعتباره مسكن، مضاد للتشنج ومضاد للالتهابات.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والقدرة المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية المستخرجة من النعناع الأخضر عن طريق التقطير المائي.

عند تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية بواسطة FID/CPG . تم التعرف على أكثر من 30 مركبة ، يهيمن عليها الكافرون في الغالب.

أظهرت النتائج أن الزيت الأساسي ذو نشاط مضاد للتأكسد معتبر ولكن يبقى أدنى من القدرة المضادة للـ BHT

يُظهر نشاط الزيوت العطرية على سبع سلالات جرثومية مُمرضة ، بما في ذلك ستة من البكتيريا وعفن فطري ، أن القدرة المضادة للميكروبات مهمة للغاية

الكلمات المفتاحية: *Mentha spicata*؛ التقطير المائي؛ زيت أساسي؛ نشاط مضاد للأكسدة؛ نشاط مضاد

للميكروبات

Abstract

Mint (*mentha spicata*) belongs to family of *Lamiaceae*, is a medicinal plant very abundant, growing spontaneously in the area of Berrahel at wilaya of Annaba in eastern Algeria. Used in folk medicine as analgesic, antispasmodic and anti-inflammatory.

The objective of this study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil extracted by hydro-distillation.

The chemical composition of the essential oil is determined by GC / FID gas chromatography. More than 30 compounds are identified, dominated by cavnene

The study of antioxidant power by the DPPH test has shown that our essential oil has a moderate antioxidant activity, is lower than BHT.

The activity of the essential oil on seven pathogenic microbial strains including 06 bacteria and 01 fungus shows that the antimicrobial power is very important and is characterized by a considerable bactericidal and antifungal action against the tested germs.

Key words: *mentha spicata*, essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, hydro distillation.

Introduction générale

Introduction

Les travaux en ethnopharmacologie ont mis en relief l'utilisation des plantes médicinales pour un intérêt pharmaceutique. La rationalité industrielle trouve dans cette démarche une base innovatrice pour la mise au point de produits naturels à usage médical, alimentaire et cosmétique (**Dibong *et al.*, 2011**). La région méditerranéenne, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. Grâce à leurs pouvoirs antiseptiques, les huiles essentielles, extraites à partir de ces plantes, peuvent assainir l'air ambiant et les systèmes de ventilation (**Pibiri, 2006**), limitant ainsi la propagation de germes microbiens qui se transmettent de plus en plus facilement dans les locaux publics, les écoles, les crèches et surtout les hôpitaux (**De Billerbeck *et al.*, 2002**).

L'Algérie est un pays qui regorge de plantes médicinales poussant généralement à l'état spontané (**Baba Aïssa, 1991**). Il existe plus de 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (**Oyedemi et Afolayan, 2011**), ce qui fait que les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées, une immense source de composés phénoliques à découvrir, citons principalement : l'acide phénolique, les flavonoïdes, les flavonols, les tannin condensés, etc. Ces substances antioxydantes réduisent considérablement les dommages causés par les radicaux libres dans le corps (**Gu *et al.*, 2014 ; Ben Mansour *et al.*, 2015**). Ces derniers sont des molécules très réactives comme l'anion superoxyde, l'anion hydroxyle, l'oxyde nitrique et le peroxyde de nitrogène qui seraient impliquées dans l'apparition des maladies cardiovasculaires, certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement (**Karmakar *et al.*, 2011**).

La menthe connue sous le nom de naâna, pousse dans les zones humides et près des cours d'eau en basse et moyenne montagne. Elle conserve depuis l'antiquité une diversité infinie d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique traditionnelle (**Benayad, 2008**). Dans certaines régions de l'Algérie, elle est utilisée pour ses propriétés digestive, antiseptique, expectorante, antispasmodique et tonique (**Taneja et Chandra *et al.*, 2012**). Riche en vitamine C, en fer et en manganèse, elle possède également des vertus antioxydants (**McKay et Blumberg, 2006**). C'est une plante herbacée vivace de la famille des lamiacées,

qui vit longtemps (plus que deux ans), résiste aux rigueurs de la mauvaise saison, que ce soit le gel de l'hiver ou la sécheresse des périodes de canicule. La tige est quadrangulaire violacée, atteint en générale une hauteur d'environ 10-50 cm dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. La plante présente des feuilles persistantes, opposées par paire, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës et à bord dentelé. Les fleurs violacées forment des épis très courts, ovoïdes à l'extrémité des rameaux (**Benbouali, 2006**).

Vu l'importance que présente la menthe dans les régions de l'est algérien, et afin de pouvoir l'utiliser à bon escient, notre travail s'inscrit dans ce contexte est à pour un premier objectif, l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle par une analyse semi-qualitative et quantitative « CPG », le second objectif est d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne vis-vis des souches identifiées préalablement.

parties Bibliographiques

Chapitre 1

Matériel végétal

Chapitre 2

Huile essentielle

1.1. Quelques mots de l’histoire

Originnaire d’Asie et l’Europe médiévale, la menthe est un aromate connu pour sa prolifération rapide. Libérant un parfum très fort et agréable, elle embaumait les tombeaux égyptiens, grecs et les demeures des Hébreux. Les Romains aromatisaient leur vin et l’incorporaient à la plupart des sauces; leurs femmes mâchaient une pâte faite de menthe et de miel pour avoir l’haleine fraîche. Au Moyen-Âge, la menthe était connue davantage pour ses vertus thérapeutiques, de nos jours, elle est utilisée pour combattre les rhumes, la toux mais aussi pour améliorer la digestion (Staub et Bayer, 2013).

1.2. Position systématique

La menthe forme un genre (*Mentha*), comprenant de nombreuses espèces qui s’hybrident facilement entre elles, on peut citer comme exemple : *Mentha longifolia*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Mentha arvensis*, etc. (APGIII, 2009 ; Dupont et Guignard, 2012).

Tableau1 : Position systématique de la menthe

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiosperme
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Gamopétale
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

1.3. Aires de répartition

La menthe est presque mondiale. On la trouve en Europe, en Afrique et en Asie, mais quelques espèces sont aussi présentes sur le continent américain et en Australie.

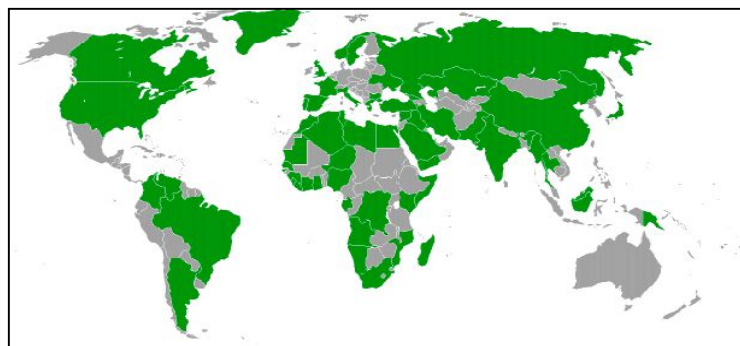


Figure 1: Répartition de la Menthe dans le monde (Hadj Ahmed et Kouider Mahmoud, 2016)

1.4. Conditions de culture

Il existe de très nombreuses variétés de menthe et toutes sont faciles à entretenir et peuvent durer des années si elles sont soignées et cultivées correctement (**Gerbranda, 2004 ; Telci et al., 2011**).

1.4.1. Photopériode : les durées d'éclairement croissantes provoquent un allongement des feuilles au détriment de leurs largeurs (**Elfadl et Skiredj, 2002**).

1.4.2. Température : la sensibilité de la menthe à la température est accentuée par le caractère vivace. La plante entre en repos végétative pendant l'hiver, une température maximale de l'ordre de 30°C donne une croissance optimale (**Elfadl et Skiredj, 2002**).

1.4.3. Sol : le système racinaire de la menthe est peu profond. Il exige un sol peu compact, perméable et légèrement argileux. La culture réussit dans un sol bien drainé à pH allant de 5,5 à 8 (**Auburn et Magnan, 1993**).

1.4.4. Altitude : la menthe peut être cultivée en climat montagnard, tempéré, humide jusqu'à 1000 m d'altitude (**Telci et al., 2011**).

1.4.5. Fertilisation : le sol doit être riche en matière organique essentiellement : l'azote, le phosphore et le potassium (**Auburn et Magnan, 1993**).

1.4.6. Irrigation : la menthe est une culture qui valorise l'eau elle nécessite une grande quantité durant la saison de croissance, soit environ 1500 mm/an (**Telci et al., 2011**).

1.4.7. Mode de propagation : la menthe se multiplie naturellement par division de souches, ou par plantations des stolons racinés qui cheminent sous terre en périphérie du pied mère. Il est aussi possible de multiplier la menthe par bouture (**Telci et al., 2011**).

1.4.8. Ennemis de la menthe : elle est sensible aux acariens, chenilles et nématodes, lorsqu'il y a l'humidité excessive, elle peut être sujette à l'oïdium, au mildiou et à la rouille (*Puccinia menthea*) (**Gerbranda, 2004**).

1.5. Utilisations

1.5.1. En phytothérapie

Les parties aériennes fleuries de la menthe sont largement utilisées en médecine populaire dans de nombreuses cultures (**Agnihotri et al., 2005**). Conseillées souvent en cas de :

-Trouble digestif : la menthe stimule la sécrétion des sucs digestifs et de la bile, elle décontracte les muscles intestinaux et atténue les nausées, le ballonnement et les colites. Son action antispasmodique est efficace en cas de diarrhée ou de constipation (**Delille, 2007**).

-Douleur et inflammation : la menthe est utilisée pour soulager les maux de tête, traitée les démangeaisons cutanées. Avec son action expectorante, elle est efficace contre l'inflammation des voies respiratoires (bronchite, sinusite) et de la muqueuse buccale, soulage les symptômes du rhume, de la toux, les douleurs rhumatismales musculaires et névralgiques (**Malik et al., 2012**).

-Manifestations nerveuse: la menthe fortifie tout le système nerveux, considérée comme un stimulant et sédatif diffusible, rend d'éminents services contre la nervosité (**Lobstein et Couic-Marinier, 2016**).

La menthe ne doit pas être administrée aux jeunes enfants, en usage médicinal. Elle est excitante et à la longue irritante (**baba aissa, 1999**).

1.5.2. Dans l'industrie

La menthe est importante en utilisation industrielle comme aromatisant aussi bien pour les produits médicamenteux que pour ceux de la parapharmacie et de l'hygiène. L'industrie agro-alimentaire est le principale consommateur : liquoristerie (liqueur, sodas, sirops) confiserie (bonbon et sucre cuits, pâtes à mâcher, chocolat), l'industrie de tabacs et la parfumerie). (**Hammami et Abdesselem, 2005**)

2.1. Définition

L'association Française de Normalisation, définit les huiles essentielles comme étant des liquides concentrés très complexes de nature hydrophobes, volatils et odorants qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques (AFNOR, 2000).

2.2. Répartition dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, en particulier les sommités fleuries (ex. lavande), les feuilles (ex. laurier) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (ex. cannellier), les bois (ex. santal, camphrier), les racines (ex. vétiver), les rhizomes (ex. curcuma, gingembre), les fruits (tout-épices, anis, badiane), les graines (ex. muscade) et les boutons floraux (ex. clou de girofle) (Paris et Hurabielle, 1981). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées à proximité de la surface de la plante (Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010).

Dans la menthe les structures sécrétrices se trouvent au niveau de l'épiderme foliaire : les glandes peltées et capitées (figure 2 - A et B). Une fois synthétisés, les composés sont excrétés et s'accumulent dans l'espace sous cuticulaire (figure 2-C). Une dispersion lente des composés volatils de l'HE peut attirer des pollinisateurs ou protéger contre des insectes ravageurs. L'attaque mécanique de la feuille par un herbivore casse les poches contenant l'HE, provoquant ainsi la libération des composés toxique ou inappétant pour l'agresseur (Moja et Jullien, 2014).

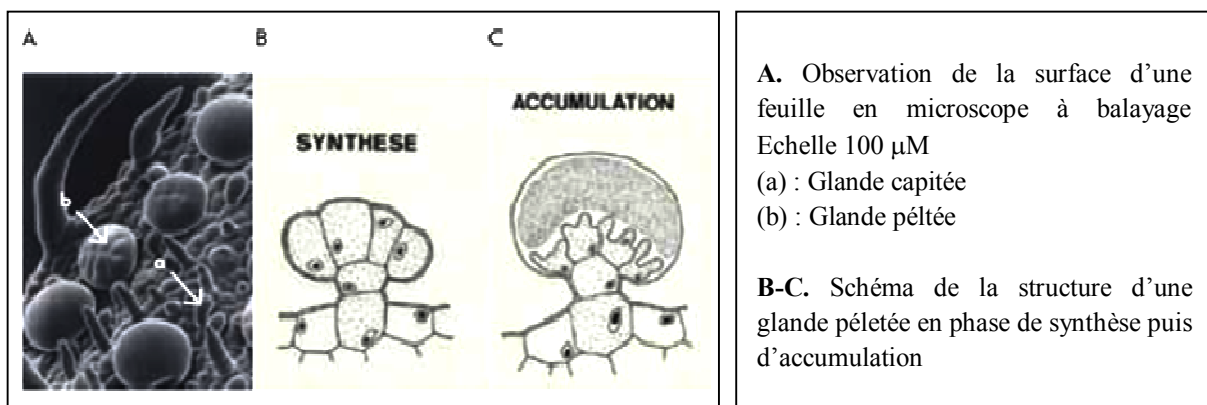


Figure 2: Répartition des huiles essentielles dans le menthe (Moja et Jullien, 2014)

2.3. Propriétés physico-chimique

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques ; elles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeur modifie, leurs point d'ébullition augmente et leurs solubilité diminue (**Baser et Buchbauer, 2010**).

2.4. Composition chimique de l'huile essentielle

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

2.4.1. Les composés terpéniques : sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) (**Bakkali et al., 2008**). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en

- * **monoterpènes** → formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$)
- * **sesquiterpènes** → formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$)
- * **Diterpènes** → formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$)
- * **tetraterpènes** → sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes
- * **polyterpènes** → ont pour formule générale $(C_5H_8)_n$ ou n est compris entre 9 à 30
- * **Terpénoïdes** → sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide)

2.4.1.1. Les monoterpènes : représentent la majorité des constituants des H.E, volatils à odeur souvent agréable, ils peuvent être acyclique (myrcène, ocimène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène, camphène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique (**Bruneton, 2009**).

Tableau 2 : les différents groupements chimiques présent dans les mono-terpènes (Bruneton, 2009)

Alcools	acycliques (géraniol, linalol, citronellol) monocycliques (menthols, α -terpinéol, 1-terpinènes-4-ol) ou bicycliques (bornéol, fenchol)
Aldéhydes	le plus souvent acycliques (géraniol, citronellal, sinsenal)
Cétones	acycliques (tagetone), monocyclique (carvone, menthone, pulégone) ou bicyclique (camphre, fenchone, thuyones)
Esters	acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronnellyle), monocycliques (acétate de menthyle, d' α -terpinyl) ou bicycliques (acétate d'isobornyle)
Peroxydes	Ascaridole
Ethers	cinéole (on dit aussi eucalyptol)
Phénols	thymol, carvacrol

2.4.1.2. Les sesquiterpènes : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 2009**).

2.4.2. Les phénylpropanoïdes : les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Buchanan et al., 2000**). Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (**Buchanan et al., 2000**).

Bruneton (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil: anéthole, anisaldehyde, estragole. persil : apiole) mais aussi de celles du girofle (eugénol), de la muscade (safrol, eugénol), de l'estragon (eugénol), du basilic (eugénol), de l'acore (asarone) ou de la cannelle (cinnamaldéhyde, eugénol, safrol).

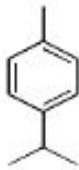
2.4.3. Composés d'origine diverses : Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides et lactones (**Teisseire, 1991**). Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits (**Bruneton, 1999**).

1. Terpenes

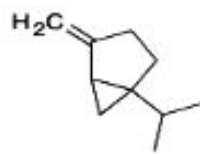
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("γ") or p.cymene

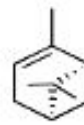


Sabinene

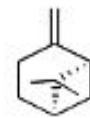


Carbure bicyclic

Alpha-pinene

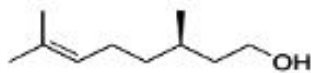


Betapinene

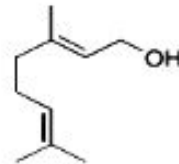


Alcohol acyclic

Citronellol

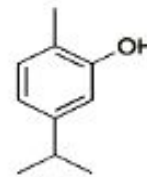


Geraniol

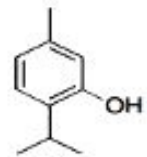


Phenol

Carvacrol



Thymol



-Sesquiterpenes

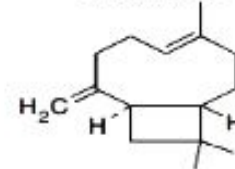
Carbure

Farnesol



Alcohol

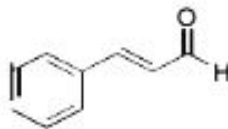
Caryophyllene



2. Aromatic compounds

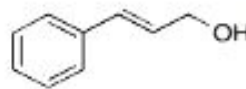
Aldehyde

Cinnamaldehyde



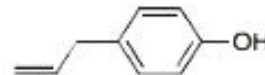
Alcohol

Cinnamyl alcohol



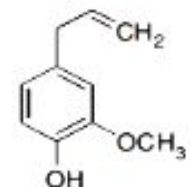
Phenol

Chavicol



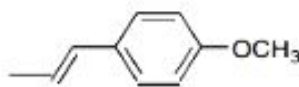
Phenol

Eugenol



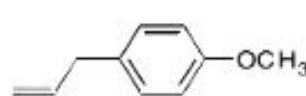
Methoxy derivative

Anethole



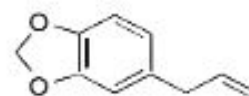
Methoxy derivative

Estragole



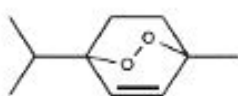
Methylene dioxy compound

Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

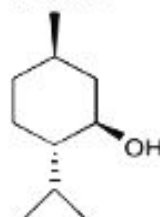


Figure 3 : Structure chimique de certains composés d'huiles essentielles
(Bakkali *et al.*, 2008)

2.5. Notion chémotypes

Le chémotype est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle (**Cosentino *et al.*, 1999**). Cette classification dépend de facteurs qui peuvent influencer la composition de l'HE à savoir le climat, le sol, la période de récolte, le séchage, le choix de la méthode d'extraction, ainsi que la contamination par des parasites, des virus ou des mauvaises herbes (**Müller-Riebau, 1997 ; Zygadlo et Juliani, 2003 ; Bozin *et al.*, 2006**).

Biochimiquement différents, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes mais aussi des toxicités très variables (**Pibiri, 2006**). La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines huiles essentielles (**Laouer, 2004**).

Tableau 3 : Composition de l'huile essentielle extraite à partir de la menthe verte dans différente région du monde (Carlier-Loy, 2015).

Composition chimique (%)	Inde	Portugal	Algérie
α -pinène	0.3	0.9	0.32
β -pinène	0.6	0.9	0.607
β -myrcène	0.4	-	0.379
Limonène	11.9	20.1	6.129
1,8-cinéole	0.4	1.5	3.8
Carvone	66.4	41.1	59.4
Terpinen-4-ol	2	0.6	1.12
Pulegone	-	0.5	0.224
Menthone	-	0.1	-
β – caryophyllène	0.4	4	2.969
α - humulène	0.3	-	0.187

2.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Avant de pouvoir utiliser ou analyser les huiles essentielles, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point (**France Ida, 1996**) :

2.6.1. Hydrodistillation simple : la plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité. Cette méthode est généralement utilisée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est

aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées (Franchomme, 1990).

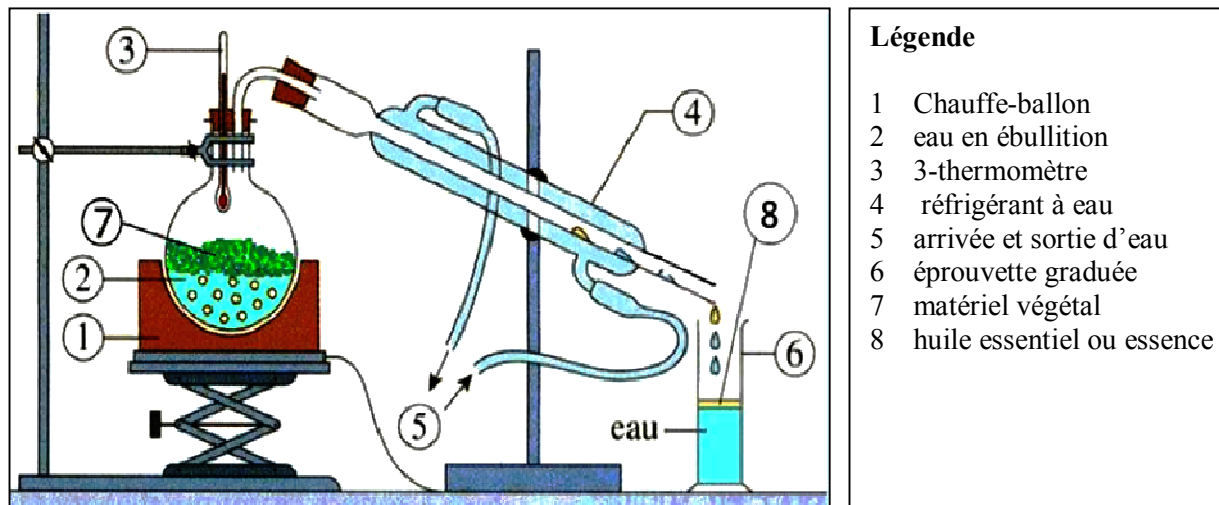


Figure 4: Schéma d'un montage d'hydrodistillation (Web1)

2.6.2. Entraînement à la vapeur d'eau : à la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence, se condense dans un essencier. Les parties insolubles dans l'eau sont décantées pour donner l'huile essentielle, alors que la partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale) (Dastmalchi *et al.*, 2008).

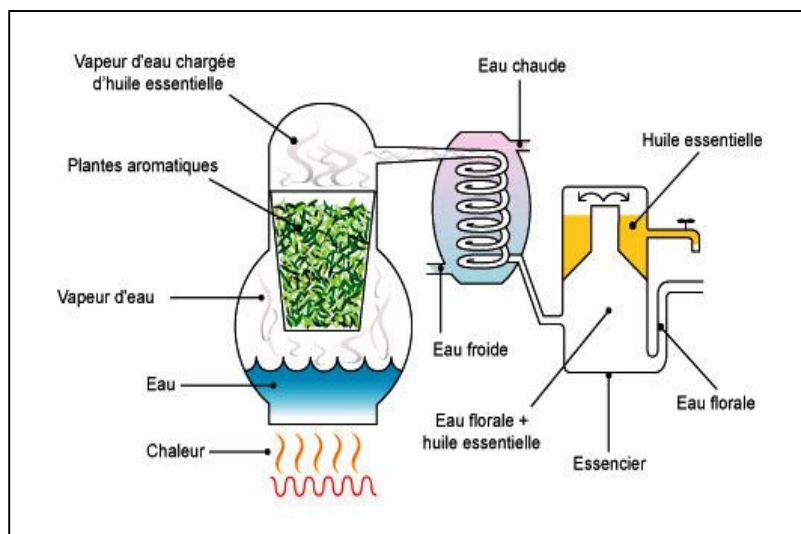


Figure 5: Extraction à la vapeur d'eau des HE (Web1)

2.6.3. Extraction par expression à froid: souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des épicarpes frais des Citrus (citrons, oranges, mandarines et pamplemousses). Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (**Chaintreau *et al.*, 2003**).



Figure 6: Expression à froid des huiles essentielles (Web1)

2.6.4. Extraction par enfleurage : permettant l'exploitation des organes fragiles, la procédure met à profit la liposolubilité des composés odorants des végétaux. Le matériel végétal est mis sur des plaques de verre recouvertes d'une mince couche de graisse. Cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (**Lardry et Haberkorn, 2007**). La technique est laborieuse demandant une grande labilité, elle est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite.



Figure 7: Extraction de l'HE par enfleurage (Web1)

2.6.5. Extraction par les solvants volatils : Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut pas extraire par distillation. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de concrète par l'alcool absolu permet d'éliminer les cires et conduit à «l'absolue» (Luque de Castro *et al.*, 1999).

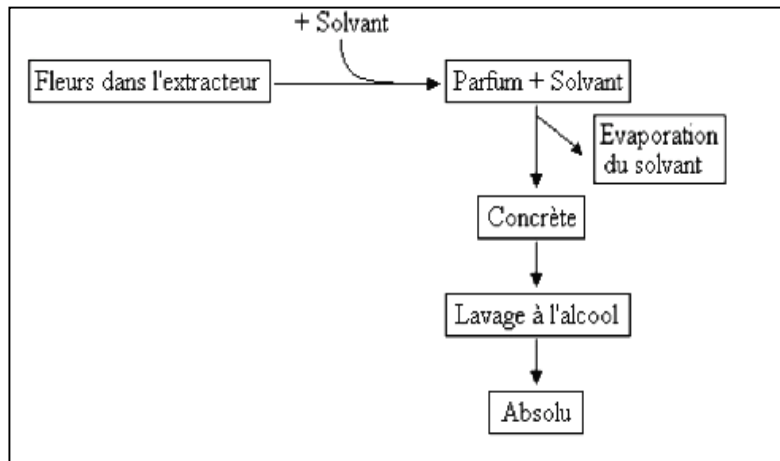


Figure 8: Principe de l'extraction par les solvants volatils (Kazazi *et al.*, 2007)

2.6.6. L'extraction au fluide supercritique : L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique ($P=72.8$ bars et $T= 31.1^{\circ}\text{C}$). Le fluide ainsi obtenu traverse la plante et se charge en composé à extraire. Ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait (Pellerin, 2001). L'extraction des huiles essentielles par le CO_2 supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en un temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Kazazi *et al.*, 2007).

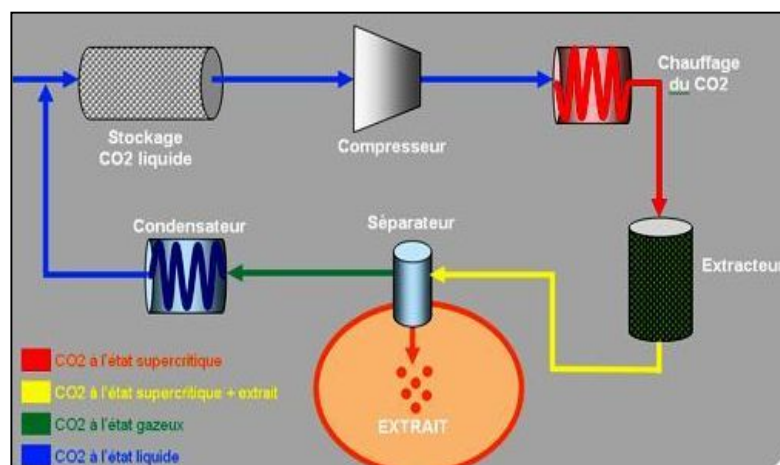


Figure 9: Principe d'extraction par CO_2 supercritique (Web1)

2.6.7. **L'extraction par micro-ondes** : Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant. On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**Paré, 1997**).

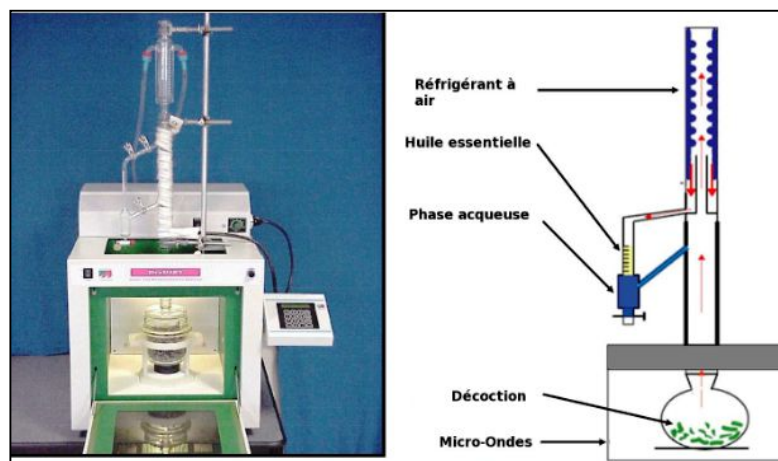


Figure 10: Montage d'une distillation par micro-onde (Web1)

2.7. Activités biologiques de l'huile essentielle

Les plantes aromatiques produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, pour :

- attirer les insectes et favoriser la pollinisation (**Web2**);
- conserve l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Naggar et Iharchine, 2016**);
- repousse les herbivores, les insectes et les micro-organismes (**Web3 ; Prévosto et al., 2015**).

Chez l'homme : La diversité moléculaire des métabolites que les huiles essentielles contiennent, leurs confèrent des rôles et des propriétés biologiques très variés.

2.7.1. Activités antibactérienne, antifongique et antivirale : La majorité des huiles essentielles ont un spectre d'action très étendu contre un large éventail de microorganismes dont les bactéries, les champignons, les levures, les virus et les protozoaires. La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme

antimicrobiennes (**Burt, 2004**). Les huiles essentielles ou leurs composés actifs peuvent être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires ainsi que dans le traitement des infections fongiques touchant l'homme (**Sokmen et al., 1999 ; Serrano et al., 2008 ; Kotan et al., 2010**).

Les activités antibactérienne et antifongique sont estimées à la grande complexité de la composition des huiles essentielles. Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien et antifongique le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol) et des aldéhydes (néral, géraniol). En général, l'activité décroît selon le type de fonction chimique: phénol > alcool > aldéhyde > cétone > ester > hydrocarbure (**Benjlali et al., 1986**). Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolus jusqu'à ce jour. Les huiles essentielles constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux. En effet, les virus sont très sensibles aux phénylpropanoïdes, monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles (**Astani et al., 2009 ; Astani et al., 2010**).

2.7.2. Activité antioxydante : Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

2.7.3. Effets anti-inflammatoires: L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leurs activités antioxydantes, mais aussi à leurs interactions avec les cascades de signalisation impliquant les cytokines et les facteurs de transcription régulateurs (**Miguel, 2010**).

2.7.4. Effets anti-cancérigènes: Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle de (*Nigella sativa L.*) démontre une activité cytotoxique in vitro contre différentes lignées cellulaires tumorales. In vivo, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (**Ait Mbarek et al., 2007**).

2.8. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en

cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autre ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone) (Guba, 2001).

2.9. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme (Arpino *et al.*, 1995). Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ou de spectrométrie de masse (DSM) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (Bicchi, 2008).

Le fonctionnement du chromatographe repose sur le principe suivant : L'huile essentielle est injectée dans le chromatographe à l'aide d'une micro-seringue, que l'on plante dans un septum en élastomère. Dans la chambre d'injection, une température relativement élevée facilite l'évaporation de l'huile essentielle pour dissocier ses composés, puis un gaz porteur autrement appelé (gaz vecteur) les transporte en tête de colonne. Cette dernière se présente sous la forme d'un tube de silice enroulée sur lui-même d'une longueur allant de 01 à plus de 60 m, placé dans une enceinte à température régulée.


Les composés sont alors séparés grâce à la phase stationnaire dans la colonne qui va créer un phénomène de rétention plus ou moins fort selon les molécules. À la sortie de la colonne, les molécules sont une à une détectées au fur et à mesure de leur élution, et identifiées à des temps de rétention différents selon leur affinité avec la phase stationnaire. A ce niveau là, le détecteur envoie un signal électronique plus ou moins fort selon la quantité de la molécule détectée, et l'ensemble des signaux est envoyé à un enregistreur qui s'occupe de tracer le chromatogramme (Bicchi, 2008).

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (Kováts, 1965) ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool et Kratz, 1963). Les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature (Adam, 1995 ; Joulain et König, 1998 ; König *et al.*, 2001).


Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériels et Méthodes



L'ensemble des expérimentations sont réalisées à l'Université Cheikh Larbi
Tbessi au sein du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie sur une
période de 02 mois allant de mars au mois de mai 2019.



3.1. Matériel végétal

3.1.1. Critères de choix de la plante

Pour mieux valoriser la biodiversité des plantes dans l'Est Algérien, notre étude s'est intéressée à la Menthe «*Mentha spicata*», espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées. Une étude bibliographique nous a permis d'effectuer ce choix. Ainsi, les critères de sélection sont les suivants:

- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies d'origine microbienne.
- La non toxicité de la plante, vu qu'elle est utilisées dans les préparations culinaires et dans les tisanes.
- Richesses en substances aromatique (huiles essentielles) et polyphénols.

3.1.2. Récolte

Les parties aériennes (tige, feuilles et fleurs) de la menthe au stade de floraison, où il y'a une accumulation importante des substances bioactives, ont été récoltées au mois d'Avril de l'année 2018, dans la région de Berrahel.



Figure 11: Arbrisseau de Menthe

3.1.3. Situation géographique du site de récolte

La commune de Berrahal est située à l'extrême ouest de Annaba à environ 30 Km sur une superficie de 180 Km². Localisée à une latitude 36° 50' 00" Nord, longitude 7° 27' 00" Est.



Figure 12: Situation géographique de Berrahal (Web2)➤

Bénéficiant d'un climat méditerranéen chaud avec été sec. Cet emplacement est classé comme Csa par Köppen-Geiger. La température moyenne à Berrahal est de 17.7°C et les précipitations sont en moyenne de 653 mm.

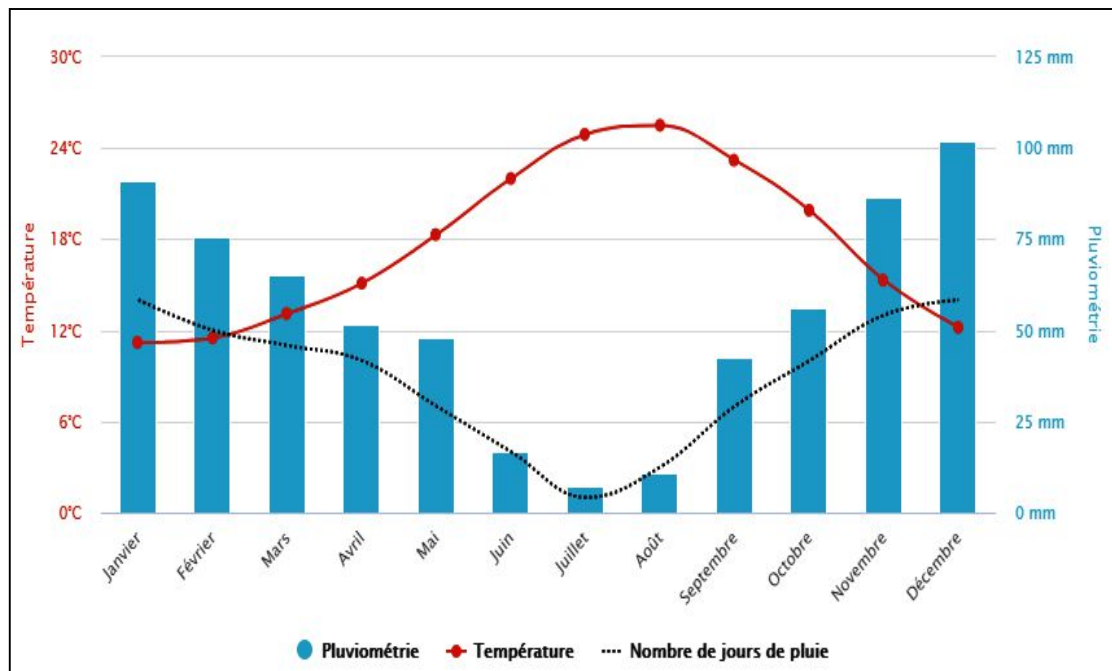


Figure 13: Diagramme climatique de la région de berrahal (Web 3)

3.1.4. Identification

L'identification botanique a été faite sur un spécimen d'herbier par le Pr. Bouzeraa, botaniste à l'Université Badji Mokhtar Annaba. Sa taxonomie est la suivante (**Quezel et Santa, 1963**).

Règne : Plantes

Embranchement: Spermaphytes

Classe: Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Mentha*

Espèce: *Spicata L.*

3.1.5. Description botanique

La menthe est une plante vivace, robuste de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave très pénétrante (**Baba, 1991**).

La tige : quadrangulaire (carrée) ascendante (orthotrope). Elle est de couleur pourpre, rameuses à rhizomes traçants.

Les feuilles : sont opposées persistantes, dentées en scie, vertes sur les 2 faces, glabres ou presque glabres.

Les fleurs : poussent en grappe à l'aisselle de la feuille. Elles sont zygomorphes et hermaphrodites. La fleur est pentamère oligostémone et ses pétales sont soudés (gamopétales). L'ovaire est super. L'inflorescence est indéfinie en épi cylindrique dense.

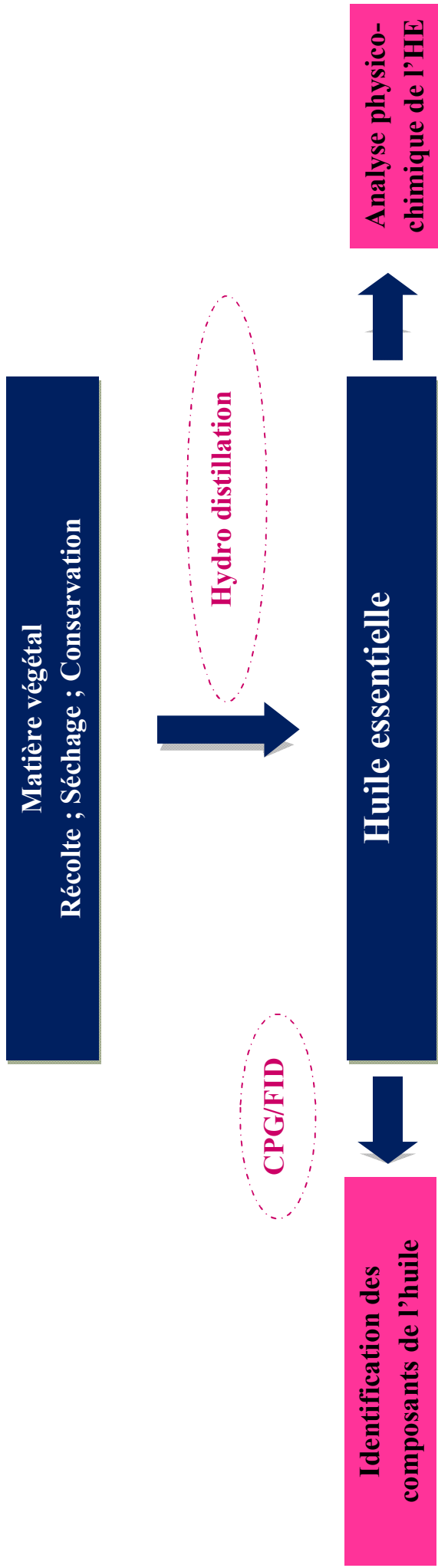


3.1.6. Conservation

Le matériel végétal est séché à température ambiante à l'air libre et à l'abri du soleil pendant quinze jours. Afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules, les parties aériennes ainsi obtenues sont conservées dans des flacons fermés hermétiquement en vue des expérimentations.



Figure 14: Préparation du matériel végétal



Etude du pouvoir Anti-oxydant

- Test de piégeage du radical libre DPPH

Etude du pouvoir anti-bactérien

- Bactéries Gram(-)
 - E. coli*
 - P. aeruginosa*
- Bactéries Gram(+)
- S. aureus*

Etude du pouvoir anti-fongique

- Champignon
 - Asp. niger*

Aromatogramme

Figure 15: Synoptique de l'obtention et de l'analyse de l'huile essentielle extraite à partir de *Mentha spicata*

3.2. Méthodes

3.2.1. Extraction de l'huile essentielle

3.2.1.1. Principe

L'huile essentielle de (*M. spicata*) est extraite par le procédé d'hydrodistillation, grâce à un appareil de type *Clevenger* qui est constitué d'un chauffe ballon permettant la distribution homogène de la chaleur, un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale séchée et l'eau distillée et une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant). Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. La vapeur saturée en huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner deux produits: l'eau florale et l'huile essentielle (**Tongnuanchan et Benjaku, 2014**).

3.2.1.2. Mode opératoire

- 100 g de la partie aérienne séchée de la plante est émiétée puis introduite dans un ballon à fond rond de 1 L.
- Une quantité suffisante d'eau distillée est ajoutée dans le ballon sans pour autant le remplir, pour éviter tous débordements lors de l'ébullition.
- À l'aide d'un chauffe ballon, le mélange est porté à ébullition pendant 3 h.
- Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation.
- Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans un collecteur. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière.
- L'huile ainsi obtenue est récupérée par décantation puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium (Na_2SO_4), pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. Elle est alors conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4 à 5°C).

3.2.1.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée (**AFNOR, 2000**). Le rendement (R) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R = \frac{P_h}{P_p} \times 100$$

Où P_h : Poids de l'huile essentielle en g
 P_p : Poids de la plante en g

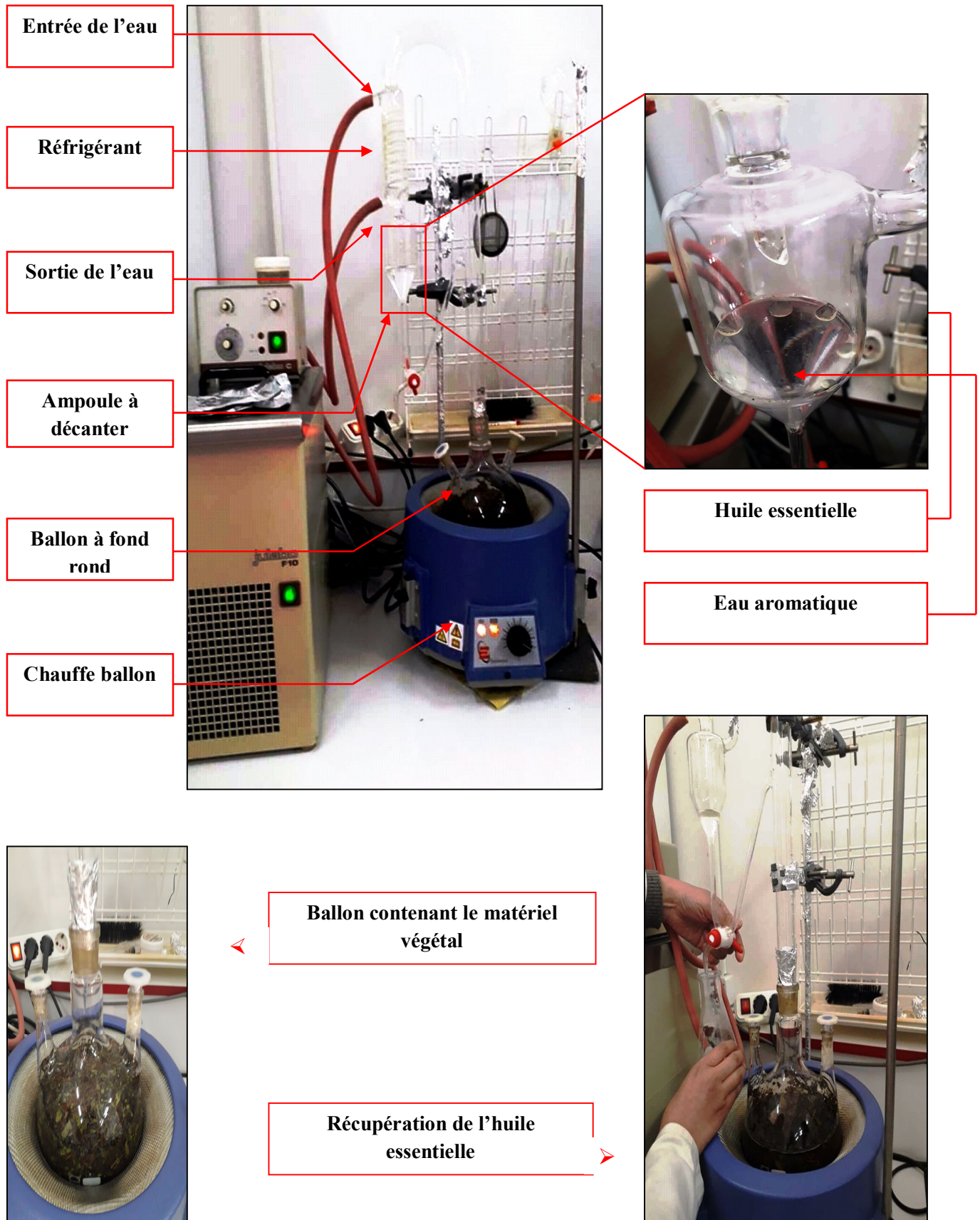


Figure 16: Galerie de photos résumant les étapes de l'hydro-distillation

3.2.2. Conservation des huiles essentielles

L'instabilité relative des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation délicate et indispensable. Trois facteurs interviennent dans l'altération des huiles essentielles :

1. La température : obligation de stockage à basse température (entre 4 °C et 8 °C).
2. La lumière : stocker dans l'obscurité et dans des flacons opaques, brun de préférence.
3. L'oxygène : les flacons doivent être hermétiquement fermés. Dans ces conditions la durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

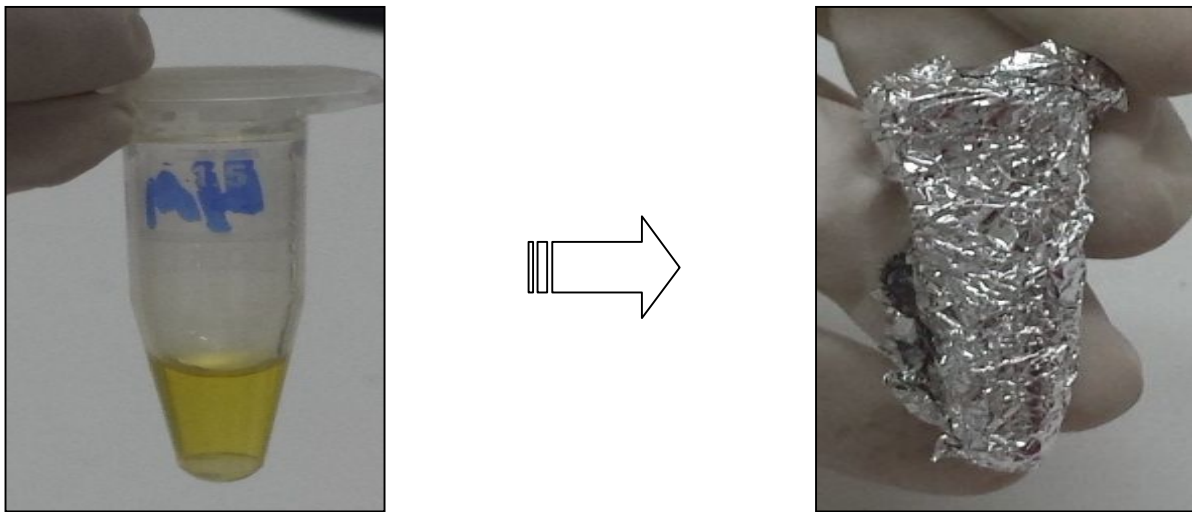


Figure 17: Méthode de conservation de l'huile essentielle

3.2.3. Détermination des propriétés physico-chimiques

3.2.3.1. pH

Le pH de notre huile essentielle est estimé par l'utilisation de papier pH.

3.2.3.2. Densité relative d₂₀

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile au poids du même volume d'eau distillée à la température de 20°C (AFNOR, 2000).

$$d^{20} = d_{\theta} + 0.00068 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

d²⁰	: Densité à 20°C.
d_θ	: Densité à la température de mesure
θ	: Température de mesure
0.00068	: Constant de variation de la densité quand la température varie de 1°C

3.2.3.3. Indice de réfraction

La mesure est effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque Atago. Après nettoyage de l'appareil, on place 2 à 3 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme, puis on note directement la valeur de l'indice et la température de mesure.



Figure 18: Réfractomètre ➤

Une formule empirique permet d'évaluer l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C quand on l'a mesuré à une température légèrement différente :

$$I_{20} = I_{\theta} + 0.00045 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

I₂₀	: Indice de réfraction à 20°C
I_θ	: Indice à la température de mesure
θ	: Température de mesure
0.00045	: Constant de variation de l'indice quand la température varie 1° C

3.2.4. Identification chimique des huiles essentielles

L'huile essentielle récupérée par hydro-distillation est analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID). Cette analyse est réalisée par le centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique (CRAPC), de Bous-Ismaïl, Tipaza.

3.2.4.1. Principe

La CPG s'est montrée être la méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile essentielle, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative. Elle est basée sur le principe de la chromatographie de partage (**Skoog et al., 2003**). La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte. L'éluion est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (H₂, N₂, He). La solution est injectée au moyen d'une seringue soit manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité. La séparation des composés dépend du type de colonne utilisée et de la polarité de la phase stationnaire.

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. La détection des

composés élués est obtenue par un détecteur FID (flamme ionisation detector). On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé. Dans le cas des huiles essentielles, le FID est le détecteur le plus cité dans la littérature (**Figueredo, 2006**).

Le pourcentage de composition de l'huile essentielle est calculé par intégration électronique des aires des pics FID. Pour chacun des composants, les indices de rétention sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

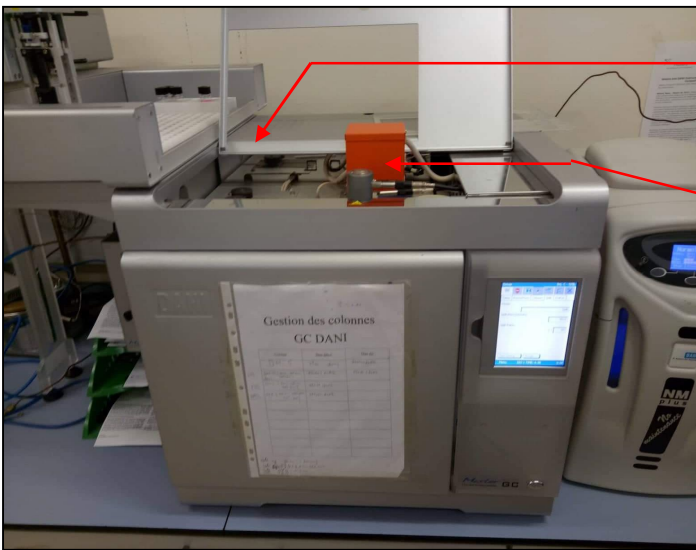
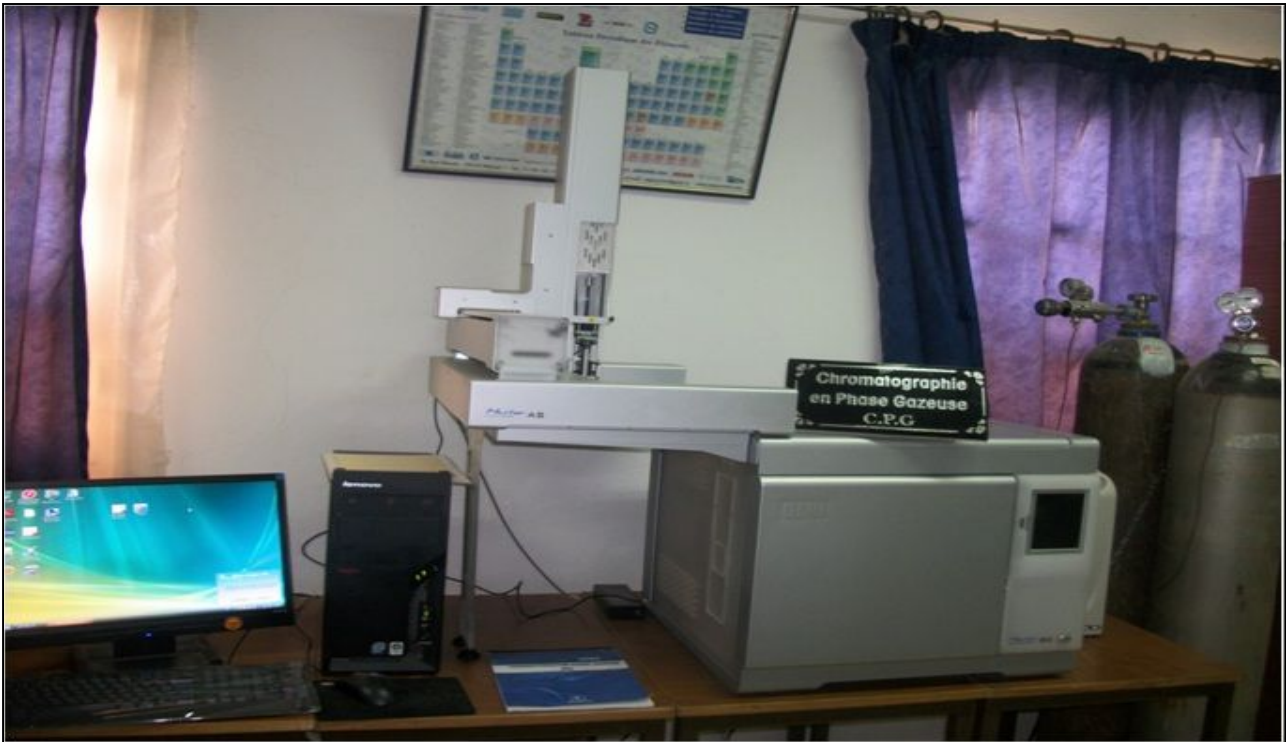
$$I_R = 100 \times \frac{(t_R)_i - (t_R)_n}{(t_R)_{n+1} - (t_R)_n}$$

I_R	: Indice de rétention du soluté considéré
(t_R)_i	: Temps de rétention du soluté considéré
(t_R)_n	: Temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté
(t_R)_{n+1}	: Temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic sort après celui du soluté
n et n+1	: nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcane)

3.2.4.2. Condition opératoires

Tableau 4: Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse

Chromatographe	GC MASTER DANI	
Durée d'analyse	103 minutes	
Injecteur	température	250°C
	Volume	0.2µl
	Mode d'injection	Split 1/50
Vecteur	Gaz vecteur	Azote
	Débit	0.5 ml/min
Colonne	Type	HP-5MS
	Longueur	30 m
	Diamètre interne	0.25 mm
	Épaisseur de phase	0.25 µm
	Phase stationnaire	5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane
T°C du Four	Programmation 1	8 min à 60°C
	Programmation 2	2°C/min jusqu'à 240°C
	Programmation 3	5 min à 240°C
Ejecteur	Type	FID : détecteur à ionisation de flamme
	Température	270°C

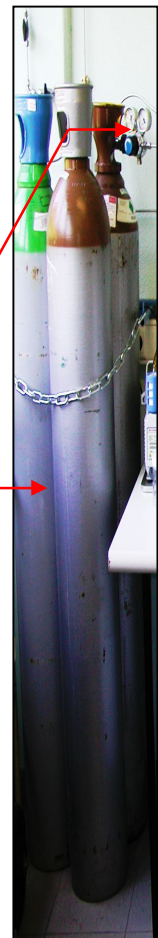


Injecteur

Détecteur

Régulateur de pression

Gaz vecteur



Enregistrement du signal

Enceinte thermostatée

Colonne

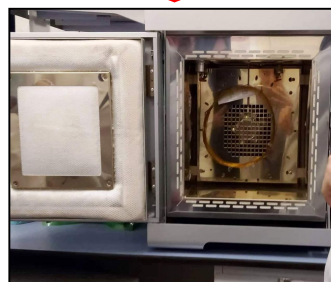


Figure 19: Galerie de photos résumant les étapes de chromatographie en phase gazeuse

3.2.5. Etudes des activités biologiques

Afin d'évaluer la qualité thérapeutique de notre huile essentielle, nous proposons de tester *in vitro* ses effets antioxydants et antimicrobiens.

3.2.5.1. Evaluation de l'activité antioxydante par un test de piégeage du radical libre DPPH

La méthode DPPH est largement utilisée en raison de sa simplicité et de la stabilité des résultats (Brand-Williams *et al.*, 1995).

3.2.5.1.1. Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Takao *et al.*, 1994 ; Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Yen et Chien-Ya, 2000). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de composés phénoliques. Le radical synthétique DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie à l'antioxydant. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (Molyneux, 2004).

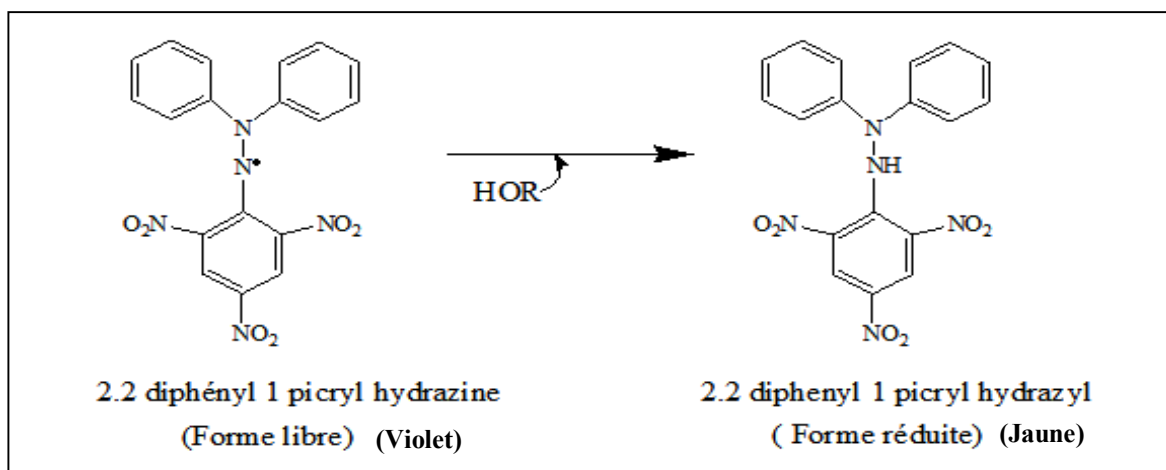


Figure 20: Réduction du radical DPPH• par un antioxydant

La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue, généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale

de DPPH (IC₅₀). On pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent, le BHT.

3.2.5.1.2. Mode opératoire

La capacité de notre huile essentielle à piéger le radical libre DPPH est évaluée en utilisant la méthode décrite par **Yen et chien-Ya (2000)**, suivi du calcul de l'IC₅₀ et de l'indice de l'activité antioxydante (AAI) (**Scherer et Godoy, 2009**). Le BHT est utilisé comme contrôle positif.

- On prépare une solution mère de l'huile essentielle dans le méthanol à une concentration 2mg/ml. Une série de dilution en progression géométrique à raison de 2 est réalisée pour obtenir des concentrations allant de (1 à 0.03 mg/ml).
- 100 µl de chaque solution sont mélangés avec 02 ml d'une solution méthanolique de DPPH préparée préalablement.
- Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances sont mesurées à 517 nm. L'essai est répété trois fois pour chaque concentration.
- Le contrôle négatif est composé de 2ml de la solution méthanolique au DPPH avec 100 µl de méthanol.

3.2.5.1.3. Expression des résultats

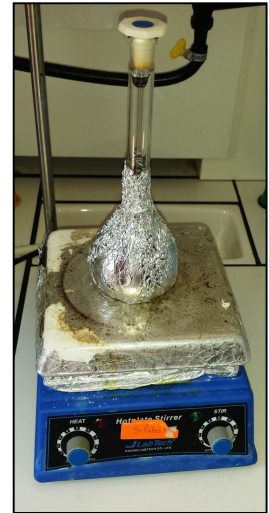
L'activité antioxydante : est exprimée comme le pourcentage d'inhibition, calculé en utilisant l'équation suivante :

Activité Antioxydante (%) = [1-(A échantillon/A contrôle négatif)] x 100	
A contrôle	l'absorbance du control négatif
A échantillon	l'absorbance de l'huile essentielle

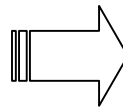
La concentration inhibitrice (IC₅₀) : Elle est calculée à partir du graphe de l'activité antioxydante (en %) en fonction des concentrations testées. Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH.

L'indice de l'activité antioxydante (AAI) : est calculé selon l'équation suivante :

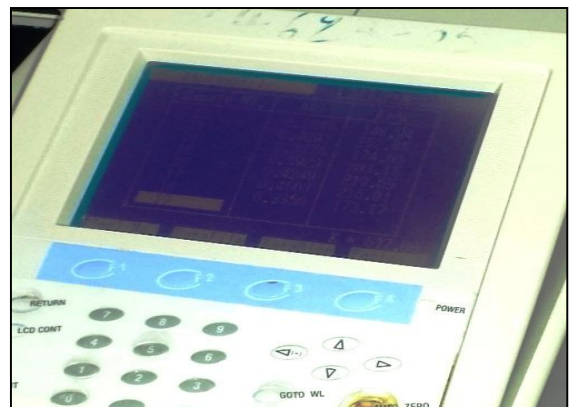
AAI = concentration finale de DPPH (µg/ml) / IC50 (µg/ml).	
AAI < 0.5	→ faible activité antioxydante
1 > AAI > 0.5	→ activité antioxydante modérée
2 > AAI > 1	→ forte activité antioxydante
AAI > 2	→ très forte activité antioxydante



Préparation de DPPH



Réaction de DPPH avec les dilutions de l'HE, déposé 30 min à l'obscurité



Lecture de la densité optique à 517 nm

Figure 21: Galerie de photos résumant le test de piégeage du radical libre DPPH

3.2.5.2. Mesure de l'activité antimicrobienne de l'HE de la Menthe

3.2.5.2.1. Activité antibactérienne

Souches bactériennes testées

Le test est effectué sur un total de 06 souches bactériennes présentant un risque pathogène du niveau 2 sur une échelle de 4, dont 03 souches de références ATCC et 03 autres d'origine clinique, fournies aimablement par les collections du laboratoire de microbiologie (équipes du Dr. Mechai et Dr. Azizi respectivement).

Tableau 5 : les souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE

Bactéries	Gram	Famille	Origine
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriaceae	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriaceae	Clinique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	Clinique
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcaceae	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcaceae	Clinique

Conservation des souches

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur la gélose nutritive (GN). Incubées pendant 24 h à 37 °C, elles sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant de la gélose nutritive incliné.

Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne est préparée à partir des cultures pures : à l'aide d'une anse de platine on racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. On décharge l'anse dans 05 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl et on homogénéise la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex.

Etude de la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis l'HE de Menthe

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques (Dayal et Purohit, 1971), inspirée de celle des antibiogrammes (Tharib *et al.*, 1983). Généraliser pour les huiles essentielles et autres types d'extraits, l'aromatogramme est

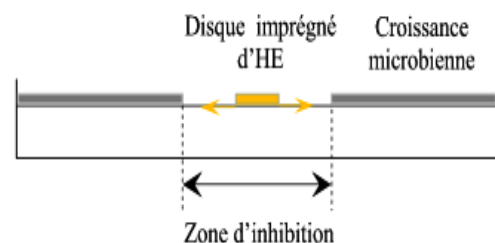
devenue une méthode d'évaluation qualitative *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles **Gulluce et al. (2007)**.

Notre huile essentielle est testée sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées, d'une part à l'état brut (pour la méthode des disques) et d'autre part à l'état dilué (pour la détermination de CMI). Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats: la densité de l'inoculum, la température et le temps d'incubation, la concentration du produit à tester, la composition du milieu de culture ainsi que l'épaisseur de la gélose (**Guerin-Fauble et Carret, 1999**).

Mode opératoire

- **Ensemencement** : Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH est coulé aseptiquement à raison de 20 ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.
- **Application des disques** : Des disques de papier Whatman N°1 stérilisés de 6 mm de Ø sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile puis imprégnés d'un volume de 10 µl d'huile essentielle. Un autre disque sec est déposé comme contrôle négatif.
- **Incubation** : toutes les boîtes pétries sont incubées inversés à l'obscurité dans une étuve à une température de 37 °C pendant 24 heures.
- **Expression des résultats**

Après la période d'incubation, l'effet de l'agent antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone claire autour du disque en millimètres (zone d'inhibition où les microorganismes testés n'ont pas poussés).

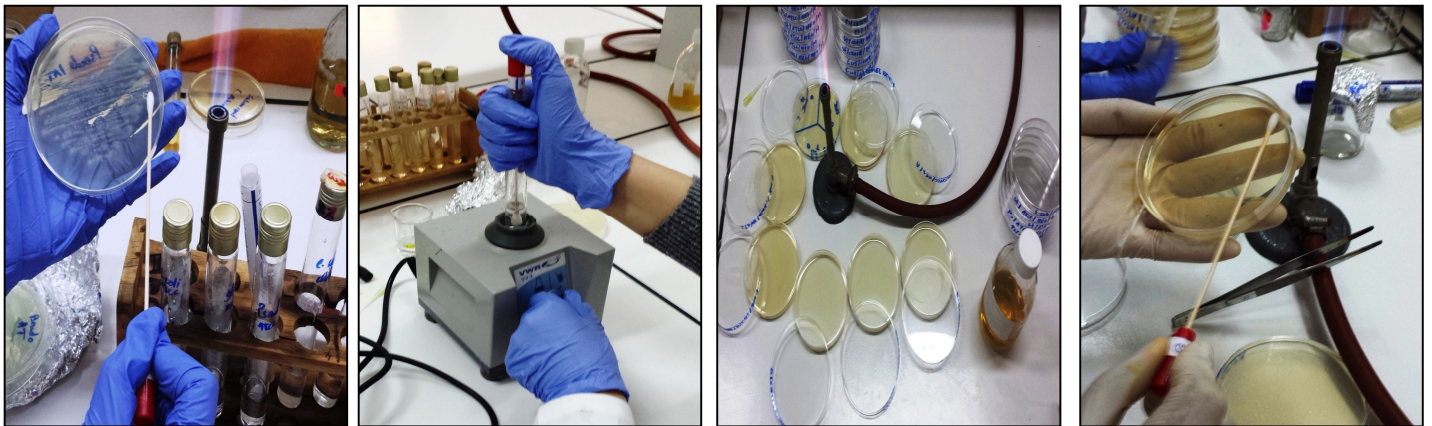


En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

Etape 1	Le repiquage
---------	--------------



Etape 2	L'inoculum	Etape3	Ensemencement
---------	------------	--------	---------------



Etape 4	L'aromatogramme		
---------	-----------------	--	--

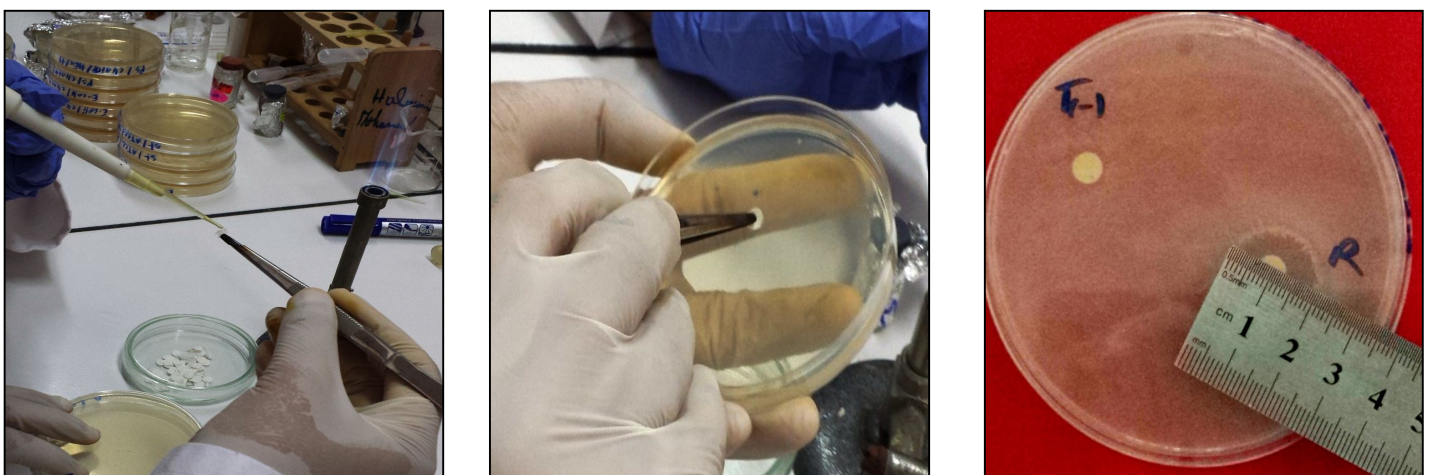


Figure 22: Galerie de photos résumant les étapes de l'aromatogramme

Détermination des valeurs de CMI par la méthode de dilution par gélose

Principe

Cette technique a été effectuée par Baron et Bruckner 1984. Elle consiste à disperser de façon homogène l'agent antimicrobien en concentration variable dans le milieu de culture. Une fois définies, les bactéries sont appliquées sur sa surface. Les boîtes sont incubées pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange (extrait / agar) est marquée soit présente ou absente.

La CMI est alors définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées (**Wilkinson, 2006; Balouiri et al., 2016**).

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les huiles essentielles qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture gélosés ou liquides. Ce problème est résolu en partie par l'utilisation d'émulsions d'huiles essentielles dans des solutions de détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 (**Allegrini et al., 1973**) ou de solvant comme l'éthanol et le DMSO (**Drugeon et al., 1990**).

Mode opératoire

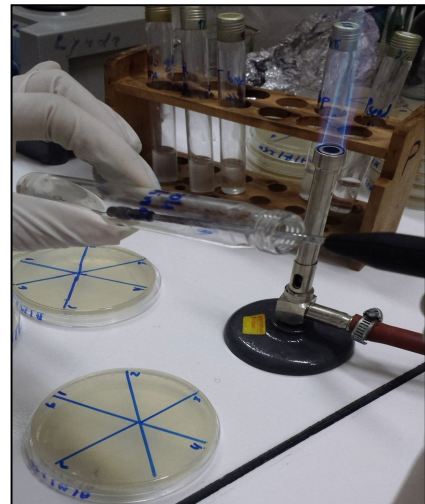
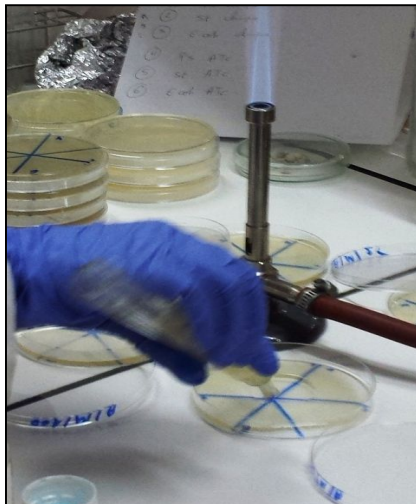
- Diluer notre HE à des concentrations variables (25, 50, 100 et 250 µl dans 500 µL de DMSO).
- Chacune des dilutions est incorporée avec 19.5 ml de milieu Muller Hinton maintenu en surfusion. Les concentrations finales de l'HE dans le MH sont respectivement (2.5, 5, 10, 25 µl/ml).
- Après homogénéisation, le mélange est réparti dans des boîtes de pétri, une fois solidifié et à l'aide d'une anse de platine en étale par strie l'inoculum bactérien utilisé préalablement. L'opération est incubée 24 h à 37 °C.

Détermination de la nature de l'activité antibactérienne (bactéricide/bactériostatique)

Le rapport **CMI/CMB** nous permet de déterminer la nature de l'activité antibactérienne de notre HE. La CMB représente la plus faible concentration d'HE inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 05 jours d'incubation à 37°C (**Mayachiew et Devahastin, 2008**).

Lorsque le rapport est supérieur à 4, l'HE a un pouvoir bactériostatique, soit bactéricide quand est alors inférieur ou égal à 4 (**Canillac et Mourey, 2011**).

Etape 1	Préparation de milieu de culture
----------------	-----------------------------------------



Etape 2	Ensemencement des souches bactériennes, conservation et résultat
----------------	-------------------------------------------------------------------------

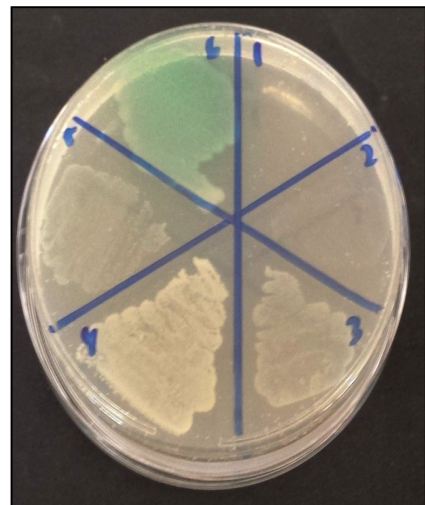
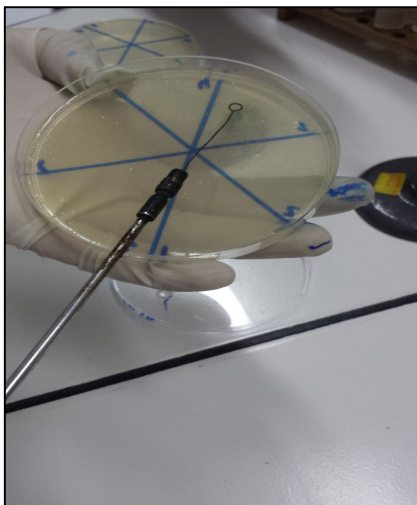


Figure 23: Galerie de photos résumant les étapes de la dilution par gélose

3.2.5.2.2. Activité antifongique

Souche fongique

L'*Aspergillus niger*, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes. La souche nous a été fournie par Dr. Belhadj du laboratoire de microbiologie (Université Larbi Tebessi).

Milieux de culture et inoculum

La souche a été d'abord recueillie sur gélose sabouraud pendant une semaine, puis un repiquage d'un disque mycélien de la culture pure précédente, au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA: milieu pour la conservation et l'étude de la sensibilité des champignons vis-à-vis notre huile essentielle. La boîte sera incubée à 28 °C pendant 5 à 7 jours.

Technique de dilution en milieu solide

Principe : La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antifongique (HE) dans un milieu gélosé à des concentrations variables, suivie de l'ensemencement d'un inoculum fongique défini à la surface de la gélose dans le but de déterminer le taux d'inhibition (**El Kalamouni, 2010**).

Mode opératoire : L'activité antifongique de huile essentielle est testée contre *l'aspergillus niger* par la technique de contact direct (**Singh et al., 2008**).

- L'huile essentielle est préparée par dilution de 10, 20, 30, 40 et 50 µl dans 500 µl de DMSO.
- Des concentrations finales de 1, 2, 3, 4, et 5 µl/ml de l'huile essentielle est obtenue par addition de 0.5 ml de solutions préalablement préparées dans un tube contenant 9.5 ml du milieu PDA à une température comprise entre 45 et 50°C.
- Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes est coulé dans des boîtes de Pétri. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.
- Une boîte de Pétri contenant 10 ml de milieu PDA sans huile essentielle est utilisée comme contrôle négatif.

Inoculation

Un disque mycélien de 5 mm de diamètre, coupé de la périphérie de la pré-culture de 5 jours, est inoculé de manière aseptique dans le centre de chaque boîte de Pétri.

Incubation

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées puis incubées à 28 °C pendant 9 jours.

Expression des résultats

L'efficacité du traitement est évaluée quotidiennement pendant neuf jours en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

□ **Le pourcentage d'inhibition** de la croissance par rapport au témoin, est calculé au jour 9, en utilisant la formule suivante (**Albuquerque *et al.*, 2006**).

$$\% \text{ d'inhibition mycélienne} = [(dc-dt)/dc] \times 100$$

dc : le diamètre de la croissance mycélienne du contrôle négatif

dt : le diamètre de la croissance mycélienne en présence du traitement à l'huile essentielle

□ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)** : la plus faible concentration en huile essentielle qui a complètement inhibé la croissance du champignon après neuf jours d'incubation est considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Etape 1	Le repiquage
----------------	---------------------



Etape 2	Inoculation d'un disque mycélien sur PDA contenant des concentrations différentes de l'huile essentielle
----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------

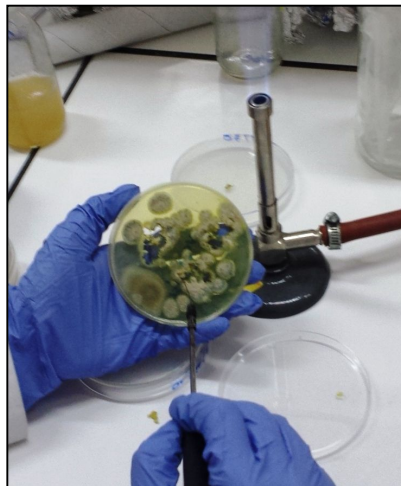


Figure 24: Galerie de photos résumant l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle

Chapitre 4

Résultats et Discussion

4.1. Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

L'extraction par hydro-distillation réalisée sur un échantillon de 600g de Menthe sèche nous a fournis une huile essentielle liquide limpide à température ambiante, très aromatique avec une odeur fraîche caractéristique et de couleur jaune.



Figure 25: Aspect de l'huile essentielle de *Mentha spicata* L.

Tableau 06: Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle extraite à partir de *Mentha spicata*

Propriétés	Valeurs obtenues	NormeAFNOR
Rendement (%)	0.58	0.38-1.2
pH	6	5-6
Densité (g/cm ³)	0.84	0.820-0.990
Indice de réfraction	1.46	1.484-1.491

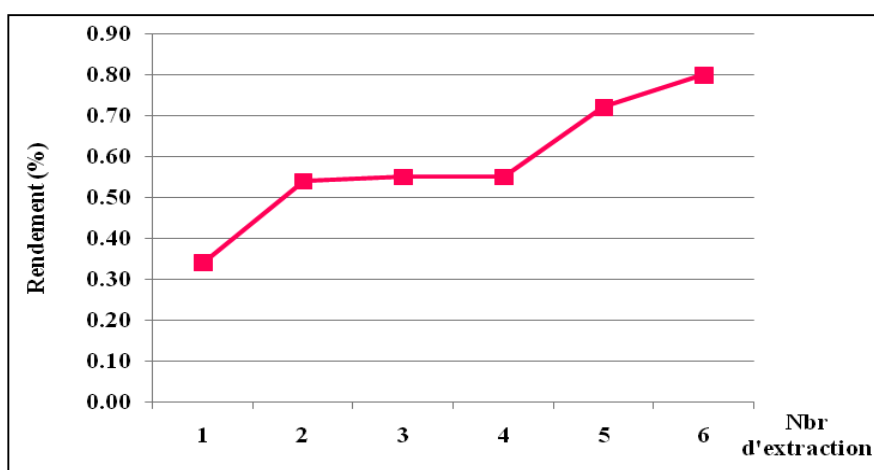


Figure26 : Rendement en huile essentielle de *Mentha spicata* obtenue par hydro-distillation

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indicateurs permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés

ne donnent que des informations très limitées sur les essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La densité relative et l'indice de réfraction sont des paramètres d'identification qualitative très importants permettant d'évaluer la pureté des huiles essentielles (Hellal, 2011). Les résultats obtenus sont semblables aux valeurs obtenus par Ayadia (2011). Les caractéristiques organoleptiques et les propriétés physicochimiques de l'échantillon analysé oscillent dans des intervalles comparables aux normes, témoignant ainsi la bonne qualité de notre huile essentielle (AFNOR).

Le rendement moyen en huile essentielle, calculé en fonction de la matière végétale sèche, a fourni un taux d'environ 0.58%. Cette valeur est conforme avec les normes AFNOR comprise entre 0.38 et 1.2% et semblable aux valeurs obtenues par Zao et al. (2013), mais reste relativement inférieure à celui obtenu par Senoussi et al. (2015) ; Laggoune et al. (2016) et Hadj Ahmed et al. (2017) qui sont de 1.1%, 2.1% et 3.03% respectivement.

Cette différence est peut être attribuée à plusieurs facteurs citons parmi lesquels les conditions climatiques et environnementales, la situation géographique, la période de la cueillette, la durée de séchage et le procédé d'extraction (Silano et Delbò, 2008 ; Marzoukia et al., 2009; Jamshidi et al., 2009 ; Bousbia et al., 2009 ; Aprotosoia et al., 2010; Olle et Bender, 2010 ; Zaouali et al., 2010 ; Ojeda-Sana et al., 2013). D'après (Lagunez Rivera, 2006) l'hydrolat contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu récupérer ce qui peut fausserait le rendement.

4.2. Etude de la composition chimique de l'HE de *Mentha spicata* L.

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature, et est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), malheureusement, pour des raisons techniques, on a pu réaliser une CPG/FID uniquement. Pour chacun des composants, les indices de rétention sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane. L'ensemble des résultats est indiqués dans le **tableau 07**

Suite à l'analyse chromatographique, plus de trente composés sont identifiés. Nous constatons que notre échantillon est riche en monoterpènes et sesquiterpènes parmi les quelles on peut citer : le menthol, limonène, α -terpinéol, etc. plusieurs cétones sont retrouvées dans notre huile essentielle comme le carvone, le pulgone, la menthone etc. Le chimotype d'une huile

essentielle varie d'une région à l'autre, le composé prédominant dans notre essence est le Carvone(20,7%).

Notre huile essentielle possède une composition chimique proche à celle rapportée par **Laggoune et al. (2016)** de Ghardaïa, **Taoudait et (2016)** de Tizi-Ouzou et **Hadj Ahmed et al. (2017)** de Ain Defla, mais avec des pourcentages nettement inférieurs.

Sokovic et Griensven (2006) ont également rapporté que le carvone (49,52%), le menthone (21,92%), le linalimène (5,77) et le 1,8-cinéole (3,06%) étaient les principaux composés identifiés dans l'huile essentielle de *M. spicata* du Monténégro.

Tableau07 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* de la région de berrahel -Annaba-

N°	R (min)	IR	Constituant
1	13.793	1025	Limonène
2	14.260	1033	Cinéol 1,8
3	15.213	1047	(Z)- β -ocimène
4	16.877	1073	Cis-sabinène hydrate
5	17.107	1076	Mentha-2.4(R)-diène<p->
6	18.653	1091	Linalool
7	20.783	1130	Terpèneol<1->
8	21.000	1133	Mentha-2,8-dien-1-ol <cis-p->
9	21.360	1138	Cis-limonène oxide
10	22.077	1148	Menthone
11	22.830	1159	Terpèneol<trans- β ->
12	23.513	1168	Menthol
13	27.553	1225	Pulegol
14	30.620	1269	Thujanolacétate<iso-3->
15	31.320	1279	Méthyl benzylprnpanoate<u->
16	32.320	1293	Isomenthone<2-ethyl->
17	32.787	1300	Terpénylacétate<trans-dihydro- α ->
18	34.437	1324	Mentha-1, 4-dien-7 -ol<p>
19	35.380	1338	Indanol<5->
20	36.363	1353	Carvone
21	45.940	1433	Thujopsène<cis->
22	43.930	1469	Sesquicénone<dehydro->
23	44.350	1475	Isobornyl n-butanoate
24	45.203	1488	Méthylbiphényle<4->
25	45.607	1495	Bicyclogermacène
26	46.237	1505	Bisabolène<(Z)- α ->
27	46.700	1513	Germacène A
28	47.390	1524	Cis calaménène
29	49.970	1567	Carvotan acétone <8-acétoxy->
30	51.143	1586	Oxyde de caryophyllène
31	53.487	1626	Benzophénone
32	57.497	1697	Sesquicénone-2-one

33	58.753	1720	Hepta- 1,3,5-triène < 1 -phényl->
34	60.947	1760	Bisaboladien-12-ol <2,7(14)->

Comparativement aux huiles essentielles originaires d'Algérie, **Rasooli et al. (2008)** ont signalés que l' α -terpinène (19,7%) et la pipéritone (19,3%) sont les principaux composants. En fait, il existe une grande variation dans la composition chimique des *M. spicata*, sauvage et cultivé, dans le monde entier. En effet, une série de chimotypes ont été décrits dans des études antérieures, avec prévalence de pulegone, carvone, linalol, pipéritone, pipéritoneoxyde, menthone (**Baser et al., 1999 ; Telciet al., 2004 ; Telciet al., 2010**).

En Europe, les huiles essentielles riches en carvone sont largement utilisées comme épices dans les industries des arômes et des parfums (**Telciet al., 2004**). D'autres espèces de *Mentha*, comme *M. longifolia*, *M. suaveolens* Ehrh. (**Kokkini et al., 1995**) *M. viridis* L. (**Mkaddem et al., 2009**) et *M. Haplocalyx* Briq. (**Chou et Zhou, 1998**) sont caractérisés par la prévalence de carvone et de limonène.

Plusieurs études récentes ont montré que la variabilité de la composition et du rendement en huile essentielle est due à des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces et âge de la plantation) ou à des facteurs extrinsèques comme le climat et les conditions de culture (origine géographique) ou à la méthode d'extraction (**Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004**)

4.3. Evaluation de l'activité antioxydante, teste de piégeage du radical libre DPPH

Le dommage oxydatif peut avoir des effets indésirables sur les aliments tels que la production d'odeurs et de saveurs rances qui peuvent réduire la durée de vie, la qualité nutritionnelle et la sécurité des produits alimentaires. Afin de réduire le risque de détérioration par oxydation, des antioxydants synthétiques sont ajoutés à de nombreux produits alimentaires. Cependant, en raison de problèmes de sécurité et de la demande des consommateurs, il existe un intérêt considérable pour le remplacement des antioxydants synthétiques par des alternatives à base de végétaux (herbes et épices notamment). Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales (**Yanishlieva et al., 2006**).

L'activité antiradicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH qui s'accompagne par le passage de la

couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. A des fins comparatives un antioxydant standard a été utilisé : le BHT. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes exponentielles illustrées dans la figure 27.

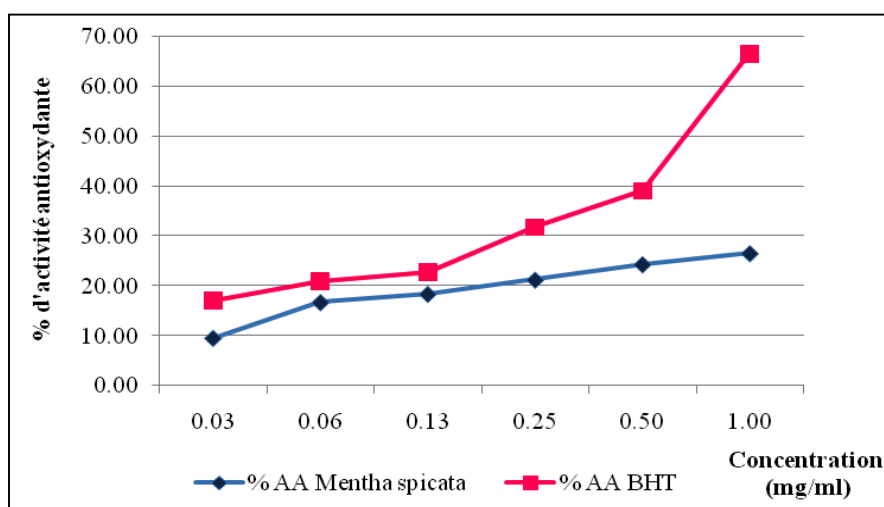


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de l'HE et BHT

On constate que l'huile essentielle exerce une activité inhibitrice modeste et reste significativement inférieure ($P = 0.05$) par rapport au BHT.

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur de l' IC_{50} , qui est défini comme la concentration de substrat qui cause une perte de 50% de l'activité DPPH, plus cette valeur est petite, l'extrait possède une bonne activité antioxydante. Les résultats sont rapportés dans le **tableau 08**

Tableau 08 : Résultats IC_{50} de l'huile essentielle *Mentha spicata* et le BHT

Extrait	IC_{50} (mg/ml)
Huile essentielle	30.66 ± 0.04
Antioxydant standard	0.6152 ± 0.14

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité, simplicité de l'analyse et sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (**Bozin et al., 2008**). L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (**Maisuthiasakul et al., 2007**).

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en substrat, et ce pour l'huile essentielle ainsi que le BHT. Plus précisément, l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage

d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Znini *et al.*, 2011 ; Martins, 2012).

La capacité antioxydante d'une huile essentielle est largement dépendante des constituants phénoliques (Nieto *et al.*, 2011). De nombreuses épreuves ont été rapportées dans la littérature pour expliquer la relation structure-activité de certains composés naturels (Es-Safi *et al.*, 2006). Il a été proposé que l'activité antioxydante est en relation avec le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau des flavonoïdes (Es-Safi *et al.*, 2006 ; Sawaet *et al.*, 2009).

D'autres études mettent en avant le fait que les meilleurs antioxydants naturels montrent une grande activité par synergie entre les composants pour créer un spectre large et donc un système de défense efficace contre les attaques de radicaux libres (Chauhan *et al.*, 2011).

Le profil d'activité antiradicalaire obtenue révèle que notre huile essentielle est moins efficace et inférieure à celui de l'antioxydant standard, avec des valeurs d'IC₅₀ égale à 30.66 et un indice d'activité inférieur à 0,5.

4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans la mesure où les huiles essentielles vont être soumises aux essais biologiques, l'utilisation d'un solvant approprié est primordiale. Effectivement, la toxicité du solvant vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques peut être critique. Même à l'état de trace le solvant ne devrait pas entraver la procédure du test biologique. Une attention particulière devrait également être accordée aux interactions possibles entre le solvant et les solutés, car le solvant peut réagir avec certains composés de l'huile essentielle et causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Dans cette étude, notre choix s'est porté sur le diméthylsulfoxyde (DMSO), fréquemment utilisé dans les études en microbiologie. Il a subi un test préliminaire dans le but de connaître leur effet vis-à-vis l'huile essentielle et les souches microbiennes testées. Il s'est avéré sans danger pour les microorganismes et n'interfererait donc pas dans la lecture des résultats et en plus il n'a engendré aucune cristallisation ou décomposition de HE.

4.4.1. Activité antifongique

Les moisissures ont de multiples effets sur la santé, leur développement dans l'environnement incite à les surveiller. Beaucoup d'*Aspergillus* sont responsables de la production de mycotoxines comme les aflatoxines, potentiellement hépato-carcinogènes chez les humains et les animaux (Williams *et al.*, 2004).

L'interprétation des résultats est basée sur la mesure de la poussé fongique. Cette lecture est effectuée par comparaison avec une boite témoin réalisée dans les mêmes conditions que les boites à tester.

La figure28 démontre la croissance mycélienne (mesure journalière du diamètre (mm)) en fonction de la concentration en HE et la période d'incubation.

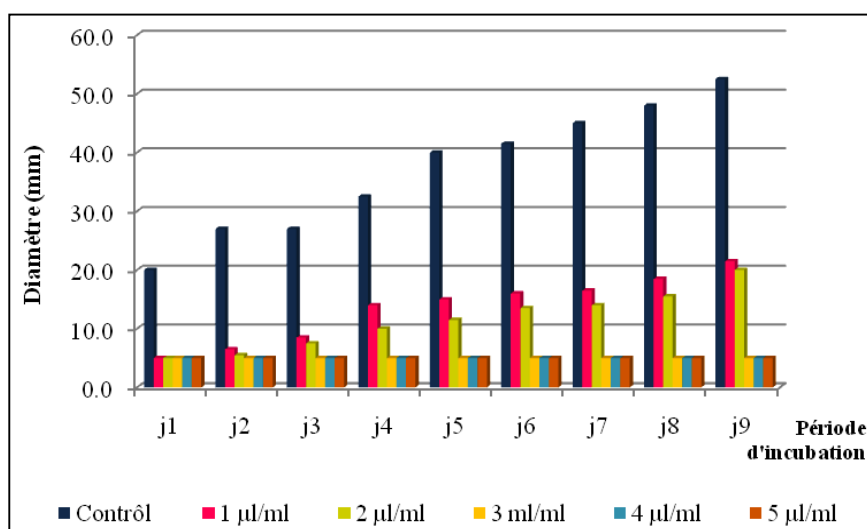


Figure28 : Effet de l'huile essentielle sur la croissance de *Aspergillus niger*

L'analyse des résultats montrent une croissance mycélienne considérable en fonction du temps d'incubation dans la boite témoin. En revanche, la croissance est réduite considérablement voir inhibé à partir de la concentration 03 µl/ml en HE. Ces résultats corroborent les travaux de (Sokovic, 2009).

Pour mieux appréhender l'effet antifongique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*, un tableau des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction des concentrations a été réalisé.

Tableau 09 : Pourcentage d'inhibition mycélienne

Concentration (µl/ml)	Pourcentage d'inhibition mycélienne (%)
1	64.90
2	70.40
3	100.0
4	100.0
5	100.0

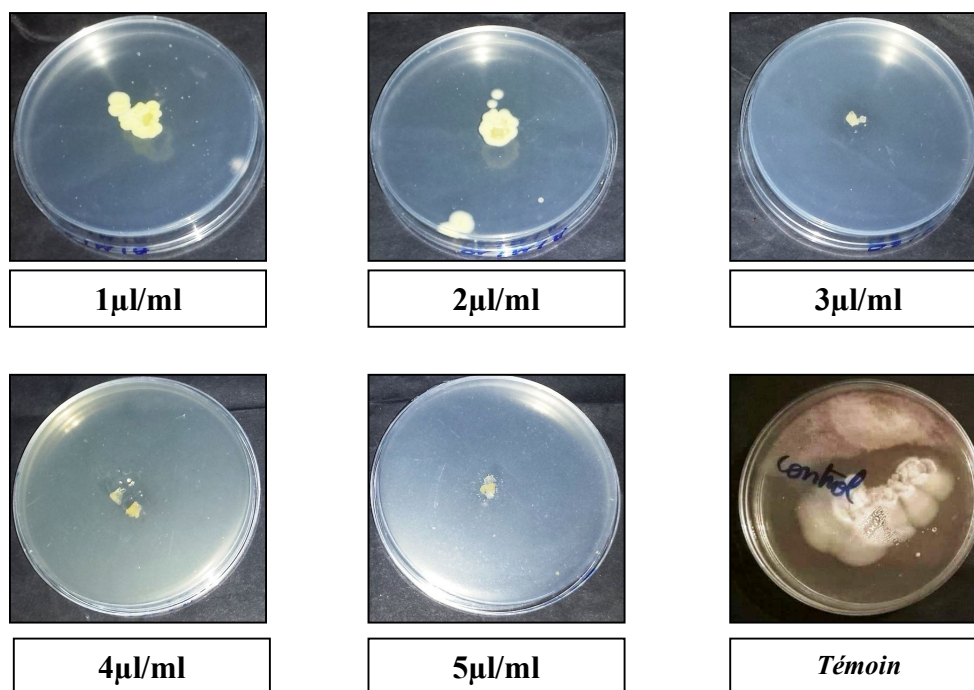


Figure 29: Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne. Ces produits chimiques sont également connus pour posséder des propriétés cancérogènes, tératogéniques, oncogènes et génotoxiques (Nagendra *et al.*, 2010). La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'Ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (Chami, 2005) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Prasad et Kapoor, 2004 ; Nagendra *et al.*, 2010). Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (Bakkali *et al.*, 2008). Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile essentielle de Menthe. De même, nos résultats prouvent l'existence de cette activité.

La diminution de la croissance mycélienne est peut être due à leurs teneurs élevés en molécules terpéniques. Récemment, plusieurs chercheurs ont rapporté que les terpénoïdes et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux des huiles essentielles ; ces composés ont un potentiel inhibiteur fort sur des souches microbiennes pathogènes (Gudzic *et al.*, 2002;

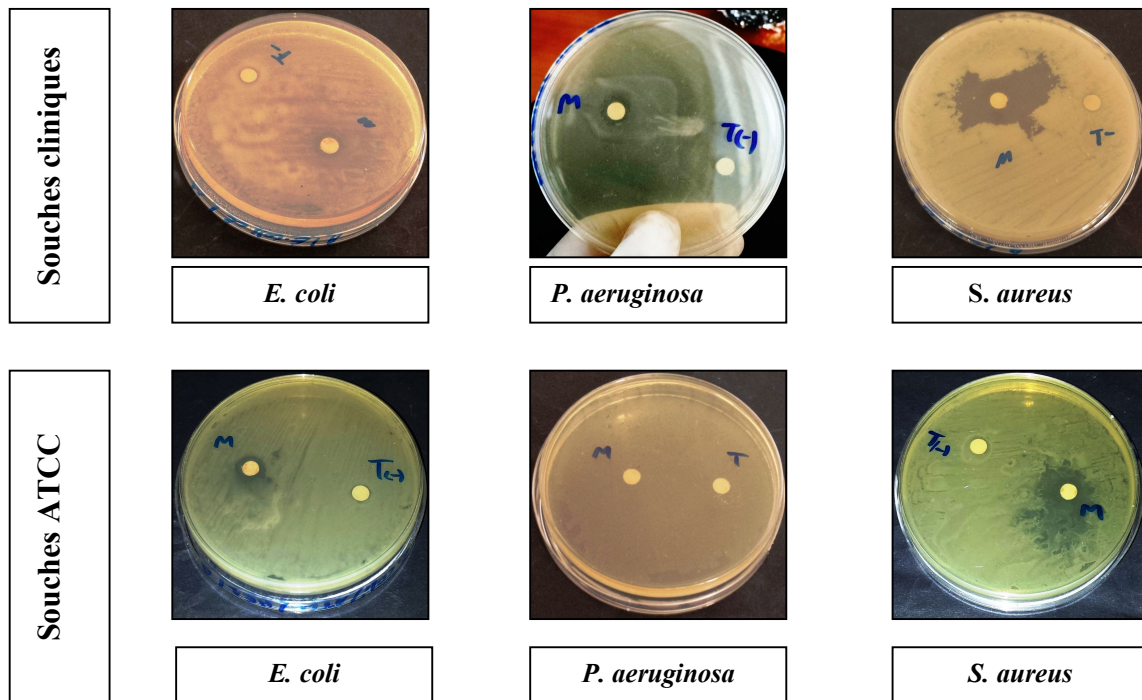


Figure 30 : Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha spicata*.

A l'issue des résultats obtenus dans le tableau 11 il ressort que les bactéries examinées sont sensibles à l'huile pure. Ces germes ont une sensibilité relative vis-à-vis les dilutions préparées.

Tableau11 : Détermination de la CMI de l'huile essentielle de *Mentha spicata* sur les souches testées.

N	Bactérie	G	origine	2.5 µl/ml	5 µl/ml	10 µl/ml	25 µl/ml	CMB µl/ml	CMB/ CMI
1	<i>P.aeruginosa</i>	-	Clin	-	-	-	-	5	2
2	<i>S. aureus</i>	+	Clin	-	-	-	-	5	2
3	<i>Ecoli</i>	-	Clin	++	+	-	-	10	1
4	<i>Ecoli</i>	-	ATCC	+++	++	-	-	10	1
5	<i>S. aureus</i>	+	ATCC	++	+	-	-	10	1
6	<i>P.aeruginosa</i>	-	ATCC	+++	+++	++	+	> à 25	ND

ND : non définit

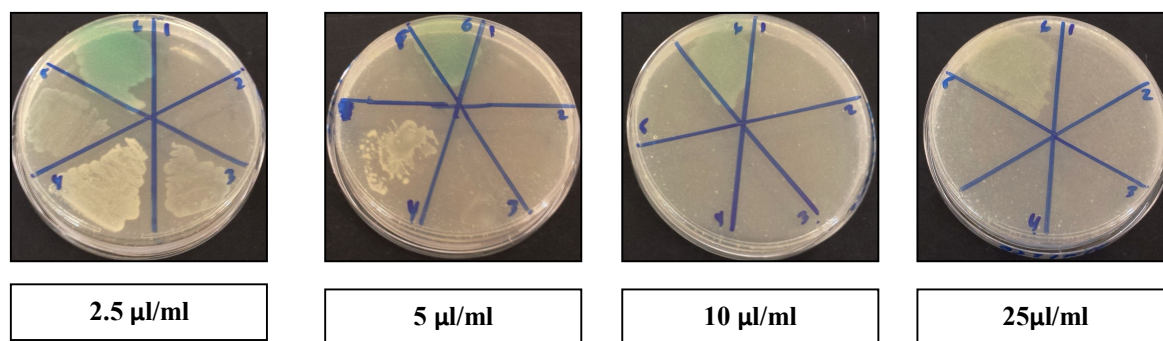


Figure 31 : Galerie de photos présentant le résultat du test de détermination de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testées

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Ce rapport est égale à (1 et 2) soit inférieur à 4 chez cinq souches étudiées, notre huile essentielle semble exercer une action bactéricide. Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par (Scherer, 2013). Selon le même auteur, la difficulté de diffusion des composés de l'huile essentielle à travers le milieu qui a un caractère polaire explique le faible diamètre du halos d'inhibition permettant d'enregistrer des résultats plus probant par la détermination de la CMI.

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (Dorman et Deans, 2000), cela permet de confirmer les résultats obtenu.

La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. Les groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes contre un grand nombre de bactéries Gram positives et Gram négatives (Dorman et Deans, 2000). Notre huile essentielle contient effectivement le terpinyl d'acétate. Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère

lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels (**Kalemba et Kunicka, 2003**) notre huile s'est avérée riche en thujopsène, bisabolodien-4ol et limonène, menthol et menthone.

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits de menthe possèdent des propriétés antibactériennes (**Elgayyarvet al., 2001 ; Ziniet al., 2011 ; Zaidi et Dahiya, 2015**) permettant de déduire que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est différente selon les variations régionales et saisonnières.

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

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema et al., 1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (**Carson et al., 2002; Ultee et al., 2002**) et un blocage de la phosphorylation oxydative qui représente la source de la vie respiratoire (**Rhayour, 2002**). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

L'ensemble des études montre que les menthes possèdent un réel potentiel antibactérien. De fortes concentrations de carvone peuvent être utilisées pour expliquer l'usage traditionnel d'huiles essentielles de *M.spicata* dans le traitement de maladies bactériennes. L'augmentation des résistances aux antibiotiques et des maladies infectieuses, associées aux effets indésirables des antibiotiques place l'huile essentielle comme une bonne alternative au traitement allopathique. Cependant, de nouvelles études sont à mener pour mieux comprendre les bases scientifiques de la phytothérapie appliquée (**Boukhebt 2011**).

Conclusion

Conclusion

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter divers maladies. Ces végétaux ont l'avantage d'être constitués d'un éventail de composés potentiels, de structures chimiques variées ayant de nombreuses activités biologiques. Actuellement, le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement dans les plantes aromatiques et médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels comme polyphénols.

Parmi une multitude de choix, nous avons choisi d'étudier la Menthe (*Mentha spicata* L.), qui a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire. Ce travail entre dans le cadre générale de la valorisation des plantes médicinales, son objectif vise à déterminer ces propriétés biologiques.

L'huile essentielle de la Menthe, recueilli de la région de Berrahel à Annaba, a été extraite par hydrodistillation, le rendement obtenu est de l'ordre de 0,58%. L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de réduction du radical DPPH témoignant une activité modérée de notre huile essentielle par rapport au BHT utilisé comme antioxydant de référence. Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle a été testé sur sept germes microbiens soit, six souches bactériennes dont trois sont de référence et trois autres sont clinique (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), et un champignon (*Aspergillus niger*). Notre huile s'est avérée bactéricide et antifongique.

Références bibliographiques

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 1995.

Adiguzel A., Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry* 2007 ; 103: 1449-1456

AFNORNF T 75-006, huile essentielle. Association française de normalisation. Paris. pp559-563.

AFNOR. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). Mars 2000.

Ait Mbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Ziad A. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa L.*) extracts. *Braz. Journal of Medecin and Biological Research* 2007 ; 40 : 839-847.

Aghnihotri VK., Agarwal SG., Dhar PL., Thappa RK., Baleshwar., Kapahi BK., Saxena RK., Qazi GN. Essential oil composition of *Mentha pulgium L.* growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance Journal* 2005 ; 20: 607-610.

Albuquerque CC., Camara TR., Marian RDR., Willadino L., Marcelino C., Ulisses C. Antimicrobial action of the essential oi of *Lippia gracilis Schauer*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2006 ; 49: 527–35

Allegrini J., Bouchberg MS., Maillols H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier* 1973 ; 33: 73-86.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2009 ; 161 : 105-121.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.

Aprotosoai AC., Spac AD., Hancianu M., Miron A., Tanasescu VF., Dorneanu V., Stanescu U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare Mill.*). *Farmacla* 2010 ; 58 (1) : 46-54.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research* 2010 ; 24(5): 673-679.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2009 ; 2011 :1-8

Auburn R., Magnan D. Cultiver les plantes sauvages et comestibles, Ed Artemis, Presov 2008..

Ayadia B. Etude comparative de trois variétés d'huiles essentielles de menthe dans la région de Ourgla. Mémoire de Master en Génie des procédés. Université Kasdi Marbah Ouregla, 2011.

B

Baba Aïssa F. Les plantes médicinales en Algérie. Bouchène et Ad. Diwan éd. Alger. 1991 : 181 p..

Baser KHC., Buchbauer G. Handbook of essential oil: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis, USA 2010.

Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016 ; 6 : 71-79.

Baron EJ., Bruckner DA. Comparison of susceptibilities of anaerobic bacteria determined by agar dilution and by a microbroth method. *Reviews of Infectious Diseases*. 1984 ; 6 (1) : 249-53.

Baser KHC., Kürkçüoğlu M., Tarımcılar G., Kaynak G. Essential Oils of Mentha species from Northern Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 1999 ; 11 :579-588.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology* 2008 ; 46 : 446-475.

Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Zyad A. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. Journal of Medecine and Biological Research* 2007 ; 40 : 839-847.

Ben Mansour A., Porter EA., Kite GC., Simmonds MS., Abdelhedi R., Bouaziz M. Phenolic profile characterization of Chemlali olive stones by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015 ; 63(7) : 1990-1995.

Benayad N. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales Marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah, Ourgla 2008.

Benbouali M. Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de *Mentharotundifolia* et *Thymus vulgaris*. Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bouali, Chlef, 2006.

Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-alaoui M., Ayadi A. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie* 1986 ; 20 : 155-167.

Bicchi C., Liberto E., Matteodo M., Sgorbini B., Mondello L., d'Acompara Zellner B., Costa R., Rubiolo P. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragrance Journal* 2008 ; 23 : 382-391.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Anackov G., Zlatkovic B., Igic R. Variability of content and composition of *Mentha aquatica* L. (Lamiaceae) essential oil in different phenophases. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2006 ; 9(3): 223-229.

Boyle W. Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* 1955 ; 66: 25-28.

Boukhebti H., Chaker AN., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M., Laouer H., Harzallah D. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacie Lettre* 2011 ; 3(4) : 267-275.

Bousbia N. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat en chimie ; université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique ; 2011.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic LJ., Simin N., Samojlik I., Couladis M. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* scheele essential oils. *Molecules* 2008 ;13(9):2058-2068.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 1999.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 2009.

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.

Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists: Rockville maryland, USA 2000: 1367.

Burt S. Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal Food Microbiology* 2004 ; 94: 223–253.

C

Carlier-Loy P. *Mentha spicata* : Description et utilisations en thérapeutique et en agriculture comme antigerminatif sur la pomme de terre. Thèse de doctorat en pharmacie 2015. Université de Picardie Jules Verne 100p.

Cazau-Beyret N. Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse Université Toulouse III Paul Sabatier 2013.

Canillac N., Mourey A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 2001 ; 18(3) : 261-268.

Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., Hirata T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 2004 ; 19 (1) : 62-68.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002 ; 46: 1914-1920.

Chami F. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc 2005, 266p

Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt CO., Vey M. Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003 ; 51 : 398-403.

Chauhan SS., Prakash O., Padalia RC., Vivekanand Pant AK., Mathela CS. Chemical composition in *Mentha spicata* : Antioxydant and potato sprout inhibition activity of its essential oils. *Natural Product Communications* 2011 ; 6(9) : 1373-1378.

Chou GX., Zhou RH. The variation and chemotypes of the essential oil components in wild *Mentha haplocalyx* Briq. in China. *Journal of Plant Resources and Environment* 1998 ; 7 :13-18.

Cosentino S., Tuberoso CI., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 1999 ; 29(2): 103-105.

D

Dastmalchi K., Damien Dorman HJ., Oinonen PP., Darwis Y., Laakso I., Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and technology LWT* 2008 ; 41 (3) : 391-400.

De Billerbeck VC., Roques CG., Vanière P., Marquier P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes* 2002 ; 10 : 248-251.

Delille L. Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger 2007 : 240 p.

Delaquis PJ., Stanich K., Girard B., Mazza G. Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill , Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *International Journal of Food Microbiology* 2002 ; 74 : 101-109.

Dayal B., Purohit RM. Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *flavour of india*. 1971 ; 2: 484-485.

Dibong SD., Mpondo ME., Nigoye A., Kwin MF., Betti JL. Ethnobotany and phytomedicine of medicinal plants sold in Douala markets, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 2011 ; 37: 2496 – 2507.

Dorman HJD., Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 2000 ; 88: 308-316

Drugeon HB., Le Gallou F., Caillon J. Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. In: Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P. & Goldstein F. Bactéricidie, Aspects théoriques et thérapeutiques. Ed. Maloine, Paris, 1990.

Dupont F., Guignard JL. Botanique : Les familles de plantes. Elsevier, Masson, Issy-les-Moulineaux 2012.

E

Elfadl A., Skiredj A. Bulletin mensuel d'information et de liaison de la PNTTA n° 97 : Transfert de technologie en agriculture 2002.

El Kalamouni C. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Toulouse, France 2010.

Elgayyarv M., Draugon F., Golden D., Mount J. Antibacterial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food protects* 2001 ; 64 : 1019-1024.

Es-Safi NE., Kollmann A., Khlifi S., Ducrot PH. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure-activity relationship. *LWT* 2006 ; 40: 1246-1252.

F

Figueredo G., Cabassu P., Chalchat JC., Pasquier B. Studies of Mediterranean oregano populations. VIII– chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. *Flavour and Fragrance Journal* 2006 ; 21: 134-139.

France-Ida J. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles 1996 ; 3: 5-6.

Franchomme P., Pénéol D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur, Limoges 1990 : P445.

Fontenelle ROS., Morais SM., Brito EHS., Kerntopf MR., Brilhante RSN., Cordeiro RA., Tome AR., Queiroz MGR., Nascimento NRF., Sidrim JJC., Rocha MFG. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007 ;59 :934-940.

G

Gerbranda W. La culture des plantes aromatiques et médicinales en Bio. Ed. Frayssé, Paris France 2004 : 287

Gu R., Wang Y., Long B., Kennelly E., Wu S., Liu B. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biological and pharmaceutical bulletin* 2014 ; 37(6) : 903-915.

Guba R. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy* 2001 ; 11: 76-83.

Gudzić B., Djoković D., Vajs V., Palic R., Stojanović G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. *Flavour and Fragrance Journal* 2002 ; 17 (5) :392-394

Guerin-Faubleé V., Carret G. L'antibiogramme, principes, méthodologies, intérêts et limites. Journées nationales GTV-INRA, Nantes, France 1999, 5-12p.

Gulluce M., Şahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry* 2007 ; 103: 1449-1456.

Gonny M, Bradesi P et Casanova J. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal* 2004 ; 19: 424–433.

H

Hadj Ahmed S., Kouider Mahmoud N. Etude de l'extraction et de l'activité biologique des huiles essentielles de Menthe dans la région d'Ain Defla. Mémoire de Master 2016: Analyse biologiques et Biochimique Université Djilali Bounaama Khemis Miliana 115p. Disponible sur : <http://hdl.handle.net/123456789/1713> (date de consultation 10.05.2018).

Hadj Ahmed S., Kouider Mahmoud N. Etude de l'extraction et de l'activité biologique des huiles essentielles de Menthe dans la région d'Ain Defla : Mémoire de Master en sciences biologiques. Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, 2017.

Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Applications sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2011.

Hammami S Et Abdesslem M ; 2005): Extraction et analyse des huiles essentielles de la menthe poivrée de la région de Ouargla. Thèse IngUniv Blida P69

Hossain MA., Ismail Z., Rahman A., Kang SC. Chemical composition and antifungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And Products* 2008 ; 2(7) : 328-334.

J

Jamshidi R., Afzali Z., Afzali D. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2009 ; 5 (1) :78-81

Joulain D., König WA. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998.

K

Kalemba D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003 ; 10 : 813-829.

Karmakar I., Dolai N., Saha P., Sarkar N., Bala A., Kanti P. Scavenging activity of Curcuma caesia rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine* 2011;11:221–228.

Kazazi H., Rezaei K., Ghotb-Sharif SJ., Emam-Djomeh Z., Yamini Y. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from (*Hyssopus officinalis L.*) cultivated in Iran. *Food Chemistry* 2007 ; 105 : 805–811.

Kedia A., Prakash B., Mishra PK., Chanotiya CS., Dubey NK. Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata L.*) essential oil, *International biodeterioration & biodegradation* 2014 ; 89 : 29-36.

Kokkini S., Karousou R., Lanaras T. Essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology* 1995 ; 23 :425-430.

König WA., Hochmuth DH., Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.

Kotan R., Cakir A., Dadasoglu F., Aydin T., Cakmakci R., Ozer H., Kordali S., Mete E., Dikbas N. Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish Achillea, Satureja and Thymus species against plant pathogenic bacteria. *Journal of Science and Food Agriculture* 2010 ; 90: 145- 160.

Kováts E. Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247.

L

Laggoune S., Öztürk M., Erol E., Duru ME., Abaza I., Kabouche, A., Kabouche Z. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oil of *Mentha spicata L.* from Algeria. *Journal of Materials and Environmental Science* 2016 ; 7 (11): 4205-4213.

Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat N 2360. Institut National polytechnique de Toulouse 2006, 64p.

Laouer H. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Farhat Abbas, Sétif, Algérie 2004.

Lardry JM., Haberkorn V. Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews* 2007 ; 61: 18-23.

Lobstein A., Couic-Marinier F. Huile essentielle de Menthe poivrée. *Actualités Pharmaceutiques* 2016 ; 55(558) :57-59.

Luque de Castro MD., Jiménez CMM., Fernández P. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry* 1999 ; 18(11): 708-716.

M

Maisuthiasakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food composition and analysis* 2007 ; 21: 229-240.

Malik F., Hussain S., Sadiq A., Parveen G., Wajid A., Shafat S. Phytochemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of mentha arvensis in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012 ; 6 : 613-619.

Martins MR., Tinoco MT., Almeida AS., Cruz-Morais J. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from portuguese flora, *Journal of pharmacognosy* 2012 ; 3(1) : 39-44.

Marzoukia H., Elaissib A., khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A., Porcedda S. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L.essential oil from Tunisia. *The Open Natural products Journal* 2009 ;2 : 86-91.

Mayachiew P., Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 2008 ; 41 :1153-1159.

McKay DL, Blumberg JB, A review of the bioactivity and potential healthbenefits of peppermint tea (*Menthapiperita* L.). *Phytiatries* 2006 ; 20(8): 619-33.

Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules* 2010 ; 15: 9252-9287.

Mkaddem M., Bouajila J., Ennajar M., Lebrihi A., Mathieu F., Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *Journal of Food Sciences* 2009 ; 74 : 358-363.

Moja S., Jullien F. les Menthes, diversité des espèces et composition chimique. Dossier simple et aromatique-jardins de France 630, 2014.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004 ; 26(2) : 211-219.

Müller-Riebau FJ., Berger BM., Yegen O., Cakir C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997 ; 45: 4821–4825.

N

Naggar M., Iharchine K. Pour une approche d'aménagement et de gestion durable des territoires à romarin dans la région de l'Oriental (Maroc). *Forêt méditerranéenne* 2016 ; 37(1) : 63-70.

Nagendra PMN., Shankara BS., Sreenivasa MY. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology* 2010 ; 6 (1): 127-133.

Nieto G., Huvaere K., Skibsted LH. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology* 2011 ; 233 : 11-18.

O

Ojeda-Sana A M., van Baren C M., Elechosa AM., Juárez MA., Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 2013 ; 3 : 189-195.

Olle M., Bender I. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 2010 ; 8(3) : 687-696.

Oyedemi SO., Afolayan AJ. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011;4: 952-958.

P

Paré J. Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles 1997 ; 4: 4.

Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies. Ed. Masson, Paris 1981.

Pibiri MC. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. 2006. thèse de doctorat, EPFL, Lausanne, Suisse.

Pellerin P. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique* 2001 ; 94 : 51-62.

Prévosto B., Reque J., Ripert C., Gavinet J., Estève R., Lopez J.M., Guerra F. Semer les chênes méditerranéens (*Quercus ilex*, *Quercus pubescens*) : pourquoi, comment et avec quelle réussite ? *Forêt Méditerranéenne* 2015,36 (1): 3-16 .

Ponce A., Fritz R., Del Valle C., Roura S. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 2003 ; 36 : 679-684.

Prasad R., Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *International Review of Cytology* 2004 ; 242: 215-248

Q

Quézel P., Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

R

Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 2008 ; 122 ; 135-9.

Rhayour K. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc 2002

S

Scherer R., Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 2009 ; 112: 654-658.

Scherer R., Fumiere Lemos M., Coimbra Martinelli G., Damasceno Lopes MJ., Gomes da Silva A. Antioxydant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products* 2013 ; 50 : 408-413.

Sébastien Douay , Systématique des Angiospermes , faculté libre des sciences et technologies 2008-2009 .

Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono L., Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999 ; 47: 397-402.

Serrano M., Martinez-Romero D., Guillen F., Valverde JM., Zapata PJ., Castillo S., Valero D. The addition of essential oils to MAP as a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in Food Science and Technology* 2008 ; 19: 464-471.

Senoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., Vincenzo Defeo. *Mentha spicata* essential oil : chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. A gainst planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp strains. *Molécules* 2015 ; 20: 14402-14424.

Sikkema J., de Bont JAM., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 1994 ; 269: 8022-8028.

Silano V., Delbó M. Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. EMEA, European Medicines Agency. London (2008); 23p.

Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey N.K. & Gupta R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008 ; 88: 2421-2425.

Sokovic M., Vukojevic Jelena D., Marin Petar D., Brkic Dejan D., Van Griensven Leo JLD. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 2009 ;14 : 238-249.

Skoog DA., Holler FJ., Nieman TA. Principes d'analyse instrumentale. 1 éd. Ed. De Boeck Université, Bruxelles 2003.

Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y. and Guolin Z. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 ;96 :151-158.

Sokmen A., Jones BM., Erturk M. The in vitro antibacterial activity of Turkish plants. *Journal of Ethnopharmacology* 1999 ; 67: 79-86.

Sokovic M, van Griensven L.J.L.D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 2006 ; 116 : 211-224.

Staub H., Bayer L. Traité approfondi de phyto-aromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues, Ed Grancher, Paris 2013.

Su YC., Ho CL., Wang IC., Chang ST. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan Journal of Forest Science* 2006 ; 21 (1): 49-61

T

Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1994 ; 58(10): 1780-1783.

Taneja SC., Chandra S. Mint, handbook of herbs and spices 2nd edition. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* 2012, Pages 366-387.

Taoudait A., Zane M., Ferhat Z. Etude de la composition chimique et de l'activité biologique de la menthe (*Mentha spicata*).in Recueil des résumés et des expositions 'Ethnobot 2016', 3^{ème} Exposition d'ethnobotanique et 4^{ème} Atelier d'initiation à la photothérapie 15 Mai 2016. Pp : 58-59.

Teisseire PJ. Chimie des substances odorantes. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris1991.

Telci I., Kacar O., Bayram E., Arabaci O., Demirtas I., Yilmaz G. The effect of ecological conditions on yield and quality traits of selected peppermint (*Mentha piperita L.*) clones. *Industrial Crops and products* 2011 ; 34 : 1193-1197.

Telci I., Sahbaz N., Yilmaz G., Tugay ME. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata L.*) originating in Turkey. *Economic Botany* 2004 ; 58 : 721-728.

Telci I., Demirtas I., Bayram E., Arabaci O., Kacar O. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata L.*). *Industrial Crops and Products* 2010 ; 32 : 58

Tharib SM., Gnan SO., Veitch GBA. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *Journal of Food Protection* 1983 ; 46: 681-685.

Tongnuanchan P., Benjaku S. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sodrinus*. *Food chemistry* 2007 ; 105 : 311-316

U

Ultee A., Bennik MH., Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002 ;68: 1561-1568.

V

Van Den Dool H., Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 1963, 11, 463-471.

W

Wilkinson JM. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs* 2006 ; 157-171.

Williams HJ., Philips TD., Jolly EP, Stiles KJ., Aggrwal D. human aflatoxicosis in developing countries : A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and intervention, *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004 ; 80 : 1106-1122.

Webographie

Web1: <http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com> [12.04.2019].

Web2: <http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com> [12.04.2019].

Web3:http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE_fr.pdf [31.05.2019]

Y

Yanishlieva NV., Marinova EM., Gordon MH., Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food and Chemistry* 1999; 64: 59-66.

Yanishlieva NV., Marinova E., Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006; 108: 776-793.

Yen GC. Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2000; 43: 27-32.

Yrjönen T. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Academic dissertation, University of Helsinki, Finlande 2004, p19.

Z

Zaidi S., Dahiya P. In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from *Mentha spicata* and *Mentha piperita*. *International Food Research Journal* 2015; 22(6): 2440-2445.

Zaouli y., bouzaine t., Boussaid M. Essential oils composition in tow *Rosmarinus Officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and chemical toxicology* 2010 ; 48 : 3144-3152.

Zhao Y., Dou J., Wu T. and Akber Aisa H. Investigating the Antioxidant and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium herbaceam*. *Molecules* 2013 ; 18: 951-962.

Znini M., Bouklah M., Majidi L. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *International Journal of Electrochemical Science* 2011 ; 6(3) : 691-704.

Zygadlo JA., Juliani HR. Recent progress in medicinal plants. In: Majundar D.K., Govil JN., Singh VK., Shailaja MS., Gangal SV. *Phytochemistry and Pharmacology II*, Vol. 8. Studium Press, Houston, Texas 2003: 273-281.

Références

[Nicolas Jean-Baptiste Gaston Guibourt](#) volume 3 Cambridge University Press 2014

Photo culture de la menthe <http://www.sharpmint.com/value-chain.php> date de consultation 17.03.2109

Schéma extraction <http://tpe-huile-essentielle.e-monsite.com/pages/i-les-differents-procedes-d-extraction-d-une-huile-essentielle/5-extraction-au-co2-supercritique.html> date de consultation [03.04.2019](#) 22 :54

- a. Fletcher, R. S., McAuley, C., Kott, L. S., Palaniswamy, U. R., Gardner, Z. E. and L.E. Craker. 2005. Novel *Mentha spicata* clones with enhanced rosmarinic acid and antioxidant activity. Acta Horticulturae, 2005, 680, pp 31-36, 13 ref.