



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE Dr MOULAY TAHAR- SAIDA

Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de Master en Biologie

Option : Microbiologie Appliquée.

Présentée par:

M^{elle} Slimani Fatima Zahra et

M^{elle} Abbas Imene

*Profil Chimique De Huile Essentielle De Plante Mentha Pulegium
(Fliou) Et L'Evaluation Des Activités Biologiques (théorie).*

Devant Le Jury Composé De :

Soutenu le : 13/09/2020

Dr. AMMAM Abdelkader	Président	MCA
Dr. GHOUTI Dalila	Encadreur	MCB
Dr. CHALANE Fatiha	Examinatrice	MCB

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciement

Avant tout, nous tenons à remercier Allah de nous avoir, aidé et éclairé notre chemin.

Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à Mm. GHOUTI Dalila pour les directives précieuses qu'elle nous a consacré afin d'améliorer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement les membres de jury

Mr. AMMAM Abdelkader et Mm. CHALANE Fatima

D'avoir accepté d'évaluer notre travail.

Nos sincères gratitudees à tous les enseignants qui nous ont accompagnés durant ce cursus Universitaire et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à élaborer ce travail.

Merci



Dédicaces

Les louanges sont à Allah seigneur des mondes qui ma comblée de grâce en me permettant d'achever ce modeste travail

Je dédie ce travail à mes chères parents source de tendresse, d'amour et d'espoir, qui ont œuvré pour ma réussite ; ses soutiens ; tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils ; pour toute ses assistances et ses présences dans ma vie que dieu les protèges.

A mes très chers frères : Omar, Ali, Mostafa.

A mes très chères sœurs : Zina, Fatima.

A mes oncles, tantes, cousins (es) et tous les membres de ma famille et surtout ma cousine Halima.

A ma binôme et amie Imane

Sans oublier mes copines : Ahlem, Hanane et Randa, et mes amis de ma promotion.

Fatima

J'ai le grand plaisir de dédier

Ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

*A ma mère, que Dieu ait pitié d'elle, et à mon père, que Dieu le
Protège, qui m'ont comblé de leurs amours, et de leurs encouragements
durant toutes ces longues années d'étude*

A ma binôme et amie Fatima

Mes sœurs et mes frères

*Mes amies : Salma, Samah, Sarah, Hayat, Chanaz
Nabila, Chaïma, Rofi, Hanan, Hoda, Kholoud, Saadod, Anon, Aïcha*

Imene

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de <i>Mentha pulegium</i>	6
Tableau 02 : Quelques préparations thérapeutiques de la menthe pouliot.....	8
Tableau 03 : Principales classes des composés phénoliques.....	11
Tableau 04 : Principales sous-groupe des Flavonoïdes au sens strict.....	15
Tableau 05 : Principales sous-groupe des Flavonoïdes au sens large.....	16
Tableau 06 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle.....	54
Tableau 07 : Résultats des tests phytochimique de <i>Mentha pulegium</i>	56

Liste des figures

Figure 01 : Mentha pulegium L.....	6
Figure 02 : Quelques exemples de phénols.....	12
Figure 03 : Principaux acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.....	13
Figure 04 : Structure de base des Phénylpropanoïdes.....	14
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes.....	14
Figure 06 : Structures des sous-classes de flavonoïdes principales.....	15
Figure 07 : Structure de trans-resveratol.....	17
Figure 08 : Structure de base des xanthones.....	18
Figure 09 : Structure de base d'emodols et d'anthraquinones.....	18
Figure 10 : Structure d'un tannin hydrolysable et des tannins condensés.....	19
Figure 11 : Structure d'Isoprène.....	20
Figure 12 : Structure de quelques composés des huiles essentielles.....	22
Figure 13 : Montage d'extraction des huiles essentielles par distillation.....	23
Figure 14 : Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	24
Figure 15 : Montage d'extraction par Hydrodistillation.....	25
Figure 16 : Technique d'extraction par enfleurage.....	26
Figure 17 : Technique d'extraction par solvant.....	27
Figure 18 : Extraction des huiles essentielles assistées par micro-ondes.....	28
Figure 19 : Schéma du Principe de la chromatographie en phase gazeuse.....	29
Figure 20 : Schéma du principe du fonctionnement du couplage.....	30
Figure 21 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.....	31
Figure 22 : Schéma simplifié d'un appareil d'HPLC.....	32
Figure 23 : Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	35
Figure 24 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé.....	38

Figure 25 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	39
Figure 26 : Forme réduite du radical DPPH.....	51
Figure 27 : Rendement en huile essentielle de la plante <i>Mentha pulegium</i>	55

Liste des photos

Photo 01 : Méthode de micro-dilution.....	37
Photo 02 : Méthode de macro-dilution.....	37
Photo 03 : plante de <i>Mentha pulegium</i> L séchée.....	45
Photo 04 : Montage de l'hydrodistillateur.....	50
Photo 05 : l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	54

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

AC : Acide

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Agence française de normalisation

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ARN : Acide ribonucléique

BHA : Butylated hydroxyanisole ou hydroxyanisole butylé

BHT : Butylated hydroxytoluene ou hydroxytoluène butylé

CCM : Chromatographie sur couche mince

Cm : Centimètre

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DIF : Détecteurs à ionisation de flamme

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : Diphényl pycryl hydrayl

ERV : Entérocoques résistants à la vancomycine

FeCl₃ : Chlorure de fer

FRAP : ferrique réduisant le pouvoir antioxydant

G : Gramme

H : Heurs

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HCl : Acide chlorhydrique

HE : Huile essentielle

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

IE : Impact électronique

Kg : Kilogramme

L : Litre

Min : Minutes

ml : millilitre

mm : Millimètre

NaOH : Hydroxyde de sodium

pH : Potentiel hydrogène

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SARM : Staphylocoques aureus résistants à la méthicilline

SM : Spectrométrie de masse

TBA : Acide thiobarbiturique

UV : ultra-violet

UFC : Unité formant colonie

الملخص

تمثل النباتات الطبية أحد مصادر الأدوية لحوالي 80٪ من سكان إفريقيا. إن المعرفة التي لا تقدر بثمن للمعالجين التقليديين هي نقطة انطلاق للتحقيق الدوائي والكيميائي النباتي لهذه الأدوية الطبيعية. تظهر آثارًا أكثر أهمية فيما يتعلق بقواها البيولوجية خالية تمامًا أو شبه خالية من الآثار الجانبية.

من بين هذه النباتات الطبية اخترنا نبات *Mentha pulegium* يدعى من قبل السكان المحليين بفليو *Fliou*، وهو نبات منتشر على نطاق واسع في الجزائر من عائلة *Lamiaceae* معروفة في العالم بخصائصها العلاجية (مطهر، مضاد للألم، مسكن ...).

هذا العمل مكرس لفحص كيميائي نباتي وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة للزيت العطري من النعناع البري المحصود من منطقة مستغانم (غرب الجزائر).

أعطى استخراج الزيت العطري من الأجزاء الهوائية من النعناع البري عن طريق احتجاز البخار زيتًا أصفر شاحبًا متطايرًا يتميز برائحة قوية بمتوسط إنتاج 0.23٪، وقد أتاح لنا الفحص الكيميائي النباتي الكشف عن وجود تانينات مسكنة، السابونوزيدات، الستيروول والتريتربين، الكومارين ووجود قلويدات ومركبات مختزلة.

الكلمات المفتاحية: نباتات طبية، زيوت أساسية، فليو، التصريف بالبخار، التحليل الكيميائي

النباتي. الأنشطة البيولوجية.

Résumé

Les plantes médicinales représentent une des sources de médicaments pour environ 80 % des populations africaines. Le savoir-faire des guérisseurs traditionnels, d'une valeur inestimable, est un point de départ pour l'investigation pharmacologique et phytochimique de ces médicaments naturels. Elles montrent de plus en plus des effets significatifs concernant leurs pouvoirs biologiques totalement ou presque exemptes d'effets secondaires.

Parmi ces plantes médicinales nous avons choisis la plante *Mentha pulegium* L appelées par la population locale Fliou, C'est une plante, largement répandue en Algérie, de la famille des Lamiaceae qui sont connus dans le monde pour leurs propriétés thérapeutiques (antiseptique, antinévralgique, analgésique...).

Le présent travail est consacré a un screening phytochimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydant de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* récoltées de la région de Mostaganem (ouest algérien).

L'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de *Mentha pulegium* par entraînement a la vapeur a donné une huile volatile jaune pâle caractérisée par une forte odeur avec un rendement moyen de 0.23 %. Le screening phytochimique nous a permis de révéler la présence des tannins cathéchiques, saponosides, stérols et triterpènes, coumarines et la présence des alcaloïdes et des composées réductrices.

Les mots clés : les plantes médicinales, les huiles essentielles, *Mentha pulegium*, activités biologiques, test phytochimique.

Abstract

Medicinal plants represent one of the sources of medicines for about 80% of African populations. The invaluable know-how of traditional healers is a starting point for the pharmacological and phytochemical investigation of these natural medicines. Increasingly, they are showing significant effects with regard to their biological powers that are totally or almost free of side effects.

Among these medicinal plants we have chosen the plant *Mentha pulegium* L called by the local population by Fliou, it is a plant, widely spread in Algeria, of the family Lamiaceae are known worldwide for their therapeutic properties (antiseptic, antinevralgic, analgesic ...).

The present work is devoted to a phytochemical screening and evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of the essential oil of *Mentha pulegium* harvested from the region of Mostaganem (western Algeria).

The extraction of the essential oil from the aerial parts of *Mentha pulegium* by steam distillation resulted in a pale yellow volatile oil characterized by a strong odor with an average yield of 0.23 %. The phytochemical screening revealed the presence of catechic tannins, saponosides, sterols and triterpenes, coumarins and the presence of alkaloids and reducing compounds.

Key words: medicinal plants, essential oils, *Mentha pulegium*, steam entrainment, biological activities.

Table de matière

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

المخلص

Résumé

Abstract

Introduction Générale.....1

1ère partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : les plantes Aromatiques Médicinales

I. Introduction.....	3
I.1.Présentation de la plante étudiée.....	4
I.1.1 La menthe.....	4
I.1.1.1 Historique.....	4
I.1.1.2 Généralité sur la menthe.....	4
I.2. Description botanique de Mentha pulegium L.....	5
I.2.1 Classification.....	6
I.2.2. Nomenclature.....	7
I.2.3. Habitat et origine.....	7
I.2.4. Caractérisation de la plante Mentha pulegium L.....	7
I.2.5. Les propriétés thérapeutiques de Mentha Pulegium L.....	7
I.2.6. Utilisations traditionnelles.....	8
I.2.7. Les Activités biologiques de la Mentha pulegium.....	9
➤ Activité antibactérienne.....	9
➤ Activité antioxydante.....	9
➤ Activité antifongique.....	9
➤ D'autres activités.....	9

Chapitre II : Composés phénoliques et huiles essentielles

II.1. Composés phénoliques.....	10
II.1.1. Phénols, acides phénols et phénylpropanoïdes.....	12
II.1.2. Les Flavonoïdes.....	14
II.1.3. Stilbènes.....	17
II.1.4. Xanthones.....	17
II.1.5. Quinones et Emodols.....	18

II.1.6. Tanins.....	18
▪ Tanins condensés (proanthocyanidines).....	19
▪ Tanins hydrolysables.....	19
II.2. Les huiles essentielles.....	19
II.2.1. Généralités.....	19
II.2.2. Intérêt des huiles essentielles.....	20
II.2.3. Compositions chimiques.....	20
1) Les terpénoïdes.....	21
a) Les monoterpénoïdes.....	21
b) Les sesquiterpénoïdes.....	21
2) Les phénylpropanoïdes.....	22
II.2.4. Les Principales méthodes d'extraction.....	23
II.2.4.1. La distillation.....	23
II.2.4.2. L'entraînement à la vapeur d'eau.....	23
II.2.4.3. L'hydrodistillation.....	24
II.2.4.4. L'expression à froid.....	25
II.2.4.5. L'extraction par enfleurage.....	25
II.2.4.6. Autres méthodes d'obtention des extraits volatils.....	26
II.2.4.6.1. Extraction par solvants.....	26
II.2.4.6.2. Extraction par micro-ondes.....	27
II.2.5. Caractérisation et identification des composés phénoliques et des huiles essentielles.....	28
II.2.5.1. La Chromatographie Phase Gazeuse CPG.....	29
II.2.5.2. Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	30
II.2.5.3. Chromatographie sur couche mince.....	30
II.2.5.4. La chromatographie liquide à haute performance.....	31
II.2.5.5. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN.....	32
II.6. Conservation des huiles essentielles.....	32

Chapitre III : Activité biologique des huiles essentielles

III.1. Activité antimicrobienne.....	34
III.1.1 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	36
III.1.1.1. Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé.....	36
III.1.1.2. Méthode de dilution.....	36
a) En milieu liquide.....	37
b) En milieu solide.....	37
III. 2. Activité antioxydant.....	38
III.2.1. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant.....	39
III.2.1.1. Le test de piégeage de radical DPPH.....	40
III.2.1.2. Le test de la réduction de fer (FRAP).....	40
III.2.1.3. Le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène.....	40
III.2.1.4. Le test à l'acide thiobarbiturique (TBA).....	41
III. 3. Activité anti-inflammatoire.....	41
III. 4. Activité antifongique.....	42

III. 5. Activité antivirale.....	43
III. 6. Activité antiparasitaire.....	44

2^{ème} partie :

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Introduction.....	45
IV.1. Matériel végétal.....	45
IV.2. Screening photochimique.....	46
IV.2.1. Différentes classes recherchées.....	46
1.1. Les tannins.....	46
1.2. Les flavonoïdes.....	46
1.3. Les anthocyanes.....	46
1.4. Les coumarines.....	46
1.5. Les alcaloïdes.....	47
1.6. Stérols et triterpènes.....	47
1.7. Les saponosides.....	48
1.8. Les composés réducteurs.....	48
1.9. L'amidon.....	48
IV.3. Les procédures d'extraction.....	49
IV. 3.1. Extraction des huiles essentielles.....	49
IV.4. Caractérisation de l'huile essentielle.....	50
IV.4.1. Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM.....	50
IV.5. Estimation des activités biologiques in vitro.....	51
IV.5.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH.....	51
IV.5.2. Activité antibactérienne de l'huile essentiel.....	52
IV.5.2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque de diffusion.....	52
IV.5.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	53

3^{ème} partie :

Chapitre V : Résultat et Discussion

V. 1. Caractéristiques organoleptiques.....	54
V. 2. Rendement de l'huile essentielle.....	55
V. 3. Les tests phytochimique.....	55
Conclusion générale et perspective.....	58
Référence bibliographique.....	60
Annexes	



Introduction générale

L

es plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales dans le but de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains. Ces plantes médicinales sont reconnues pour leurs effets thérapeutiques et leurs caractéristiques biologiques, sous leur forme originale ou semi-synthétique, en raison de leur capacité à produire un grand nombre de métabolites secondaires (**Fraga, 2007**) ; parmi eux les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (**Halliwel, 2006**).

Ces dernières biomolécules ; qui sont répartis dans différentes parties de la plante comme les feuilles, les tiges et les fleurs (**Pacifico et al., 2015**) ; ils sont largement exploités dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (**Taviano, 2013**).

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales riches en composés phénoliques suscite de plus en plus d'intérêt causé par leurs propriétés biologiques telles que les activités antioxydante (**Halliwel, 2008**), anti-inflammatoire (**Guo et al., 2014**), antibactérienne (**Cushnie et Lamb, 2011**), antivirale (**Ben Sassi et al., 2008**), antifongique (**Martins et al., 2015**), cytotoxique (**Soobrattee et al., 2013**), antiallergique et antithrombotique. Leur efficacité dépend de leurs structures diverses (**Huyan et al., 2016, Farhoosh et al., 2016**) et, à cet effet, beaucoup d'attention a été accordée à l'extraction et à l'isolement des huiles essentiels et polyphénols à partir d'herbes afin de remplacer les conservateurs synthétiques des produits alimentaires et prévenir les systèmes vivants des pathologies issus de dommages peroxydatif (**Takwa et al., 2018**). De même, les huiles essentielles représentent une grande source de divers produits chimiques et, de par leurs propriétés prometteuses antibactérienne (**Derwich et al., 2010 ; Gulluce et al., 2007**), antifongique (**Dambolena et al., 2007**) ainsi que d'autres propriétés biologiques (**Viuda-Martos et al., 2011**), les rendent comme meilleure

alternative fiable des conservateurs synthétiques. En outre, l'utilisation des huiles essentielles est moins dommageable pour la santé humaine (**Lis-Balchin et Deans .1997**).

L'Algérie est considérée parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la mer Méditerranée et l'Afrique subsaharienne. De cette flore, nous avons choisi la plantes endémique *Mentha pulegium*, récoltées dans l'ouest de l'Algérie et connues pour avoir des propriétés biologiques. C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que le présent travail s'inscrit sur la caractérisation de l'huile essentielle de la plante choisie. Les activités biologiques, en l'occurrence l'activité antioxydante, et antibactérienne.

Le plan de notre travail est structuré comme suit :

- Une introduction générale dans laquelle la problématique est posée.
- La première partie aborde une étude bibliographique concernant les plantes médicinales en général et étudiées en particulier, les composés phénoliques et les huiles essentielles ainsi que leurs activités biologiques (antioxydant et antibactérienne).
- La seconde partie est réservée à l'étude expérimentale où le matériel utilisé est cité et les méthodes opératoires son décrites.
- Dans la troisième partie, tous les résultats expérimentaux obtenus sont présentés et discutés.

Enfin, une conclusion générale vient achever ce travail.



1ère Partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I. Les Plantes Aromatiques Médicinales

I-Introduction

Depuis l'antiquité, l'humanité a utilisé diverses plantes présentes dans son environnement pour ses besoins médicaux et alimentaires pour traiter et guérir toutes sortes de maladie (**Boumediou et Addoun, 2017**). À ce jour, les plantes jouent encore un rôle majeur dans l'art de soigner et de guérir à travers le monde. Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité, ce sont des usines chimiques naturelles, produisant des substances la disposition de l'homme qui peut les utiliser pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenberg et Paris, 1997**). Malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et notamment dans les pays en développement (**Tabuti et al., 2003**).

D'après (**Quyou, 2003**), il existe plus de 80 000 espèces de plantes médicinales sur notre planète. De plus en plus et avec le développement des civilisations anciennes, l'utilisation des plantes médicinales s'est développée grâce à leurs connaissances et à leur expérimentation effectuée dans ce domaine (**Lahsissene et al. 2009**).

L'utilisation des plantes médicinales se développe dans la plupart des pays du monde. Cette utilisation est principalement basée sur l'idée que les plantes sont un moyen naturel de mauvais traitement de tout risque. Au fil des siècles, les traditions humaines ont développé la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales semblent étranges et sont basées sur la magie, d'autre au contraire semble plus fondée, plus efficaces. Cependant, toutes visent à surmonter la souffrance et à améliorer la santé des humains.

A l'heure actuelle, les plantes sont toujours le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme de matière première essentielles à la découverte de nouvelles molécules nécessaire au développement de futures médicaments (**Maurice, 1997**).

En Algérie, nous avons depuis longtemps recours à la médecine traditionnelle grâce à la richesse et la diversité de la flore de notre pays, qui constitue un véritable réservoir phytogénétique, avec environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Bouزيد et al, 2016**). La richesse et l'originalité de l'étude de la flore algérienne présente un intérêt scientifique fondamental pour la connaissance de la pharmacopée traditionnelle, et le domaine de la valorisation des substances naturelles. La diversité et la fertilité du sol qui caractérisent les

différentes régions d'Algérie influencent sur la qualité et la composition chimique des plantes médicinales, ce qui les dote de caractéristiques spécifiques (Nedjai, 2017).

Des chiffres recueillis auprès du Centre national du registre de commerce, montrent qu'à la fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants. La capitale compte à elle seule le plus grand nombre vendeurs avec 199 magasins, suivie de la wilaya de Sétif (107 magasins), Bechar (100 magasins) et El Oued avec 60 magasins (Boumediou et Addoun, 2017).

I.1. Présentation de la plante étudiée :

L'Algérie à un climat très diversifié les plantes poussent en abondance au cours de quatre saisons dans les régions côtières, montagneuses et également sahariennes. Ces plantes sont des remèdes naturels potentiels, qui peuvent être utilisés dans le traitement curatif et préventif (Laifaoui, 2019). Parmi ces plantes médicinales, nous avons choisis d'en étudier la plante *Mentha pulegium* L.

I.1.1. La menthe :

I.1.1.1. Historique :

La menthe est l'une des plantes médicinales les plus célèbres que l'on connaît depuis longtemps. On a retrouvé en effet des feuilles de menthe séchées vieilles d'environ 3000 ans dans les pyramides égyptiennes. Tandis que les Grecs et les Hébreux s'en parfumaient, les Romains en glissaient dans leur vin et leurs sauces. Au Moyen Âge, on découvre vraiment ses vertus thérapeutiques soit en calmants, antiseptiques ou encore en anesthésiques, puisqu'elle est prescrite aux personnes souffrantes pour anesthésier la douleur. Originaires d'Asie et de l'Europe médiévale, la menthe est un aromate connu pour sa prolifération rapide. Libérant un parfum très fort et agréable, elle embaumait les temples grecs et les demeures des Hébreux. Elle éloignait également les puces et assaisonnait les mets. (Addadi et Ferradji, 2014)

I.1.1.2. Généralité sur La menthe :

La menthe est une plante herbacée vivace, dicotylédone et gamétopétale, susceptible de se reproduire par des rhizomes, par marcottage ou par bouturage. Elle apprécie les situations fraîches, moyennement éclairées, des sols riches en éléments nutritifs, affectionnant un pH neutre (Bruneton, 1993).

Les menthes appartiennent à l'ordre des Lamiales et de la famille des Lamiacées qui forment, avec près de 3500 espèces et 8 sous-familles (*Ajugoideae*, *Chloranthoideae*,

Lamioideae, *Nepetoideae*, *Pogostemoideae*, *Scutellarioideae*, *Teucroideae* et *Viticoideae*), forment une vaste et importante famille très typique du monde végétal. Près de la moitié (47 %) des Lamiaceae sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae*. Cette famille regroupe des plantes herbacées, répandues dans le monde entier (sauf en Antarctique), mais particulièrement présentes dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes. Elles sont pour la plupart aromatiques (basilic, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, serpolet, thym...), partiellement ligneuses et forment des arbustes et très rarement des arbres. Leurs caractéristiques communes sont les suivantes : les fleurs sont hermaphrodites, le calice persistant est formé de 5 sépales diversement soudés et présente souvent deux lèvres. (Sutour S, 2010). Au sein de la famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate.

Comme d'autres plantes la menthe possède elle aussi de nombreuses variétés. Nous ne pouvons pas aborder toutes les variétés de menthe, je vous propose de nous attarder sur 4 d'entre elles, qui nous semblent les plus intéressantes :

- 1 • Menthe poivrée (*Mentha x piperita*)
- 2 • Menthe des champs (*Mentha arvensis*)
- 3 • Menthe pouliot ou Menthe 'Fliou' (*Mentha pulegium*)
- 4 • Menthe verte (*Mentha spicata*). (Addadi et Ferradji, 2014)

I.2. Description botanique de *Mentha pulegium* L :

La *Mentha pulegium* L. est une plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées. Originaire d'Europe et d'Asie Mineure, la menthe pouliot est répandue en Amérique. Elle pousse sur les sols humides et les endroits inondés en hiver en Afrique du Nord (Iserin P et al., 2001), en Algérie elle pousse surtout dans le Tell, la partie aérienne portant des trichomes glandulaires qui sont responsables de la sécrétion d'huile essentielle (Rodrigeus L et al., 2013 ; Quezel P et Santa S, 1963).

Le nom *pulegium* vient du latin *pulex*, puce, car on dit que la fumée du pouliot chaffe les puces pour éloigner les puces. Plante vivace de 10 à 40 cm de hauteur, velue à glabrescente, à tiges généralement ascendantes rameuses, très aromatique ; feuilles ovales, d'environ 10 mm de longueur, pétiolées et presque entières. Fleurs roses ou lilacées, disposées en pseudo-verticilles espacés, l'aisselle 5 à 15 feuilles superposées ; calice bilabié, à gorge fermée par un anneau de

poils ; corolle de 5 à 7 mm de longueur, à 4 lobes égaux. Akènes ponctué d'alvéoles. Fleurit en juillet et août (Kazemi Oskuee R. et al., 2011). (Figure 01).



Figure 01 : *Mentha pulegium* L.

I.2.1 Classification :

D'après (Quezel P et Santa S, 1963), la classification classique de la *Mentha pulegium* L. sont présenté dans le tableau 01 :

Tableau 01 : Classification de *Mentha pulegium* L.

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

I.2.2. Nomenclature :

- ❖ Nom commun :
 - En français : Herbe aux puces, Herbe de saint Laurent, Bléchon, Pouliot.
 - En anglais : Pennyroyal.
- ❖ Nom botanique : *Mentha Pulegium* L.
- ❖ Nom vernaculaire :
 - En arabe : Fliou
 - En targui ou berbère : Afligou, Félgou, Moursal, Temarsa (**Dellile L, 2007 ; Sutour S, 2010**)

I.2.3. Habitat et origine :

Cette espèce inculte pousse dans les zones humides et fréquemment marécageuses, imminent des routes, et elle est principalement abondante parmi les pâturages de montagnes (**Chalchat J.C et al., 2000**) elle entraîné comme des montagnes jusqu'à 2200 mètres d'hauteur. Il existe de nombreuses espèces de menthe sauvage pareille *Mentha Pulegium* L. est très torrentielle et pousse primesautierment en Algérie (**Quezel P et Santa S, 1963**). La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Exclusivement, en pourchassant les ruissellements de migration, les menthes sont rencontrées sur la quasi-totalité des continents.

I.2.4. Caractérisation de la plante *Mentha pulegium* L :

La Menthe pouliot contient une huile essentielle. C'est un liquide rouge jaunâtre, d'odeurs très fortes, solubles dans l'alcool, composées de 75 à 80% de pulégone liquide incolore d'odeur aromatique et de menthol de limonène lévogyre de dipentène, la menthe pouliot contient également du tanin, des matières cellulosiques et pectiques, (**Beloued, 1998**). Elle contient du sucre, des matières résineuses, une oxydase, une peroxydase, une catalase (**Fournier P, 1999**).

L'huile essentielle de *Mentha pulegium* est caractérisée par la prépondérance de la pulégone (70-90%) accompagnée d'autres cétones monoterpéniques : Isomenthone, Méthone, Piperténone. (**Bremness, 2001**).

I.2.5. Les propriétés thérapeutiques de *Mentha Pulegium* L :

Connue depuis l'antiquité, la menthe pouliot parmi les plantes les plus communément utilisées en médecine traditionnelle (**Boullard, 2001**). En fait, une infusion de feuilles et/ou de

sommités fleuries est recommandée contre la toux, l'asthme, le diabète (Ziyyat et al., 1997), la fièvre, les brûlures, l'eczéma, ou bien pour arrêter la sécrétion lactée et a des propriétés insecticide, cholagogue, antiseptique, antispasmodique, antitussive, conseillée pour l'hygiène buccale, contre les maux de tête, les frissons et les infections broncho-pulmonaires (Lorenzi et al., 2002). Par ailleurs, une infusion, un cataplasme ou une inhalation de la plante fraîche est conseillée dans le cas d'une bronchite, d'une cataracte, d'un rhume et d'une infection de la gorge. En outre, une infusion de sommités fleuries à un effet expectorant, désinfectant et est utilisée pour le traitement des peaux grasses. Enfin, une infusion de la partie aérienne a également un effet tonique, digestive et carminative. (Bekhechi, 2008). Quelques préparations thérapeutiques de la plante sont présentées dans le **tableau 02**.

Tableau 02 : Quelques préparations thérapeutiques de la menthe pouliot.

Partie utilisée et préparation	Effets thérapeutiques	Référence
Partie aérienne Infusion : cuillère à soupe par tasse pendant 10 min. Inhalation. Décoction : dans le lait ou du thé.	Cas de refroidissement, de rhume, de bronchite, de toux et de douleurs abdominales	(Lahsissene H et al., 2009)
Feuilles fraîche en cataplasme	Arrêt de la sécrétion lactée	(Sijelmassi A, 1993)
L'huile essentielle : A forte dose	Un effet abortif	(Lahsissene H et al., 2009)

I.2.6. Utilisations traditionnelles :

La menthe pouliot est utilisée pour stimule les sécrétions gastriques, réduit les flatulences et les coliques, et combat les fermentations. C'est l'une des meilleures boissons digestives, bénéfiques en particulier à ceux qui souffrent d'insuffisance hépatique, et élimine les vers intestinaux. Elle fait baisser la fièvre, favorise la sécrétion des muqueuses et constitue un bon remède contre maux de tête et les infections respiratoires bénignes. En infusion, la menthe

pouliot apaise les démangeaisons et la sensation de picotement, les inflammations cutanées, tel le rhumatisme et la goutte. En plus elle est utilisée contre les maladies des yeux (éclaircir la vue) ; et contre les taches de rousseur. (Talahagcha et Kassa ; 2008). Elle lutte contre les poux, les moustiques et les puces. Elle protège, rafraichit et nettoie la peau (lorsqu'elle est ajoutée à l'eau du bain) (Guy ; 2005).

Les feuilles de la menthe pouliot confites ou séchées sont particulièrement appropriées pour parfumer et décorer les plats, les sauces et les soupes, Elle est aussi utilisée pour préparer les tisanes. Le pouliot est surtout employé pour parfumer les savons, les détergents, ainsi que les dentifrices. (Boukenna et Bouzidi ;2007).

I.2.7. Les Activités biologiques de la *Mentha pulegium* :

➤ **Activité antibactérienne :**

L'étude de Dimitrios et ces collaborateurs en 2012 a montré que l'extrait méthanolique de l'espèce *Mentha pulegium* a une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* (bactérie de gram positif) (Stago D et al., 2012).

➤ **Activité antioxydante :**

L'étude de Dimitrios et ces collaborateurs en 2012 a montré que les extraits méthanoliques et aqueuses du pouliot possèdent une activité de piégeage des radicaux libres, les résultats sont en accord avec ceux montrés dans plusieurs recherches (Stago D et al., 2012).

➤ **Activité antifongique :**

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L a été étudié vis-à-vis de deux champignons, par Hmiri et ces collaborateurs, elle a provoqué une inhibition de la croissance d'*Aspergillus alternata* et de *Penicilium expansum* (Hmiri S et al., 2011).

➤ **D'autres activités :**

Quelques effets pharmacologiques des huiles essentielles de la menthe pouliot comme l'effet abortif sur les rats, l'activité cytotoxique humaines, et son effet antioxydant sont confirmés (Bruneton, 2008)

Chapitre II. Composés phénoliques et huiles essentielles

Aujourd'hui comme jadis, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes. Ces derniers sont le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse des métabolites secondaires particulier qui constitué une source majeur de principes actifs les plus divers (**Kansole, 2009**). Les métabolites secondaires sont des molécules organiques très hétérogènes complexes, synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (**Abderrazak et Joël, 2007**). Ils sont distribués différemment dans toutes les parties de plantes selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Ils contribuent efficacement dans la défense de plante face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, d'une part, et Ils pourraient jouer un rôle dans les relations entre les plantes et leur environnement d'autre part, d'où plusieurs composés phénoliques peuvent agissent comme agents protecteurs de la phytoalexine contre la lumière UV et jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction des plantes (**Ignat et al., 2011**). L'intérêt pour les composés phénoliques a augmenté au cours de la dernière décennie en raison de leur activité structurelle et protectrice dans les plantes, mais aussi en raison des effets anti-allergéniques, anti-athérogènes, anti-inflammatoires, antimicrobiens, anti-thrombotiques, cardioprotecteurs et vasodilatateurs qu'ils présentent chez les animaux (**Balasundram et al., 2006**). L'objectif est de les utiliser dans les aliments et préparations pharmaceutiques pour remplacer des antioxydants synthétiques (BHA, BHT, etc.).

II. 1. Composés phénoliques :

Avec plus de 8000 structures phénoliques connues, les composés phénoliques constituent l'une des grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal (**Beta et al., 2005**). Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Cette désignation concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules

contiennent une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques respectivement (Macheix et al., 2005). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Ils peuvent être regroupés en plusieurs classes dont la plupart ont des représentants chez de nombreux végétaux (Tableau 3).

Tableau 3 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

<i>Squelette Carboné</i>	<i>Classe</i>	<i>Exemples</i>
C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone
C6-C1	Acides phénols Benzoïques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline
C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde
C6-C3	Acides phénols Cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique
C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine
C6-C1-C6	Xanthonés	Bellidifoline, mangocétine
C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangéol, Pinosylvine
C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, Roténoïde
(C6-C3) ₂	Lignanes	Matairésinol
(C6-C3-C6) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone, Hinokiflavone
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins

Les premiers critères de distinction entre ces classes concernent le nombre d'atomes de carbone constitutifs, la structure de base du squelette carboné élaboré par la voie shikimate, le degré de modification de ce squelette et la possibilité de se lier avec d'autres molécules de

métabolites primaires et secondaires. Il existe de nombreuses classes de ces composés : acides phénols, flavonoïdes, coumarines et tanins. Ces structures peuvent également peuvent diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...), ce qui donne une grande variété de structures (**Harbone, 1998**).

D'un point de vue biosynthèse, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (**Bruneton, 2009**).

II.1.1. Phénols, acides phénols et phénylpropanoïdes :

Les phénols sont des molécules aromatiques, possédant un groupe hydroxyle OH fixé sur un carbone d'un cycle benzénique avec une formule générale (Ar-OH).il est rare de trouver les phénols libres (vanilline, catéchol, pyrogallol, orcinol, Phloroglucinol) dans les plantes (**figure 2**) (**Harbone, 1998**).

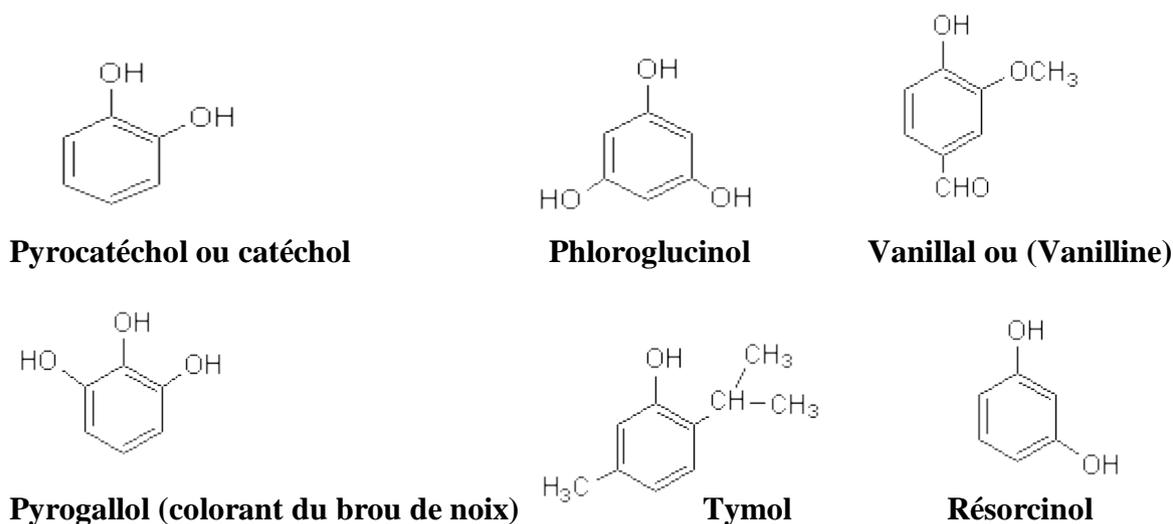
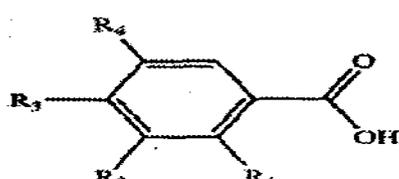


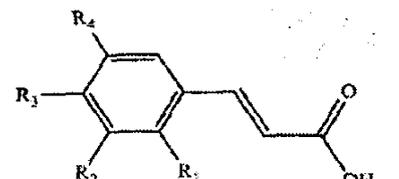
Figure 2 : Quelques exemples de phénols.

Les acides phénoliques sont universellement rencontrés chez les plantes surtout alimentaires, ils sont divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) et les dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) (**figure 3**) (**Bruneton, 2009**).

Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide *p*-coumarique, caféïque, férulique et sinapique (**Pandey et Rizvi, 2009**).



Les acides hydroxybenzoïques

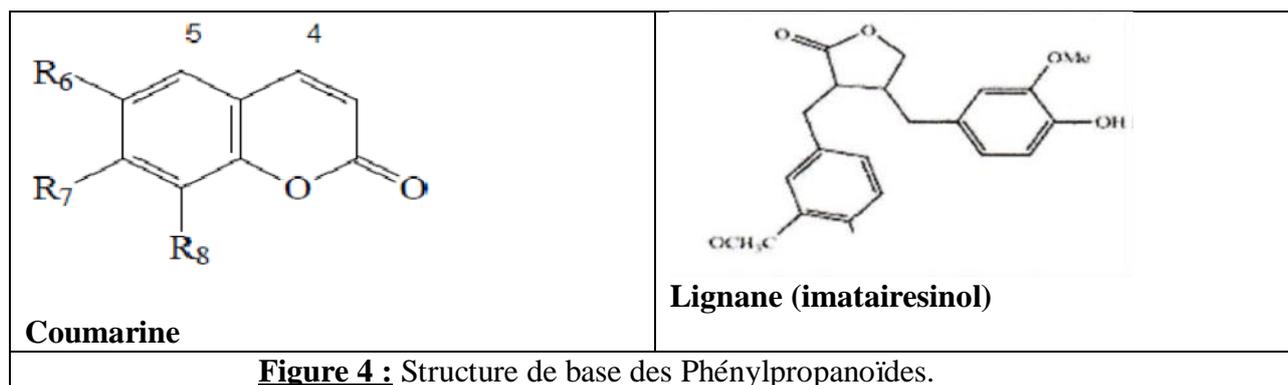


Les acides hydroxycinnamiques

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac.benzoïque	H	H	H	H	Ac.cinnamique	H	H	H	H
Ac salcylique	OH	H	H	H	Ac. <i>o</i> -coumarique	OH	H	H	H
Ac. <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	OH	H	Ac. <i>m</i> -coumarique	H	OH	H	H
Ac.gallique	H	OH	OH	OH	Ac. <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Ac.syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ac. Férulique	H	H	OH	OCH ₃
Ac.gentisique	OH	H	H	OH	Ac.sinapique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Ac.protocatéchique	H	OH	OH	H	Ac.caféïque	H	OH	OH	H

Figure 3 : Principaux acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques.

Les Phénylpropanoïdes dérivent de l'acide aminé phénylalanine et peuvent contenir un ou plusieurs résidus en C6-C3. Parmi les phénylpropanoïdes, on trouve (**figure 4**) : les dérivés directs (phénylpropènes), dérivés par cyclisation (coumarines), les lignanes ((C6-C3)₂) et les lignines ((C6-C3)_n) (**figure 4**) (**Cseke et al., 2006; Bruneton, 2009**).



II.1.2. Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont un groupe de dérivés de benzo-g-pyrone. Ils se présentent sous la forme d'aglycones, de glycosides et de dérivés méthylés et sont largement distribués dans le règne végétal (Škerget et al., 2005). Ils apparaissent généralement sous forme glycosylée se qui les rend moins réactifs et plus solubles dans l'eau. Le glucose est le sucre le plus fréquemment rencontré (Macheix et al., 2005; Bruneton, 2009). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygénés, qui désigne la lettre C (figure 5) (Dacosta Y, 2003). Dans la plante, ils sont très souvent liés aux sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre (Macheix et al., 2005; Bruneton J, 2009).

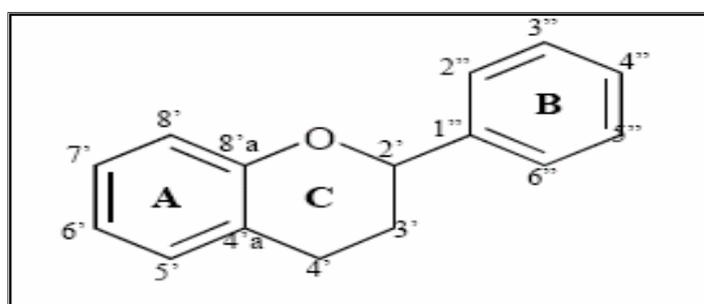


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

Les génines sont divisés en trois classe, 2-phénylchromanes (flavan-3-ols, flavan-4-ols, flavane-3,4-diols), les 2-phénylchromones (flavones, flavinols, flavonones et flavononols) et les flavyliums (anthocyanidines, chalcones et aures) (De Rijke et al., 2006). La présence ou l'absence de substituant sur l'argénine, le degré de polymérisation, le nombre et la position des groupes hydroxyles sont les critères qui diffèrent entre les différentes classes de flavonoïdes (figure 6) (De Rijke et al., 2006).

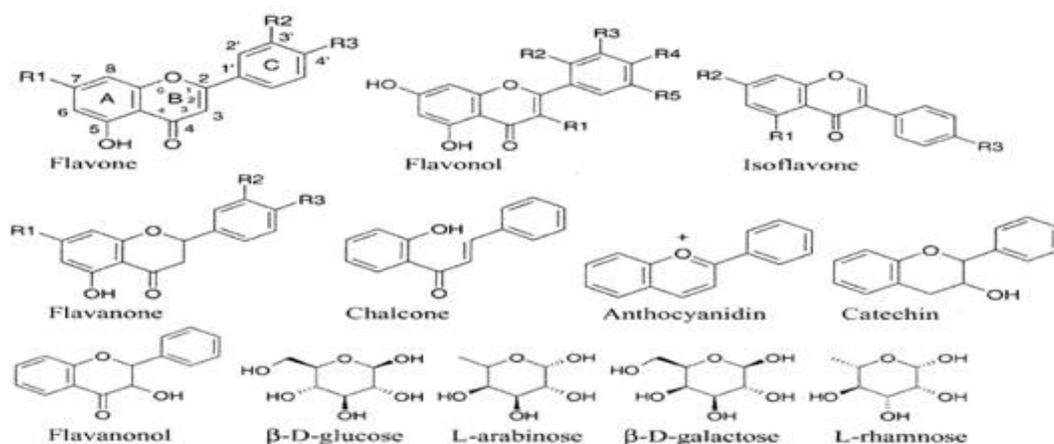
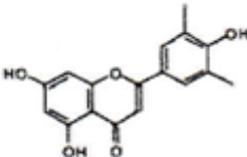


Figure 6 : Structures des sous-classes de flavonoïdes principales. (De Rijke et al., 2006).

Les flavonoïdes au sens strict, sont représentées dans le **tableau 4**, leur structure porte le noyau aromatique B en position 2 et la distinction des sous classe se fait suivant la conformation de la structure centrale C (pyrone). Au sens large, il faut inclure aussi les flavanols (flavan-3-ols), les flavanediols (flavane-3,4-diols ou leucoanthocyanidines) et les anthocyanidols (anthocyanidines) (**tableau 5**).

Tableau 4 : Principales sous-groupe des Flavonoïdes au sens strict.

<i>Les sous-groupe des Flavonoïdes</i>	<i>Les flavonoïdes représentatifs</i>
	Apigénine Lutéoline Tricine

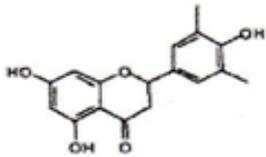
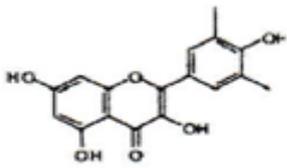
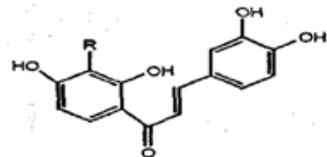
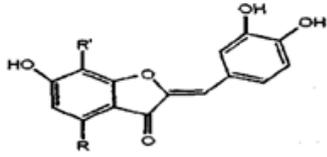
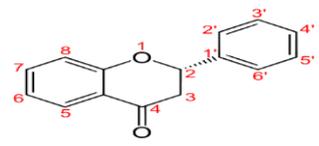
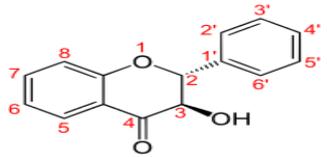
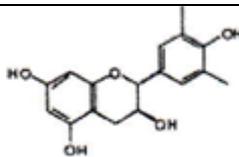
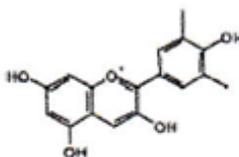
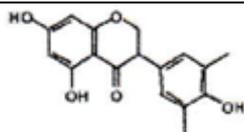
	<i>Flavanones</i>	Hesperitine Naringenine Malvidin
	<i>Flavonols</i>	Quercétine Myrcétine Morine Kaempférol Isorhamnétine
	<i>Chalcones</i>	Butéine Okanine
	<i>Aurones</i>	Sulphorétine Aureusidine Leptosidine
	<i>Flavanones</i>	Hesperitine Naringenine
	<i>Flavanonols</i>	Taxifoline

Tableau 5 : Principales sous-groupe des Flavonoïdes au sens large.

<i>Les sous-groupe des Flavonoïdes</i>	<i>Les flavonoïdes représentatifs</i>
	Epigallocatechine Catéchine Epicatechine
<i>Flavanols</i>	Pélargonidine la cyanidine
	
<i>Anthocyanidine</i>	



Genistein
Daidzein

Isoflavonoïdes

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher, 2003; Williams et Grayer R.J, 2004; Kueny-Stotz, 2008**).

II.1.3. Stilbènes:

Les stilbènes contiennent deux groupements phényle reliés par un pont méthylène à deux atomes de carbone avec une structure de base C₆-C₂-C₆. La présence de stilbènes dans l'alimentation humaine est assez faible. La plupart des stilbènes dans les plantes agissent comme phytoalexines antifongiques, composés synthétisés uniquement en réponse à une infection ou une blessure. L'un des polyphénols stilbènes les mieux étudiés est le resvératrol (3,4', 5'-trihydroxystilbène) (**figure 7**), que l'on trouve principalement dans le raisin (**Pandey et Rizvi, 2009**).

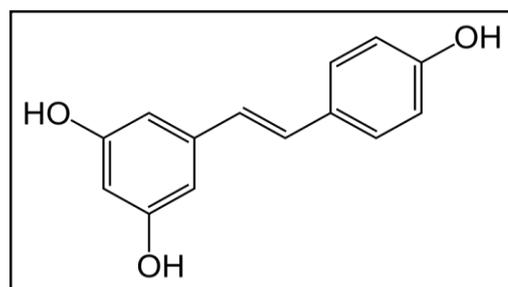


Figure 7 : Structure de trans-resveratrol

II.1.4. Xanthones :

Les xanthones ont une structure de base C₆-C₁-C₆ (**figure 8**). Ils sont isolés généralement à partir des plantes supérieures. Parmi les composés représentatifs de cette classe : le gaboxanthove, le xanthéne-9-one et le globuliférine (**Bruneton J, 2009**).

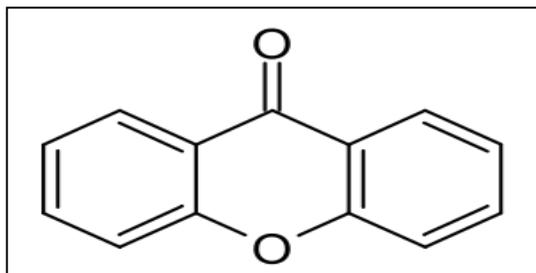


Figure 8 : Structure de base des xanthonnes.

II.1.5. Quinones et Emodols :

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges et possédant deux fonctions cétones. Elles sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (Arif et al., 2009). Les emodols sont des dérivés hydroxyanthracéniques (**figure 9**).

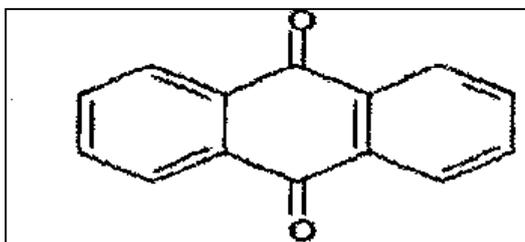


Figure 9 : Structure de base d'émoldols et d'anthraquinones.

II.1.6. Tanins :

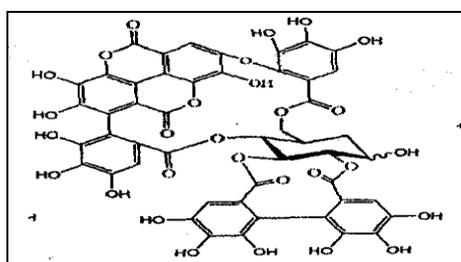
Les tanins sont des substances végétales de la famille des polyphénols, le plus souvent hydrosolubles, de structure variées, de saveur astringente et de haut poids moléculaire (Macheix et al., 2005). Ils possèdent la capacité de précipiter les protéines, alcaloïdes et polysaccharides, à partir de leur solution aqueuse (Bruneton, 2009; Ozcan et al., 2014).

Ils sont classés en deux groupes selon leur structure chimique (**figure 10**) :

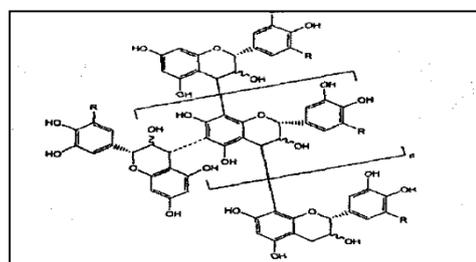
✚ **Tanins condensés (proanthocyanidines) :** ce sont des polymères de flavanols. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type C₄-C₈ ou C₆-C₈, on les appelle également proanthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (prunes, fraises et pommes ou des boissons) (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Ils sont non hydrolysables mais qui peuvent être dépolymérisés en anthocyanidols lorsqu'ils sont traités à chaud par un acide. Ils sont habituellement dénommés d'après l'anthocyanidol ainsi libéré (**Harbone, 1998**).

✚ **Tanins hydrolysables :** Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase) en ose (généralement le glucose) et en acides phénols. Selon la nature de l'acide phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des *tanins galliques*, soit l'acide hexahydroxy di-phénique et ses dérivés dans le cas des *tanins éllagiques* (**Bruneton, 1999**).



Terchebuline



R = H: Procyanidine

R = OH: Prodelphinidine

Figure 10 : Structure d'un tannin hydrolysable et des tannins condensés.

II.2. Les huiles essentielles :

II.2.1. Généralités :

Une huile essentielle (HE) peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (**Moro Buronzo.A, 2008**). En réalité, les huiles essentielles sont l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un mélange complexe pouvant contenir plus de 300 composés des substances huileuses, volatiles et odorantes, appartenant à la classe des Isoprénoides (**figure 11**). Elles sont sécrétées par des plantes

aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation, expression de l'écorce des fruits, extraction par enfleurage, extraction par CO₂ liquide ou par extraction avec des solvants (**figure 11**)(Iserin et al, 2007).

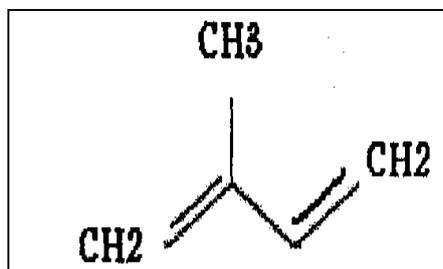


Figure 11 : Structure d'Isoprène

Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (poils sécréteurs, cellules sécrétrices, poches sécrétrices ou canaux sécréteurs) suivant les familles botaniques (**Bruneton, 1999**).

II.2.2. Intérêt des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour traiter certaine maladie interne et externe (infections bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En dentisterie, plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (**Chibani, 2013**).

Les HE sont également utilisés pour massage, inhalation ou ingestion. En plus de leurs utilisations thérapeutiques, les huiles essentielles sont appliquées dans les cosmétiques (aromatisants, des savons, parfumerie... etc.). Dans l'industrie alimentaire, elles sont utilisées pour avoir une préservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une meilleure qualité organoleptique, et pour réduire la prolifération des micro-organismes. Les huiles essentielles sont utilisées dans les nutriments comme conservateurs antioxydants et antimicrobiens (**Chibani, 2013**).

II.2.3. Compositions chimiques :

La composition chimique des HEs est complexe et peut être varié selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et la méthode d'extraction (**Guignard, 2000**). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par

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

La plupart des composants des HE sont inclus dans deux groupes selon la voie métabolique empruntée : les composés terpéniques (hydrocarbures) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (composés oxygénés) (Djilani et Dicko, 2012).

1) Les terpénoïdes :

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 Composés différents sont décrits dans la littérature. Ils sont décrits d'une structure basique à cinq atome de carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène. (Calsamiglia et al., 2007), Selon le nombre répétition de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}) et diterpénoïdes (C_{20}). Dans la composition de la plupart des HEs les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes constituent la majeure partie (Karray-Bouraoni et al., 2009).

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (ex. l'essence de Térébenthine) tandis que dans d'autres, l'essentiel de l'essence est constitué de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le gout des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces oxygénés comprennent les alcools (géraniol, linalol), d'esters (acétate de linalyle), d'aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes (Paris et Hurabielle, 1981 ; Svoboda et Hampson, 1999).

a) Les monoterpénoïdes :

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

b) Les sesquiterpénoïdes :

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est $C_{15}H_{24}$ soit une fois et demie

(sesqui) la molécule des terpènes (**Belaiche, 1979**). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (**Rahal, 2004**). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine, β , artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (**Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004**).

2) Les phénylpropanoïdes :

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine (**Khenaka, 2011**). Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (**Calsamiglia et al., 2007 ; Khenaka, 2011**).

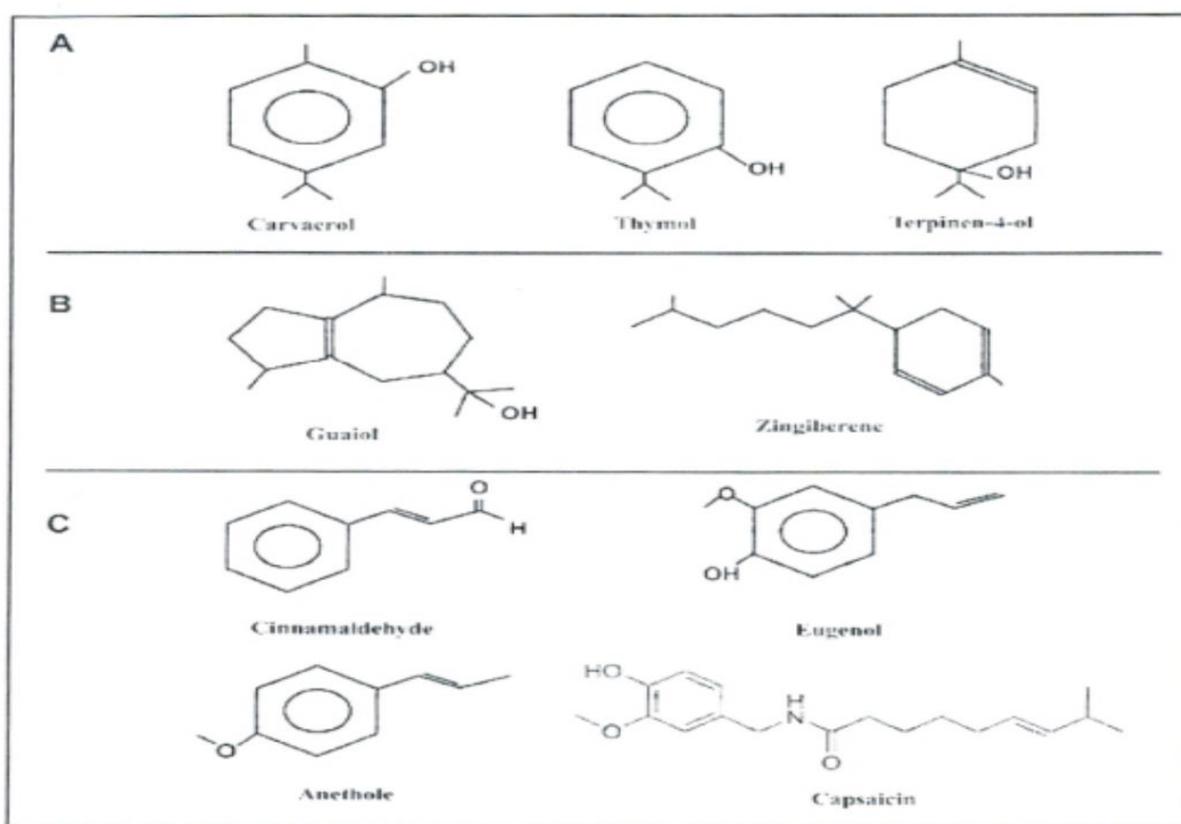


Figure 12 : Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes (**Khenaka, 2011**).

II.2.4. Les Principales méthodes d'extraction :

II.2.4.1. La distillation :

La distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation). La distillation peut être effectuée avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus à la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau (**Bendjilali, 2004**).

Le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation (**Bruneton, 1999**).

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal (**Bendjilali, 2004**) (**Figure 13**)

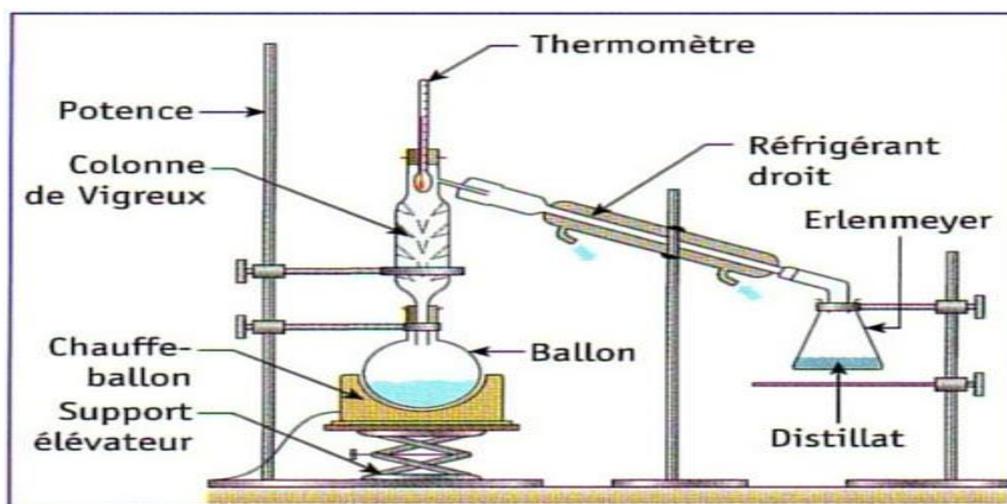


Figure13 : Montage d'extraction des huiles essentielles par distillation.

II.2.4.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les plantes peuvent être entraînés par la vapeur d'eau, en raison de leur pouvoir d'ébullition relativement faible et de leur hydrophobicité. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile

essentielle se sépare par décantation (**Bruneton, 1993**). (**Figure 14**).

Selon sa densité, il peut être collecté à deux niveaux :

- au niveau supérieur du distillat, s'il est plus léger que l'eau, ce qui est courant
- au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion (**Bruneton, 1993**).

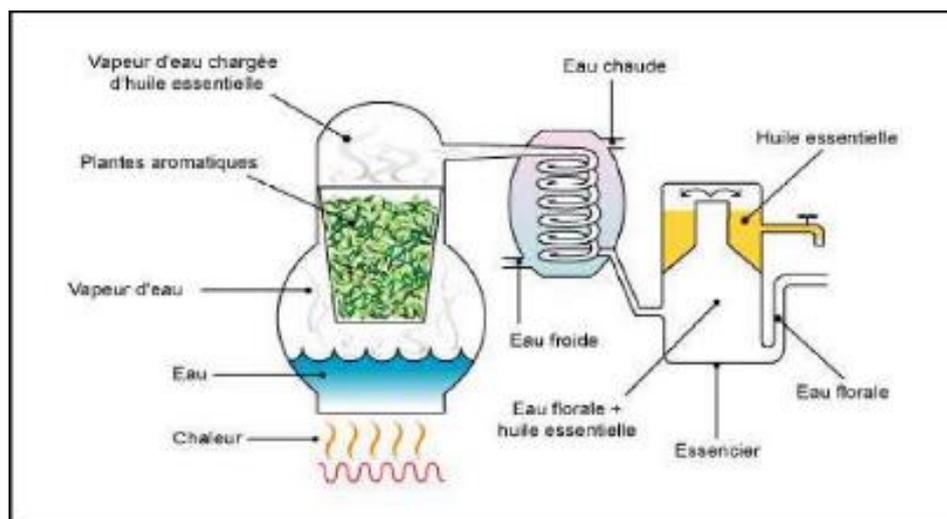


Figure 14 : Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

II.2.4.3. L'hydrodistillation :

Distillation à l'eau ou « hydrodistillation » (**Figure 15**) : le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation (**Bruneton, 1999**), l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (**Lamamra, 2018**).

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation (**Brian, 1995**). Elles sont généralement utilisées en cas des 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. Parmi les huiles extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron (**Lamamra, 2018**).

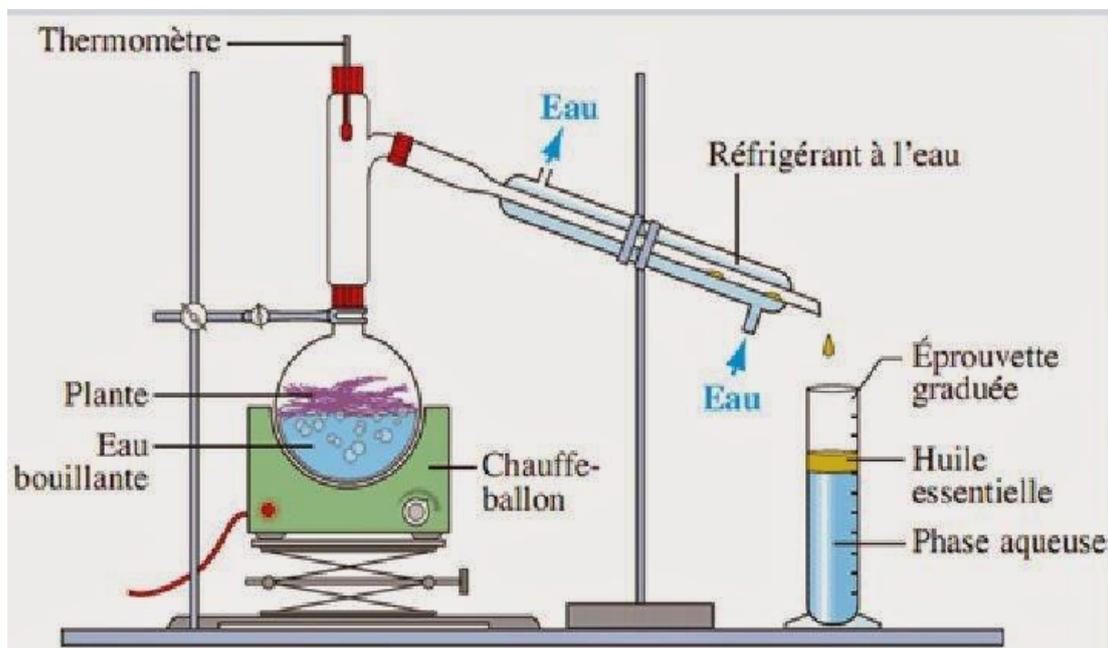


Figure 15 : Montage d'extraction par Hydrodistillation.

II.2.4.4. L'expression à froid :

C'est le plus simple des procédés, mais il ne s'applique qu'aux agrumes dont l'encore des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce processus consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches pour libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu et appelé essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (**Belaiche, 1979**).

II.2.4.5. L'extraction par enfleurage :

Ce procédé tire parti de la liposolubilité des composants parfumés des plantes dans les graisses. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de fines couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par la graisse peut prendre de 24H (Jasmin) à 72 H (Tubéreuse). Les pétales sont enlevés et remplacés par des pétales frais jusqu'à ce que la graisse soit saturée. La graisse est épuisée avec un solvant qui est ensuite évaporé sous vide (**Belaiche, 1979 ; France Ida, 1996**). Pour certaines plantes, les fleurs sont immergées dans de la graisse chauffée, appelée

enflourage chaud ou « digestion » (**Bruneton, 1999**). Cette méthode également appelée macération à chaud par d'autres auteurs est principalement utilisée pour les fleurs délicates qui perdent très rapidement leurs arômes après la cueillette, comme les violettes et certains lys (**France-Ida, 1996**). Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, 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 (**Lamamra, 2018**). (**Figure 16**)

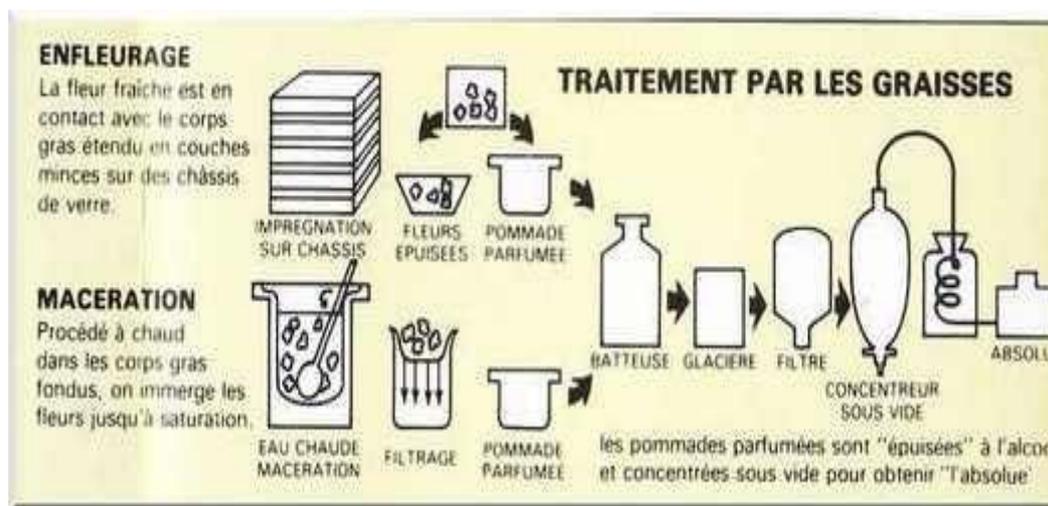


Figure 16 : Technique d'extraction par enflourage.

II.2.4.6. Autres méthodes d'obtention des extraits volatils :

II.2.4.6.1. Extraction par solvants :

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation (**Belaiche, 1979 ; Duraffourd et al., 1990**). Elle est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait en construction variée, continu, semi-continu ou discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition, qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant se traduit par un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par solvants est très coûteuse en raison du prix de l'équipement et de la forte consommation des solvants. (**Brian, 1995**).

L'extraction par les solvants présente cependant des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits : de nombreuses substances peuvent donc être trouvées dans les bétons (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, certaines coumarines) et nécessitent une purification plus loin, deuxièmement, la toxicité des solvants et leur présence sous

la forme de traces résiduelles dans l'extrait final (Bruneton, 1999). En effet, (Viaud, 1993) indiquent que les proportions de solvants résiduels dans les bétons sont entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles huiles sont donc non recevables à l'usage médical par contre, elles sont recevables en parfumerie. (Figure 17)



Figure 17 : Technique d'extraction par solvant.

II.2.4.6.2. Extraction par micro-ondes :

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (Paré, 1997). 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 (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes au grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (France Ida, 1996). Ce procédé (Figure 18), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (Bruneton, 1999). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon (Scheffer, 1996) que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative.

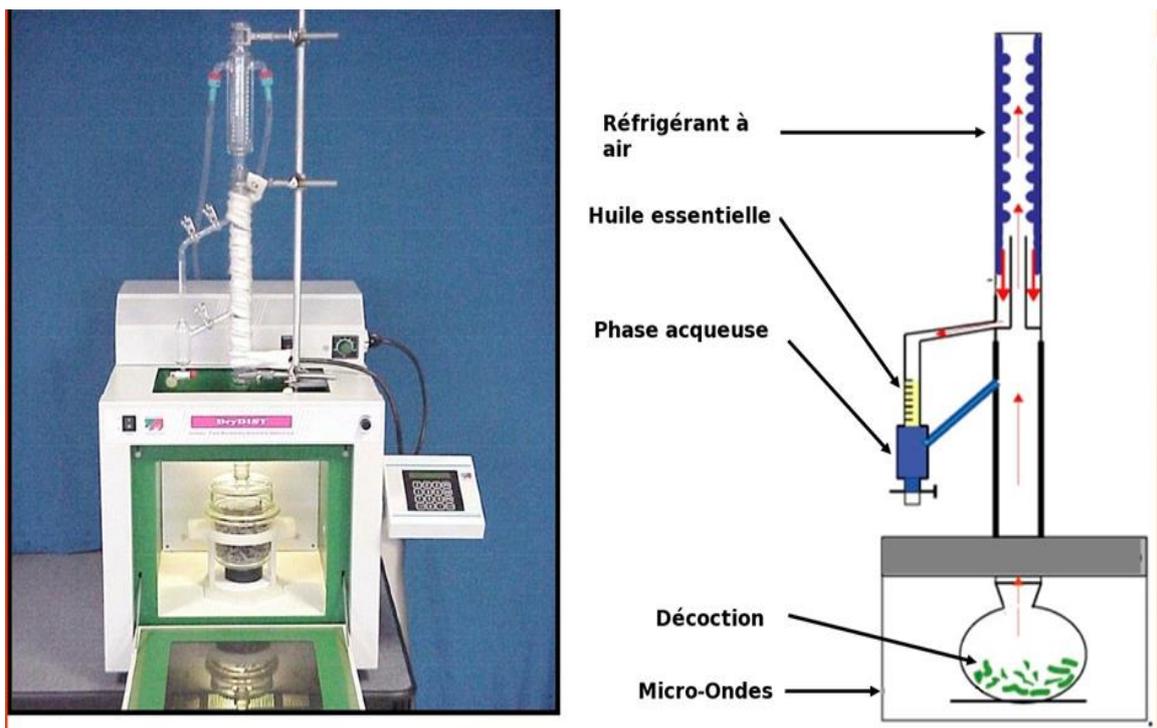


Figure 18 : Extraction des huiles essentielles assistées par micro-ondes.

II.2.5. Caractérisation et identification des composés phénoliques et des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des matières premières pour les l'industrie pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. La parfaite connaissance de la composition chimique de ces substances permettrait aux professionnels des secteurs susmentionnés de contrôler leur qualité et de les valorisées. L'identification des composants d'une HE reste une délicate opération qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques qui sont dans certains cas complémentaires (Joulain, 1994).

La chromatographie est le processus fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle est basée sur les différences d'affinité de la substance à analyser par rapport à de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique utilisée, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, se produit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, ou de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993). Plusieurs méthodes existent :

II.2.5.1. La Chromatographie Phase Gazeuse CPG :

La Chromatographie Phase Gazeuse CPG (**figure19**) est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner des informations sur la nature des molécules et les zones de pointe offrent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (SM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60% (**Bicchi et al., 2008**). En effet, le squelette et en particulier la composition élémentaire des constituants organiques influence sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantifications réelles avec les normes interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique (**Bicchi et al., 2008**).

La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en gaz est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant par rapport aux composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), nous parlons de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (**Audigie et al, 1995**).

La CPG permet une évaluation quantitative et qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. Elle a de nombreux avantages : facilité d'utilisation, temps d'analyse assez court et résultats fiables (**Bruneton, 1999**).

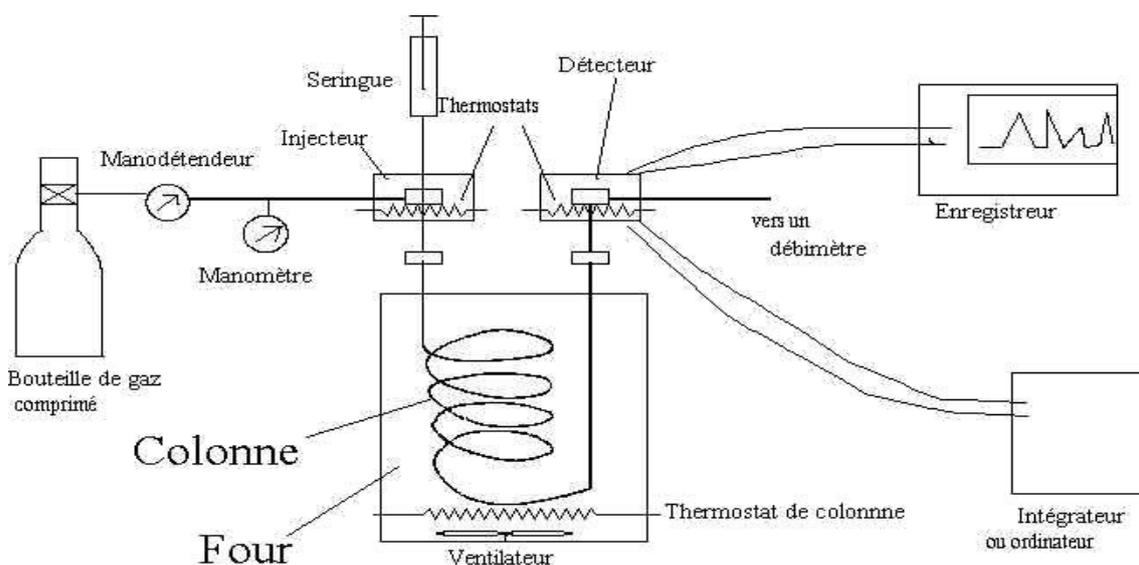


Figure 19 : Schéma du Principe de la chromatographie en phase gazeuse (**Besombes, 2008**).

II.2.5.2. Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès réalisés en traitement en temps réel du signal, la création de bases de données de spectres de masse et le développement d'algorithmes pour comparer le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la base de données sont à l'origine de la généralisation de l'utilisation de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques.

D'un point de vue analytique, d'important progrès a été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (IE), connu sous le nom de CPG/SM-(IE), est la technique régulièrement utilisée pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste en bombardement avec des d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (**Anton and Lobskin, 2005**). (Figure 20).

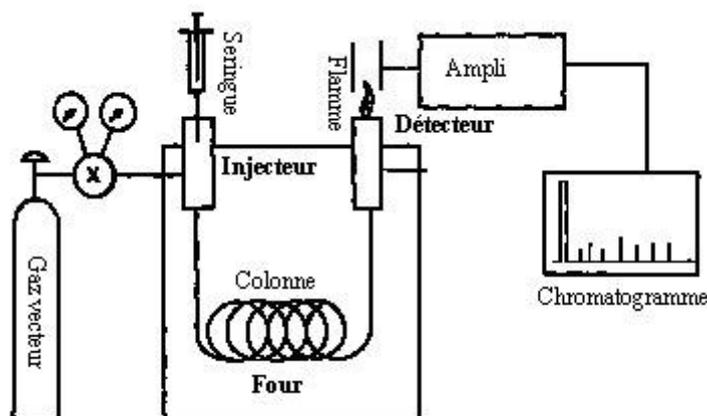


Figure 20 : Schéma du principe du fonctionnement du couplage (**Besombes, 2008**).

II.2.5.3. Chromatographie sur couche mince :

La Chromatographie sur couche mince CCM (**Figure 21**) est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide des fractions obtenues après séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins pour les petites quantités, lorsque d'autres techniques ont montré leurs limites (**Pradeau et Dauphin, 2007**). La chromatographie sur couche mince (CCM) est principalement basée sur les phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un mélange de solvants ou de solvant, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre

ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après l'échantillon a été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Caude et Jardy, 1996). Après la migration, les molécules sont identifiées soit par lumière ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou une exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, cela permet de définir la référence frontale R_f caractéristique de chaque composé. (Bruneton, 1999) précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins efficace que la chromatographie en phase gazeuse, puisse être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles.

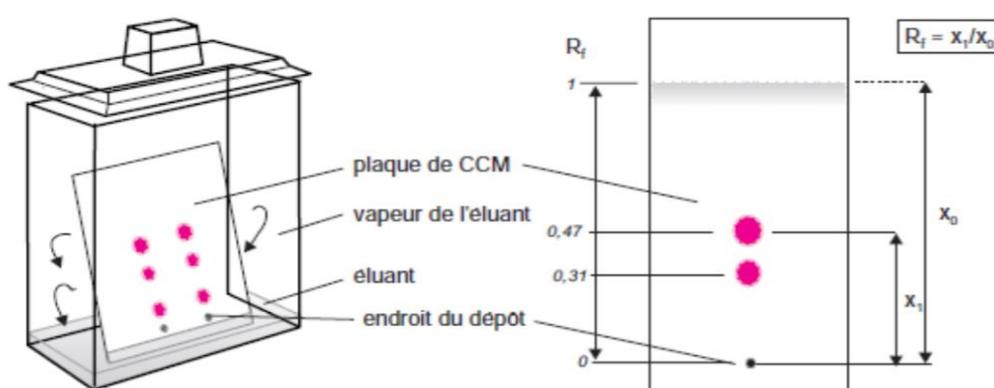


Figure 21 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM (Rouessac et al., 2004)

II.2.5.4. La chromatographie liquide à haute performance :

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (figure 22) utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5 μm . Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (Audigie et al., 1995 in Bencheikh, 2018). Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse (Bruneton, 1999).

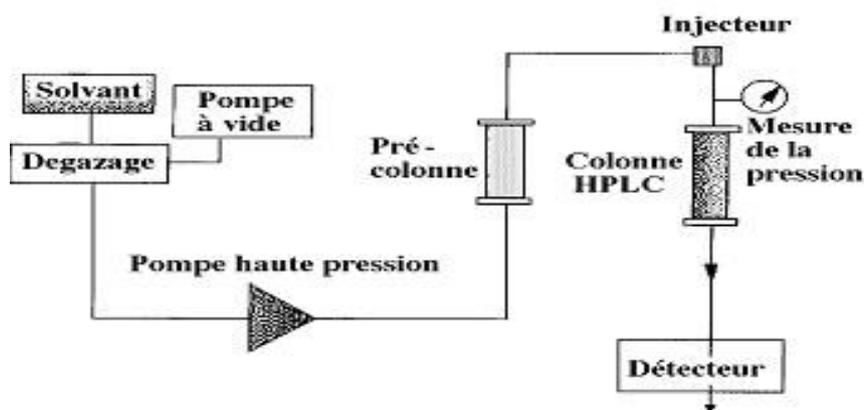


Figure 22 : Schéma simplifié d'un appareil d'HPLC

II.2.5.5. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN :

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (Platzer, 2002).

II.2.6. Conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont constituées de molécules relativement instables dans le temps. Cette observation a donc nécessité la mise en place de précautions particulières pour leur conservation. Du fait du grand nombre de composés chimiques, représente une HE, les possibilités de dégradation sont nombreuses. On peut observer des réactions telles que la photo-isomérisation, photocyclisation, coupure oxydative, peroxydation et décomposition en cétones et alcools, thermo-isomérisation, hydrolyse, transestérification (Bruneton, 2016)

Ces réactions de dégradations sont objectivées par la mesure d'indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide...), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité...) et/ou par l'analyse chromatographique. Les

conséquences directes sur l'huile essentielle sont une éventuelle modification de ses propriétés et /ou une remise en cause son innocuité.

Afin d'éviter autant que possible l'altération des huiles essentielles, il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des HE (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996). **(Laurent J, 2017)**

Les normes recommandent, l'utilisation de flacons propres et secs en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, presque complètement remplis et hermétiquement fermés (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte). **(Raynaud, 2006)**

Des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques. Il existe des marques d'HE qui proposent un double flaconnage pour améliorer les conditions de conservation. C'est le cas du Comptoir aroma :

- Flacon en verre ambré pour protéger les HE des rayons UV lors de l'utilisation
- Boitier en aluminium pour protéger les HE de la lumière lors du stockage

Garder toujours le flacon d'origine (avec instruction) pour éviter les erreurs. Il doit toujours être bien scellé par un bouchon étanche pour éviter l'évaporation et tout type de dommage. Les conserver de préférence « debout » pour éviter l'action corrosive des HE sur le compte-gouttes et le bouchon en plastique.

Le récipient doit être conservé au sec, au frais, à l'abri de la lumière et à une température de 5° (mettre au réfrigérateur si nécessaire). Ne pas exposer les bouteilles à la lumière ou à l'air pendant de longues périodes, pour éviter l'oxydation des composants, car cela peut rendre l'HE plus toxique. **(Laurent J, 2017).**

Chapitre III : Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être dotées de propriétés antiseptiques et antimicrobienne. Beaucoup d'entre eux ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, ils se sont également avérés avoir des propriétés anticancéreuses. (Valnet, 2005)

L'activité biologique d'une huile essentielle doit être liée à sa composition chimique et aux éventuels effets synergiques entre ses composants. Sa valeur réside dans son « totum » ; c'est-à-dire la totalité de ses constituants et pas seulement dans ses composés majoritaires. (Lahlou, 2004).

III.1. Activité antimicrobienne :

Les huiles essentielles sont connues pour posséder une activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être utilisées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Rasooli et al., 2008). Leur spectre d'action est très large, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent une résistance aux antibiotiques. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus sont particulièrement efficaces contre les staphylocoques aureus résistants à la méthicilline (SARM) (Tohidpour et al., 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips, 2009). Cette activité varie également d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalembe et Kunicka, 2003). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou, 2009).

(Hulin et al., 1998) rapportent que les huiles essentielles semblent avoir plusieurs modes d'action sur différents microorganismes. Ces modes d'action sont :

- Interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, entraînant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.
- Altération des différents systèmes enzymatiques, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie cellulaire et la synthèse des composants structuraux.
- Destruction ou inactivation du matériel génétique. (Figure 23)

En raison du mode d'action des HEs qui dépend principalement du type et des caractéristiques des composants actifs : (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et de leurs effets synergiques (Zhiri, 2006). En particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer

dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Carson et al., 2002).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* également été signalée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les HEs peuvent également inhiber la synthèse de l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides. (Cox et al., 1991).

L'utilisation des antibiotiques pour contrôler les micro-organismes pathogènes est limitée en raison de leurs effets cancérigènes, de leur toxicité aiguë et leur danger potentiel pour l'environnement en plus du problème de résistance bactérienne à cette classe thérapeutique. Plus récemment, la prévalence de la résistance aux antimicrobiens a incité les chercheurs à rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes pour inhiber diverses bactéries pathogènes humaines (Rudramurthy et al., 2016). À cet égard, l'utilisation des huiles essentielles pour contrôler l'épidémie des bactéries pathogènes peut être utile pour lutter contre diverses maladies infectieuses (Mulyaningsih et al., 2010).

L'action des HEs s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Raut et Karuppayil, 2014). La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane plasmique hydrophile externe dans les bactéries à Gram négatives empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes qui composent la majorité des huiles essentielles. Cette caractéristique confère aux bactéries négatives une résistance à l'huile et même aux antibiotiques (Lewis et Ausubel, 2006).

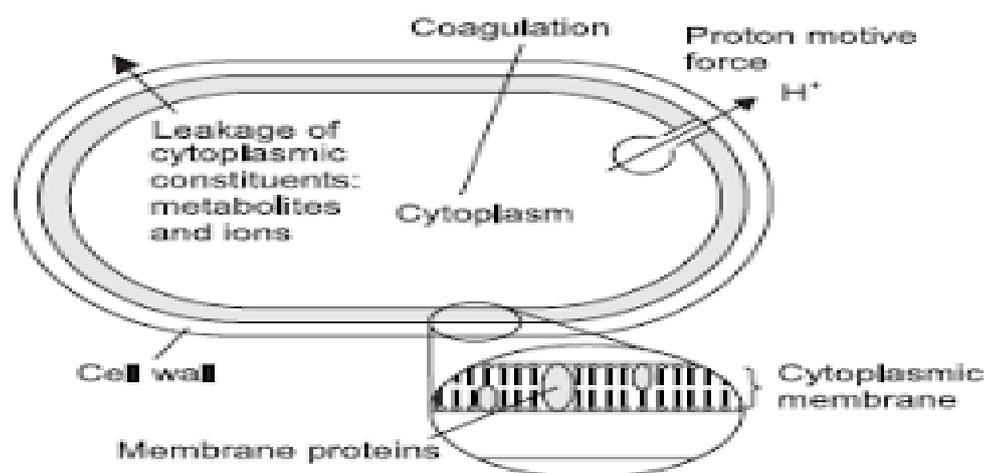


Figure 23 : Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles

III.1.1 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne :

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles implique plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, leur volatilité, la nécessité de les tester à faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes peuvent influencer les résultats. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon :

1. Le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
2. La nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, en puits, en solution alcoolique ou dispersion dans un émulsifiant.

Une première étape consiste à faire un « screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles.

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes après sous-culture sur milieu sans antibiotique (**Andrews J M, 2001**).

III.1.1.1. Méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé :

La technique consiste à utiliser des disques en papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose ensemencée uniformément avec une suspension des bactéries à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de l'agar laissant des zones d'inhibition autour des disques (**Biyiti et al., 2004**).

III.1.1.2. Méthode de dilution :

Ces méthodes peuvent être appliquées dans de la gélose ou du bouillon, à partir desquelles nous pouvons déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (**Prescott et al., 2010**). Il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les CMI mesurées par les techniques de dilution. Cette relation, appelée droite de concordance ou droite de régression (**Guérin-Faubleé et Carret, 1999**) dont la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai (**El kalamouni et al., 2010**).

a) En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans des puits (méthode de microdilution) (**photo 1**) ou dans une série de tubes (méthode de macrodilution) (**photo 2**) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou le puit contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien ou aucune croissance n'est visible (**Euzéby, 2009**).



Photo 1 : Méthode de micro-dilution



Photo 2 : Méthode de macro-dilution

b) En milieu solide :

L'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum microbien à étudier. Après incubation, la CMI de

chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien (**figure 24**) (**Euzéby, 2009**).

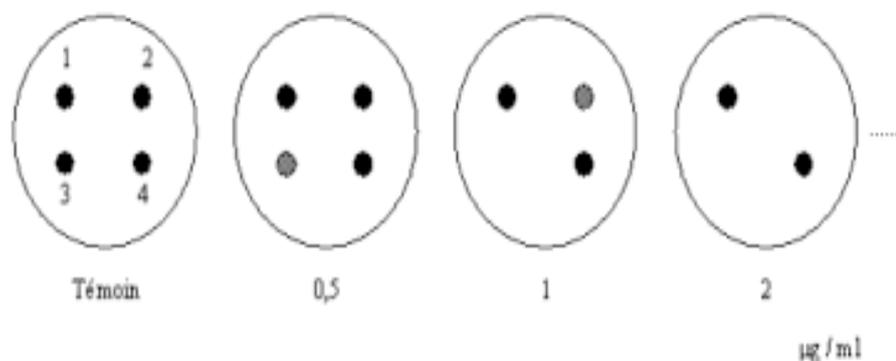


Figure 24 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

III. 2. Activité antioxydant :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à des concentrations relativement faibles, de concurrencer d'autres substrats oxydables et donc de retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats, ce sont des éléments protecteurs qui agissent comme capteurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme (**Shahidi, 1997**), ce sont des composés hautement réactifs avec un seul électron nécessaire aux mécanismes vitaux (**Bartosz, 2003**)

Selon **Abbes (2014)**, la stabilité structurelle des antioxydants leur permet d'agir pour former des produits finis non radicaux en :

- ❖ Réagir rapidement avec un radical d'acide gras avant de pouvoir réagir avec un nouvel acide gras ;
- ❖ Absorber l'excès d'énergie de l'oxygène singulet et le convertir en chaleur ;
- ❖ S'oxydant plus rapidement qu'un substrat à risque d'oxydation.

L'activité antioxydant peut être primaire ou préventive (indirecte) (**chemloul, 2014**). Ce dernier est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que le complexe formé par les ions métalliques ou la réduction d'oxygène. (**Madhavi et al., 1996**). D'un autre côté, les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs (**Kohen et Nyska, 2002**). Cependant, lorsqu'il y a un excès des radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont également impliquées dans la pathogenèse liée aux dommages à l'ADN et aux protéines causant

des mutations génétiques et protéiques, des dommages glucooxydatifs et la dégradation des lipides de la membrane cellulaire (Carocho et Ferreira, 2013).

Les radicaux libres ne sont pas toujours nocifs, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre l'inflammation et de lutter contre les bactéries (Pincemail et Defraigne, 2004). Cependant la notion de « radicaux libres » et de « stress oxydant » est de plus en plus utilisée pour expliquer les différentes conditions pathologiques, soit comme facteur déclenchant, soit comme facteur de complication dans leur évolution (Halliwell et Whiteman, 2004 ; Huang et al, 2004).

Le stress oxydatif, principale cause initiale de plusieurs maladies : cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, diabète, et les rhumatismes (Favier, 2003), maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinales et l'ulcère les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Atawodi, 2005). (Figure 25)

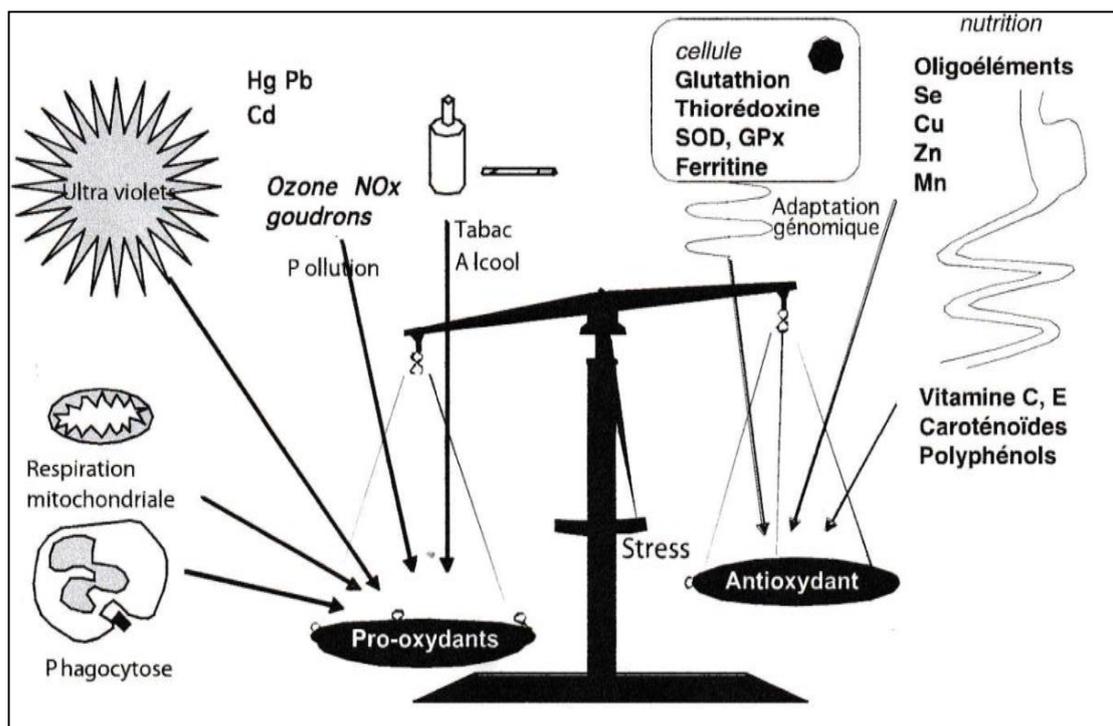


Figure 25 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

III.2.1. Evaluation in vitro de l'activité antioxydant :

Diverses méthodes sont utilisées pour étudier les propriétés antioxydantes des échantillons (extraits de plantes, antioxydants commerciaux...etc.). L'activité antioxydante ne devrait pas être conclue sur la base d'un seul modèle d'essai antioxydant. Et en pratique,

plusieurs procédures de test *in vitro* sont effectuées pour évaluer les activités antioxydantes avec les échantillons d'intérêt. Ces analyses diffèrent entre eux en terme de mécanismes de réaction, oxydants et espèces cibles (les sondes), états des réactions et la forme dont sont exprimés les résultats. En plus, même lorsque seulement une de ces analyses est envisagée, ça engendre d'autres paramètres à prendre en considération tels que : le solvant, le temps de réaction et le pH (Magalhães et al., 2008).

Par conséquent, il est difficile de comparer complètement une méthode à l'autre (Alam et al., 2013). On va citer quelque tests :

III.2.1.1. Le test de piégeage de radical DPPH• :

La molécule 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyl est caractérisée comme un radical libre stable en raison de la délocalisation de l'électron de rechange sur la molécule dans son ensemble, de sorte que la molécule ne se dimérise pas, comme ce serait le cas avec la plupart des autres radicaux libres.

La délocalisation de l'électron donne également naissance à la couleur violette profonde, caractérisée par une bande d'absorption dans une solution d'éthanol ou méthanol se situe vers 515-517 nm. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à celle d'un substrat (AH) qui peut donner un atome d'hydrogène, alors cela donne la forme réduite avec la perte de cette couleur violette (Gouveia et Castillo, 2012).

III.2.1.2. Le test de la réduction de fer (FRAP) :

Cette méthode mesure la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique. Il est basé sur la réduction du complexe ferrique de la tripyridyl-s-triazine 2.4.6 [Fe (III) - (TPTZ) 2]3+ au complexe ferreux coloré par le bleu [Fe (II) - (TPTZ) 2]2+ à faible pH (Alam et al., 2013). Cette réduction est suivie en mesurant le changement d'absorption à 700 nm (Oyaizu, 1986).

III.2.1. 3. Le test d'inhibition de blanchiment du β -carotène :

C'est l'une des méthodes rapides de criblage des antioxydants, basée principalement sur le principe que l'acide linoléique, qui est un acide gras insaturé, est oxydé par les « espèces réactives de l'oxygène » (ROS) produites par l'eau oxygénée. Les produits formés initieront l'oxydation du β -carotène, ce qui conduira à une décoloration. Les antioxydants diminuent l'ampleur de la décoloration, qui est mesurée à 434 nm (Alam et al., 2013).

III.2.1. 4. Le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) :

La méthode TBA décrite par **(Ottolenghi, 1959)** est la suivante: La concentration finale de l'échantillon de 0,02% m/v a été utilisée dans cette méthode. Deux ml d'acide trichloroacétique à 20% et 2 ml de 0,67% d'acide thiobarbiturique ont été ajoutés à 1 ml de solution échantillon. Le mélange a été placé dans un bain d'eau bouillante pendant 10 minutes, puis centrifugé après refroidissement à 3000 tr/min pendant 20 minutes. L'activité d'absorbance du surnageant a été mesurée à 552 nm et enregistré après avoir atteint son maximum.

III. 3. Activité anti-inflammatoire :

L'inflammation est une réponse physiopathologique à une blessure, une infection ou une destruction caractérisée par la chaleur, une rougeur, une douleur et un gonflement. L'inflammation est une réaction normale du corps pour se protéger des dommages causés par un traumatisme physique, des agents chimiques ou des microbes pathogènes. C'est la réponse de l'organisme pour inactiver ou détruire les organismes envahisseurs, pour éliminer les irritants. Elle est déclenchée par la libération de médiateurs chimiques des tissus lésés et la migration cellulaire. Les médicaments les plus couramment utilisés pour gérer les affections inflammatoires sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qui ont plusieurs effets indésirables, en particulier une irritation gastrique entraînant la formation d'ulcères gastriques **(Bennett et Brown, 2005 ; Tripathi, 2008)**.

Deux stades de l'inflammation existent, l'inflammation aiguë et chronique. L'inflammation aiguë est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), qui est médiée par l'activation du système immunitaire. Ce type d'inflammation persiste seulement pendant un court laps de temps et est généralement bénéfique pour l'hôte. Si l'inflammation dure pendant une longue période, la deuxième étape de l'inflammation ou inflammation chronique s'installe dans l'hôte et peut prédisposer à diverses maladies chroniques, y compris le cancer **(Lin and Karin, 2007)**.

La réponse inflammatoire se déroule en quatre étapes : reconnaissance des signaux de danger, recrutement de cellules sur le site de l'infection, élimination du pathogène et résolution de l'inflammation conduisant à un retour à l'homéostasie et à la cicatrisation des tissus lésés **(Barton, 2008)**.

Les médicaments actuellement utilisés sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des corticostéroïdes. Tous ces médicaments ont des effets toxiques potentiels tels que des saignements gastro-intestinaux significativement associés à l'utilisation aiguë d'anti-

inflammatoires non stéroïdiens tels que des doses régulières d'aspirine, de diclofénac, de kétorolac, de naproxène ou de nimésulide (**Pilotto et al., 2003**).

Les familles biochimiques à action anti-inflammatoire et/ou antalgique qui composent les composés de différentes huiles essentielles sont : les Aldéhydes monoterpéniques, les Esters terpéniques, les Sesquiterpènes et les Monoterpènes, l'Eugénol (phénol aromatique), l'Eucalyptol (oxyde terpénique) ou 1,8 cinéole, Alcools terpéniques (Sesquiterpénols, Monoterpénols), les Cétones terpéniques, les Phénol méthyléthers (**Spinola, 2016**).

Les HEs sont utilisées en milieu clinique pour traiter des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Maruyama et al., 2005**). Plusieurs études ont par exemple mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (**Caldefie-Chézet et al., 2004**) et de son principal composé, l' α -terpinéol (**Hart et al., 2000**). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de géranium (**Maruyama et al., 2005**) et le linalol et son acétate (**Peana et al., 2002**) ont montré une activité anti-inflammatoire sur l'œdème des pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires (**Piochon, 2008**).

III. 4. Activité antifongique :

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être utilisés comme agents protecteurs contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les aliments. (**Lis-Balchin, 2002**).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Compte tenu de la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré d'éventuelles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé afin de pouvoir le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité antifongique des composés aromatiques semble liée à la présence de certaines fonctions chimiques. Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2,6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique). Ils ont également des propriétés antifongiques très marquées. En revanche, les groupements méthoxy, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une antifongicité importante. Cette activité est

estimée en fonction de la durée de l'inhibition de croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique diminue selon le type de fonction chimique : Phénols › Alcools › Aldéhydes › Cétones › Ethers › Hydrocarbures (**Vokou et al., 1988**).

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est étai le plus actif. Pour les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol › thymol › isoeugénol › eugénol). (**Ultee et al.,2000**).

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques semble être pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes dans les huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Avec leur travail, ils ont montré l'importance de spécifier le genre et l'espèce, ainsi que de la variété de la plante dont l'extrait provient. (**Chao et al. 2000**).

L'eugénol est un composé antifongique efficace qui cause des dommages permanents aux cellules des levures tels que *Candida albicans* (**Latifah-Munirah et al.,2015**), et des champignons : *Aspergillus ochraceus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. fumigates*, *Trichoderma viride* et *P. funiculosum* (**Beatovic et al., 2015**).

Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire des champignons et des membranes cytoplasmiques grâce à un processus de perméabilisation, qui conduit à la désintégration des membranes mitochondriales. Cela est dû à des altérations du débit. Il peut endommager les lipides, les protéines et les acides nucléiques contenus dans les cellules infectées par des champignons pathogènes (**Arnal-Schnebelen et al., 2004**).

III. 5. Activité antivirale :

Les virus donnent lieu à une grande variété de pathologies, dont certaines posent des problèmes qui ne peuvent être résolus aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour le traitement de ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (**Benayad, 2008**).

De très nombreuses familles chimiques ont révélé des activités antivirales in vitro. C'est le cas des phénols monoterpéniques ou aromatiques (difficiles à utiliser, car dermo- et hépatotoxiques), des alcools monoterpéniques ainsi que des aldéhydes monoterpéniques et aromatiques. (**Laurent J, 2017**)

L'activité antivirale découle de la liposolubilité des HEs, qui leur permet de pénétrer dans l'enveloppe virale riche en lipides. Les HEs sont plus actives sur les virus enveloppés car ils sont

plus fragiles que les virus nus. Ils sont donc particulièrement efficaces contre les virus herpès simplex, VHS-1 (herpès labial) et VHS-2 (herpès génital).

Il existe une synergie d'action entre le cinéol et le monoterpénol, cette association est fréquemment rencontrée dans les HEs issues de la famille des Myrtacées (ex. : Arbre à thé, Niaouli et Cajepu). Ce couple est très utile pour traiter des pathologies virales affectant la sphère respiratoire. De même, le couple oxydant de linalol et linalol présent dans l'HE d'Hysope des montagnes possède une puissante activité antivirale au niveau respiratoire.

Les aldéhydes, en usage interne ou en diffusion atmosphériques, sont de bons compléments dans le traitement des infections virales. **(Laurent J, 2017)**

III.6. Activité antiparasitaire :

Les phénols qui ont l'action la plus puissante contre les parasites, suivis par les alcools monoterpéniques. Certains oxydes tels que l'ascaridol sont très spécifiques pour la lutte antiparasitaire. Enfin les cétones ont une activité antiparasitaire bien établie, mais leur utilisation être faite avec prudence car ils présentent une certaine neurotoxicité. Cette action est renforcée par l'association cétones/lactones dans l'huile essentielle **(Laurent J, 2017)**.



2^éme partie :
Matériel et Méthodes

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

Introduction

L'Algérie, par sa situation géographique vaste disposant d'une grande diversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche d'agents bioactifs de ces derniers doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale se servant de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces principes actifs sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à les détecter et doser, pour une éventuelle utilisation à résoudre le problème croissant de la résistance bactérienne et les maladies liées au stress oxydatif.

A cet effet, on s'est intéressé à étudier l'huile essentielle de la plante *Mentha pulegium* L. ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques (antioxydant, antibactérienne).

IV.1. Matériel végétal :

La partie aérienne de *Mentha pulegium* L. a été récoltée Nord-Ouest de l'Algérie à Mostaganem (35 ° 56 '00 "Nord ; 0 ° 05' 00" Est), pendant la période de floraison (mai 2019). Le matériel végétal a été débarrassé de tous éléments étrangers, étalé sur le sol et laissé sécher à température ambiante et à l'abri de la lumière directe du soleil. Une fois séchée, une partie a été broyée en une poudre fine, pour être soumise à des tests phytochimiques.



Photo 3 : La plante de *Mentha pulegium* séchée

IV.2. Screening photochimique :

Pour connaître la composition chimique du matériel végétal, nous avons fait un dépistage phytochimique. Celui-ci est basé sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette. La coloration observée est généralement due à la formation d'une conjugaison ou d'une instauration dans une molécule. Dans de tels tests de caractérisation, nous provoquons cette instauration en utilisant un réactif approprié.

IV.2.1. Différentes classes recherchées :

1.1. Les tannins :

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleue-verte celle des tannins cathéchiques (**Trease et Evans, 1987**).

1.2. Les flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Cavé, 1993**).

1.3. Les anthocyanes :

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debray et al., 1971 ; Paris et al., 1969**).

1.4. Les coumarines :

Une masse de 1gramme de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée.

Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (**Rizk, 1982**).

1.5. Les alcaloïdes :

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H₂SO₄ dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner.

La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al., 1969**).

1.6. Stérols et triterpènes :

Deux essais ont été effectués :

► **Essai 1** : Test pour les stérols et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (**Trease et Evans, 1987**).

► **Essai 2** : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydre acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt).

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (**Trease et Evans, 1987**).

1.7. Les saponosides :

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10^{ème} tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans le } 10^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0 X$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).

1.8. Les composés réducteurs :

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

1.9. L'amidon :

On chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-violacé (**Bruneton, 1999**).

IV.3. Les procédures d'extraction :

IV. 3.1. Extraction des huiles essentielles :

L'huile essentielle est extraite par entraînement à la vapeur d'eau en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode décrite par **(Bruneton, 1993)**. Cette méthode est basée sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les plantes peuvent être entraînés par la vapeur d'eau, en raison de leur pouvoir d'ébullition relativement faible et de leur hydrophobicité. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation. L'huile obtenue est séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre et conservées dans un flacon de verre scellé à 4 ° C. Cette extraction est réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences à l'université de DR. TAHAR MOULAY - Saida -

Le rendement en huile essentiel obtenue est déterminé comme suit :

$$\text{Huile \% (v / p)} = \text{poids d'huile extraite en (g)} / \text{poids de l'échantillon traitée en (g)} \times 100$$



Photo 4 : Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur.

IV.4. Caractérisation de l'huile essentielle (Non réalisé)

IV.4.1. Analyse de l'huile essentielle par CPG/SM :

La chromatographie est le processus fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle est basée sur les différences d'affinité de la substance à analyser par rapport à de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique utilisée, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, se produit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, ou de leurs solubilités différentes dans chaque phase (**Schwedt, 1993**).

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès réalisés en traitement en temps réel du signal, la création de bases de données de spectres de masse et le développement d'algorithmes pour comparer le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la base de données sont à l'origine de la généralisation de l'utilisation de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques.

D'un point de vue analytique, d'important progrès a été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (IE), connu sous le nom de CPG/SM-(IE), est la technique régulièrement utilisée pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste en bombardement avec des d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (Anton and Lobskin, 2005).

IV.5. Estimation des activités biologiques in vitro (Non réalisé)

IV.5.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH :

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme de radical libre et de la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin et al., 2008).

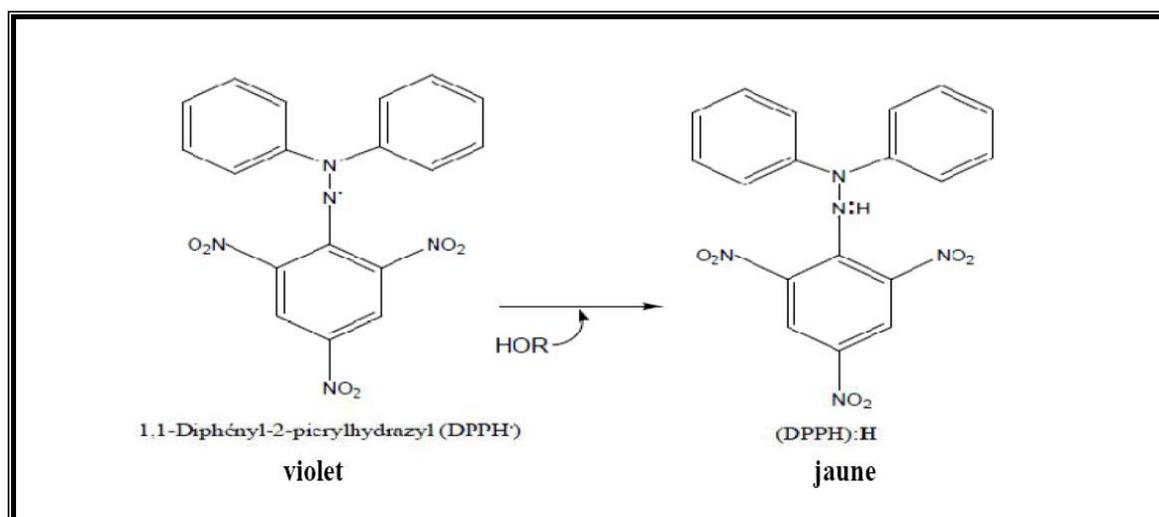


Figure 26 : Forme réduite du radical DPPH[•]

L'activité de piégeage des radicaux (RSA) est calculée en pourcentage de décoloration de DPPH en utilisant l'équation :

$$\text{RSA \%} = [(\text{ADPPH-AS}) / \text{ADPPH}] \times 100$$

Où

AS est l'absorbance de la solution contenant l'échantillon

ADPPH est l'absorbance de la solution de DPPH.

La concentration inhibitrice de 50 % (appelée aussi EC₅₀ « Efficient Concentration 50 ») est la dose d'extrait nécessaire pour provoquer une diminution de 50% de l'absorbance à 515 nm. Elle est calculée graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'huile testé) (Fabri et al., 2009).

L'activité antiradicalaire est exprimée en IC₅₀ (µg mL⁻¹) en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ trouvées (Maisuthisakul et al, 2007).

$$\text{AAR} = 1/\text{IC}_{50}$$

IV.5.2. Activité antibactérienne de l'huile essentiel :

IV.5.2.1. Détermination de l'activité antimicrobienne par la méthode de disque de diffusion

La méthode de diffusion du disque est utilisée pour le test de sensibilité antimicrobienne des huiles essentielles contre les souches pathogènes choisis. Selon Pfaller et al., (1998), une quantité de 0,1 ml d'une suspension bactérienne ajustée à (10⁷ CFU / ml pour *S. aureus* et 10⁶ UFC / ml pour les autres souches et levures) est étalée en surface d'une boîte de Pétri contenant de l'agar Mueller-Hinton pour les bactéries, de l'agar Mueller Hinton supplémenté avec 2% de glucose (pour soutenir la croissance) et 0,5 µg / ml de bleu de méthylène (pour améliorer la définition du bord de la zone) pour la levure (Testore et al., 2004). Les disques de papier filtre (6 mm de diamètre) sont imprégnés individuellement avec 10 µl des huiles puis placés sur le milieu gélose déjà inoculé avec les microorganismes testés. Les boîtes de Pétri sont stockées à 4 °C pendant 2 h puis incubées à 37 °C / 24h pour les bactéries, à 30 °C / 48 h pour

les levures ex : *C. albicans*. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés y compris le diamètre des disques. Les disques d'antibiotiques sont utilisés comme témoins positifs pour les bactéries, quant au solvant DMSO (5%), il est utilisé comme témoin négatif.

IV.5.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées à l'aide des plaques de microdilution stérilisées selon **Okusa et al (2007)** avec modifications mineures. Les essais sont réalisés dans le Muller Hinton bouillon pour les bactéries ou Sabouraud Dextrose bouillon pour les levures ex : *C. albicans*. Les huiles essentielles sont d'abord dissoutes dans 5% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et des séries de dilutions sont préparées dans des microplaques à 96 puits (200 µl / puits). Ensuite, les souches sont ajustées à 0.5McFarland (10^8 cellules / ml pour les bactéries et 10^6 cellules / ml pour les levures), diluées à 1/100 pour atteindre (10^6 et 10^4 cellules / ml pour les bactéries et *C. albicans*, respectivement) et rajoutées à chaque puits (100 ul / puits). Enfin, les souches et *C. albicans* sont incubées pendant 24 heures à 37 °C et 30 °C respectivement.

La CMI est défini comme la concentration la plus faible des échantillons pour laquelle les micro-organismes ne démontrent pas de croissance visible à l'œil nu comme indiquée par la turbidité.

Le DMSO est le contrôle négatif et le contrôle de la stérilité est préparé en utilisant le bouillon Muller Hinton seul.



3^{ème} partie:
Résultats et Discussion

Chapitre V. Résultats et Discussion

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt notamment comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. En effet, avec les progrès des moyens d'analyses actuelles, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des huiles essentielles d'authentiques médicaments.

V.1. Caractéristiques organoleptiques :

Selon (AFNOR, 2000), Les critères d'évaluation d'une huile essentielle sont ses propriétés organoleptiques telles que le goût, la couleur, et l'odeur. Ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur l'essence. La qualité d'une essence et sa valeur commerciale sont définies par des normes fixées. Ces normes ont été établies par plusieurs organisations connues à l'échelle mondiale, spécifiant les conditions opératoires d'analyses, et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des huiles essentielles les plus courantes. Après l'extraction, nous avons déterminé les caractères organoleptiques de notre huile essentielle et comparé avec ceux de norme A F N O R (Tableau 06).

Tableau 06 : Caractères organoleptiques de l'huile essentielle

caractéristique	odeur	Couleur	Aspect physique
<i>Mentha pulegium</i> L	Forte odeur	Jaune pale	Liquide
AFNOR	Forte odeur	Jaune	Liquide



Photo 05 : l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

V.2. Rendements de l'huile essentielle :

L'hydrodistillation des parties aériennes de *Mentha pulegium* par entrainement à la vapeur a donné une huile volatile jaune pâle caractérisée par une forte odeur avec un rendement moyen de 0.23 % (Figure 27).

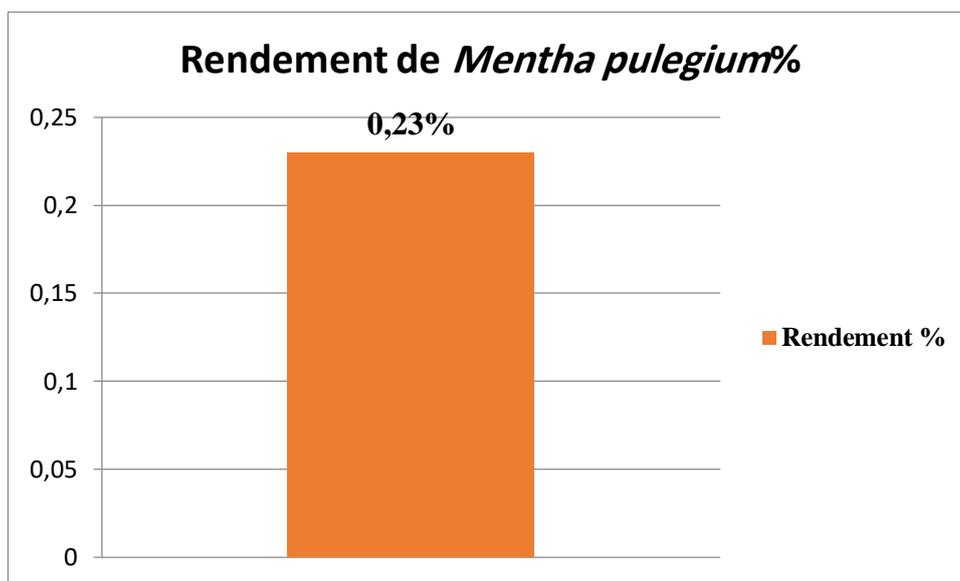


Figure 27 : Rendement en huile essentielle de la plante *Mentha pulegium*.

D'après ces résultats, le rendement de HE de *M. pulegium* est 0.23%, Ce rendement peut être considéré comme faible comparativement à ceux obtenu par (Derwich et al ; 2010) la menthe pouliot a un rendement de 1.66%, Notre rendement en huile essentielle est similaire à celui obtenu par (Bechiri et Tahar, 2018) qui est environ 0.23%. Cette différence de teneur en huile essentielle peut être liée à plusieurs facteurs tels que la zone géographique de collecte, le climat, le stade de développement et la saison, lieu de séchage, la température et la durée de séchage, la technique et le temps d'extraction...etc.

V.3. Les tests phytochimique :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur l'extrait aqueux, éthanolique, l'infusion aqueuse ou sur la poudre végétale selon le protocole à suivre.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. La présence de ces métabolites secondaires au niveau de la plante étudiée explique leur fort pouvoir

thérapeutique. Par conséquent, ces résultats justifient la large utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle par la population locale. Le **Tableau 07** regroupe les résultats des tests chimiques réalisés sur la plante *Mentha pulegium* L.

Tableau 07 : Résultats des tests phytochimique de *Mentha pulegium*.

Extrait	Métabolite testé	Réaction	Résultats	
Ethanolique	Tannins	FeCl ₃	+++ Tannins cathéchiques	
	Stérols et stéroïdes	Acide sulfurique concentré	+++	
	Hétérosides stéroïdiques et triterpéniques	Acide sulfurique concentré (Liebermann-Burchardt)	+++	
	Composé réducteur	Liqueur de Fehling	Fehling A	Fehling B
			+	-
Aqueux	Saponosides	Test de mousse	+++	
	L'amidon	NaOH	-	
Poudre végétale	Coumarine	Fluorescence UV	++	
	Alcaloïdes	Mayer	+	
		Wagner	+	
Infusion aqueux	Anthocyanes	HCl 2N	-	

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : négatif

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires à savoir tannins cathéchiques, saponosides, stérols et triterpènes, coumarines et la

présence des alcaloïdes et des composées réductrices. Du point de vue biologique, ces groupes constituent des principes potentiellement actifs rencontrés dans toute ou une partie de la plante. Ce sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique (Sofowora, 1993).

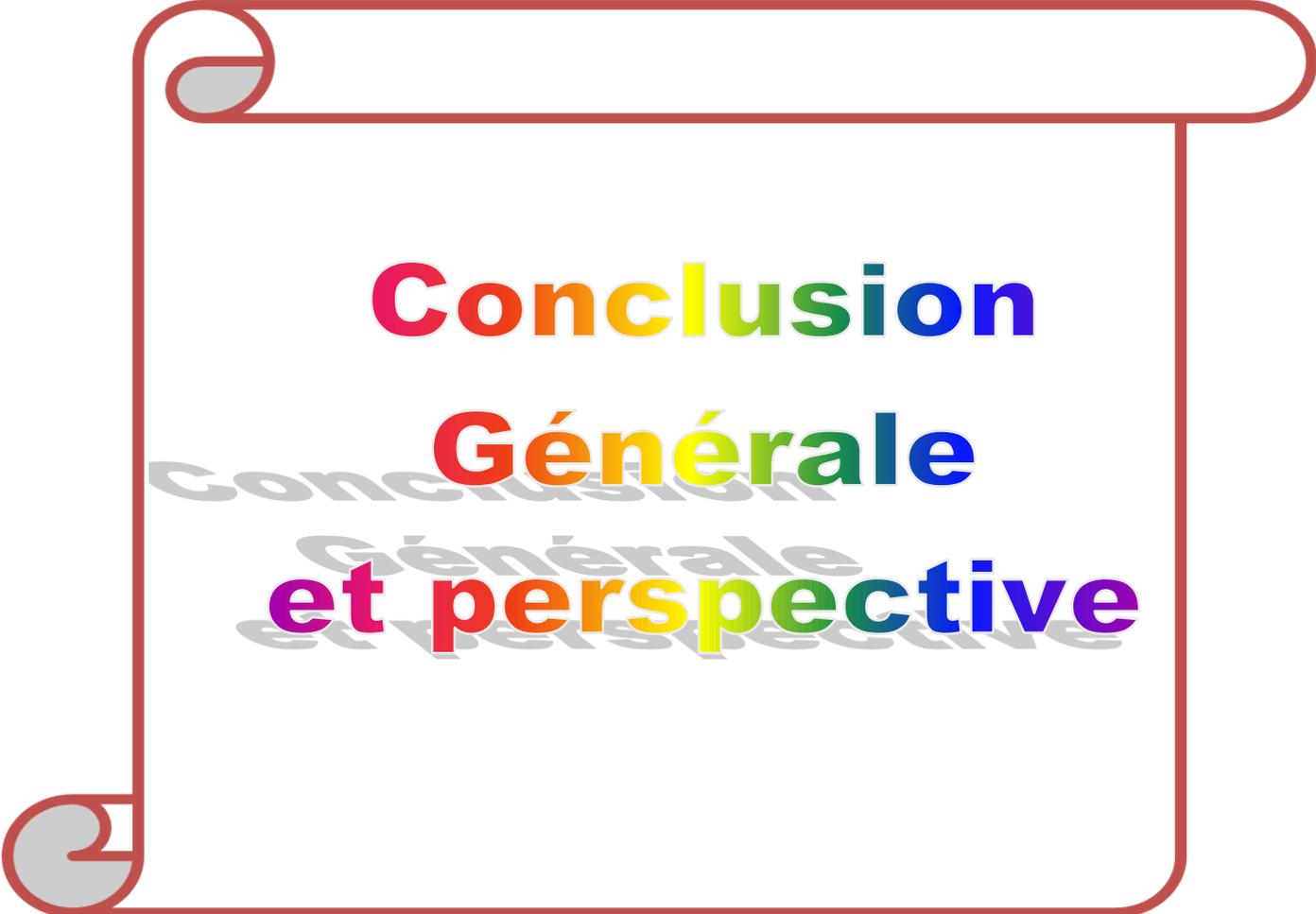
D'après **Abid et Mordjani (2019)**, la caractérisation de *Mentha pulegium* par chromatographique (CPG/SM) a permis d'identifier 20 composés dont les principaux sont : le Pulegone (71.25 %), le Menthone (11.97 %) qui peuvent être rencontrés dans la plupart des huiles essentielles de cette espèce de provenance de différentes régions et on constate aussi la présence de limonène (3.56 %), Myrcene (1.20 %) et Menthol (0.98%).

Guerfa et Ounaissia (2015) ont montré une faible activité antiradicalaire de l'huile essentielle *Mentha pulegium* avec des valeurs de CE50 de 16.03 ± 1.74 mg/ml révélé par méthode du piégeage du radical DPPH• qui est l'une des méthodes les plus simples, les plus rapides et les plus efficaces à cause de la grande stabilité du radical (**Bozin et al., 2008**).

Abid et Mordjani (2019) ont trouvé que l'huile essentielle *Mentha pulegium* possède une activité antimicrobienne variée selon la souche testée. L'huile montre une forte inhibition contre *Candida albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition entre 12-24.6 mm à différentes concentrations (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et pure), alors que pour les souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* l'activité antimicrobienne est modérée avec des diamètres d'inhibition comprise entre 9.7-19 mm. Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* ne montre aucun diamètre d'inhibition, révélant ainsi une activité antimicrobienne importante.

L'étude de l'activité antimicrobienne (micro dilution) faite par **Attou (2017)** sur une fourche de concentration d'HE dans le DMSO, allant de 0.195 à 100 µl/ml de *Mentha pulegium* il a constaté que :

L'huile essentielle de *Mentha pulegium* inhibe la levure *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* à une CMI = 0.78 µl/ml, et les autres souches (*Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*) sont sensibles à partir de 3.125 µl/ml.

A decorative red border with rounded corners and scroll-like details at the top and bottom left, framing the central text.

Conclusion

Générale

et perspective

Conclusion générale et perspective :

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme

Dans les pays du monde entier, le développement de la médecine reste encore limité, la pauvreté, le manque des moyens, les traditions obligent les populations de s'orienter vers la médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales.

C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que le présent travail s'inscrit sur la caractérisation de l'huile essentielle de la plante choisie. Les activités biologiques, en l'occurrence l'activité antioxydante, et antibactérienne, mais malheureusement vu les circonstances de la pandémie de Covid 19, nous n'avons pas achevé cette thématique.

L'hydrodistillation des parties aériennes de *Mentha pulegium* par entraînement à la vapeur a donné une huile volatile jaune pâle caractérisée par une forte odeur avec un rendement moyen de 0.23 %.

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés par des solvants de polarités différentes. Ces tests nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante à savoir, les tannins cathéchiques, les saponosides, les stérols et triterpènes, les coumarines et la présence des alcaloïdes et des composées réductrices. Par conséquent, ces résultats justifient la large utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle par la population locale.

Des études effectuées sur l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont permis de révéler que cette plante est une source riche en Pulegone (71.25 %), le Menthone (11.97 %), limonène (3.56 %), Myrcene (1.20 %) et Menthol (0.98%) qui peuvent être rencontrer dans la plupart des huiles essentielles de cette espèce de provenance de différentes régions.

Il a été démontré que les composés volatils provenant des plantes sont biologiquement actifs et possèdent une activité antimicrobienne et des effets thérapeutiques. Depuis le Moyen Âge, *Mentha pulegium* est également utilisée comme plante médicinale. En fait, une infusion de feuilles et/ou de sommités fleuries est recommandée contre la toux, l'asthme, le diabète, la fièvre, les brûlures, l'eczéma, ou bien pour arrêter la sécrétion lactée.

Les activités biologiques de la *Mentha pulegium* sont étudiées dans de nombreux travaux, et qui montrent que l'huile essentielle de cette plante possède faible activité antiradicalaire et une activité antimicrobienne varié selon la souche testée.

Dans le souci de soutenir l'utilisation de cette plante comme remède thérapeutique, d'autres études seront nécessaires à savoir l'étude des activités biologiques (antioxydante, antimicrobienne, insecticide, anti-inflammatoire.....), l'isolement du principe active et établir son mécanisme d'action et surtout la détermination de la toxicité de l'huile essentielle.



Références

bibliographiques

Référence bibliographique :

- 1- Abbes, A. (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* « noukha » de la région de Tlemcen. Mémoire de master, Université Abou Bekr belkaid, Tlemcen.
- 2- Abderrazak, M., & Joël, R. (2007). *La botanique de A à Z. Ed* (Dunod. Par).
- 3- Abid A. Mordjani N. (2019). Valorisation de l'huile Essentielle de *Mentha pulegium* récoltée dans la région de Rouina Wilaya d'Ain Defla. Mémoire de master, Université Djilali Bounaama, khemis Miliiana.
- 4- Addadi, H et Ferradji, S.M, (2014). Extraction d'huile essentielle d'une plante médicinale la menthe. Mémoire de master chimie organique, Université Dr Molay Tahar, Saida faculté de science département de chimie.
- 5- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- 6- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
- 7- Anton R., Lobstein A, (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris.
- 8- Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, N., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., & Dabur, R. (2009). Natural products - Antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(7), 621–638. <https://doi.org/10.1080/10286020902942350>.
- 9- Arnal-Schnebelen, B., Hadji-Minaglou, F., Peroteau, J.F., Ribeyre, F., De Billerbeck, V.G. (2004). Essential oils in infectious gynaecological disease : a statistical study of 658 cases. *International Journal of Aromatherapy*. 14(4) :192–197.
- 10- Atawodi, S.E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (2) : 128-133.
- 11- Attou A. (2017). Détermination de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Quatre Plantes Aromatiques de l'Ouest Algérien (Région d'Ain Témouchent) Etude de Leurs Activités Antioxydante et Antimicrobienne. Thèse de Doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- 12- Audigie, C.L., Dupon, G. et Zonsgain, F. (1995). Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44.
- 13- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.
- 14- Barton, G M. (2008). A calculated response : control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation*, 118(2) :413-420.
- 15- Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology*, 9(1), 5-21.
- 16- Beatovic, D., Krstic-Milošević, D., Trifunovic, S., et al., (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of twelve *Ocimum basilicum* L. cultivars grown in Serbia. *Records of Natural Products*. 9(1) :62–75.
- 17- Bechiri, S., Tahar Mezedek, S. (2018). Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* de la région d'El Kantara (wilaya de Biskra) et de *Mentha pulegium* de la forêt de Mesra (wilaya de Mostaganem). Mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.
- 18- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3248S–3254S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.060186>.Am.

- 19- Bekhechi C., 2008 : Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien. Thèse Doctorat. Univ. Tlemcen.
- 20- Belaiche, E. (1979). *traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 3, Edition Maloine.p.137-1147.*
- 21- Beloued, A., (1998). Plantes médicinales d'Algérie. O.P.U., Alger. 277 p.
- 22- Benayad, N. (2008) : les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V- Agdal. Laboratoire des Substances Naturelles et Faculté des Sciences se Rabat. P 61.
- 23- Bencheikh, D. (2018). Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* L. and *Matricaria camomilla* L. Magister en biochimie, Université Ferhat Abbas, Setif.(<https://www.univsetif.dz/MAGISTER/images/facultes/SNV/2009/BENCHEIKH%20Dalila.pdf>).
- 24- Bendjilali, A. (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Le pharmacien du maghreb.
- 25- Bennett P.N., Brown M.J. (2005). *Clinical pharmacology*. Churchill Livingstone : New Delhi.
- 26- Besombes, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle.
- 27- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390–393. <https://doi.org/10.1094/CC-82-0390>.
- 28- Bicchì, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., Zellner, B. D. A., ... & Rubiolo, P. (2008). Quantitative analysis of essential oils : a complex task. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 382-391.
- 29- Biyiti, LF., Meko'o, DJL., Tamzic, V., Amvam, ZPH. (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Traditional pharmacology and medicine in Africa*. 13 : 11-20.
- 30- Boizot, N., & Charpentier, J.-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier Technique de l'Inra*, 79–82.
- 31- Boukenna, M et Bouzidi, M (2007). Extraction et analyse de l'huile essentielle de *Mentha viridis*L (menthe verte) et de la *mentha pulegium* (menthe pouliot). Thèse d'Ingénieur en Agronomie UMMTO.
- 32- Boullard, B., (2001). Plantes médicinales du monde réalités et croyances. ESTEM (Ed) Paris : pp 660.
- 33- Boumediou, A., Addoun, S., (2017). Etude ethnobotanique sur l'usage des plantes toxiques, en médecine traditionnelle, dans la ville de Tlemcen (Algérie). Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Université Abou Bakr Belkaïd-Tlemcen.
- 34- Bouzid.A , Chadli. R, Bouzid.K .(2016). *Étude ethnobotanique de la plante médicinale Arbutus unedo L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. Phytothérapie.15(6).*
- 35- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igetic, R.(2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, Vol. 111; pp 925–929.
- 36- Bremness, L. (2001). Plantes aromatiques et médicinales, BORDAS, France, 303.
- 37- Brian, M.L. (1995). La flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie 1er Flore.
- 38- Bruneton J. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plante médicinales* (Lavoisier).
- 39- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. 2 ième édition. Tec. Doc., Lavoisier, Paris, France.
- 40- Bruneton, J. (1999). *Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris :*

- Editions médicales internationales* (Tec et Doc).
- 41- Bruneton, J. (2008) : plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Editions Lavoisier. 3ème édition, 1120.
 - 42- Bruneton, J. (2016). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales - (5° Edition). Lavoisier.
 - 43- Caldefie-Chezet, F., Guerry, M., Chalchat, J. C., Fusillier, C., Vasson, M. P., & Guillot, J. (2004). Anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free radical research*, 38(8), 805.
 - 44- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review : essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.
 - 45- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
 - 46- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
 - 47- Caude, M. et Jardy, A. (1996). Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. Vol ; papier TA2.
 - 48- Cavé A. (1993) .*Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2^{ème} Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris, pp 274-285.
 - 49- Chalchat, J. C., Gorunovic, M. S., Maksimovic, Z. A., & Petrovic, S. D. (2000). Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 598-600.
 - 50- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of essential oil research*, 12(5), 639-649.
 - 51- Chemloul, F. (2014). Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. Mémoire de master, Université Abou Bekr belkaid, Tlemcen.
 - 52- Chibani, S. (2013). "Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien." Thèse de doctorat, Université Mentouri Constantine, Constantine.
 - 53- Cox, S.D., Gustafson, J.F., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (1991). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Melaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology* .88, 170-175.
 - 54- Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., & Brielmann, H. (2006). *Natural Products from Plants* (2eme Editi).
 - 55- Cushnie, T. T., Lamb, A. J., (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38, 2, 99-107.
 - 56- Dacosta Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. (Yves Dacos).
 - 57- Dambolena. J.S, Lópezb. A.G , Cañepac. M.C, Theumerc. M.G., Zygadloa. J.A , Rubinstein. H.R. (2008). *Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on Fusarium verticillioides MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis*. *Toxicon* 51: 37–44.
 - 58- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>.
 - 59- Debray, M., Jacquemin, H., Razafindrambo, R. (1971). Phytochemical Screening of *Pentadesma butyracea* Sabine (Clusiaceae) Acclimated in Benin by GC/MS. *Travaux et documents de l'Orstom, Paris. France. Vol. 2013(2013) : 8 P.*

- 60- Dellille L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Berti editions, Alger, 240.
- 61- Derwich E., Benziane Z., Taouil R., Senhaji O et Touzani M (2010). Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4(1): 47-54.
- 62- Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *Int. J. Agric. Biol*, 199–204. Retrieved from http://www.fsublishers.org/published_papers/8785_.pdf.
- 63- Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179.
- 64- Dohou, R., Yamni, K., Tahrouch, S., Hassani, L. I., Badoc, A., & Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4), 61-78.
- 65- Duraffourd, C., D'Hervicourt, L. & Lapraz, J.C., (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.
- 66- El kalamouni, C., Marzouk, B., Menut, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorats, Université de Toulouse.
- 67- Euzéby, JP. (2009). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Evaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
- 68- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, Vol.100 ; pp 428-433.
- 69- Farhoosh, R., Johnny, S., Asnaashari, M., Molaahmadibahraseman, N., Sharif, A., (2016). Structure–antioxidant activity relationships of O-hydroxyl, O-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food chemistry*, 194, 128-134.
- 70- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- 71- Favier, A. (2006). Stress oxydant Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*, 64, 390–396. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(06\)75334-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(06)75334-2).
- 72- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. *British journal of biomedical science*, 66(4), 180-185.
- 73- Fournier, P. (1999). Plante médicinale. Connaissance et mémoires européennes, 3 tomes, Paris, 636.
- 74- Fraga, C. G. (2007). *Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions*. *IUBMB Life*, 59 (4-5), 308 – 315.
- 75- France-Ida, J. (1996). Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*. 3 : 5-6.
- 76- Girotti-Chanu, C. (2006). *Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de miirotea de bilis .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon*.
- 77- Gouveia, S., & Castilho, P. C. (2012). *Helichrysum monizii* lowe: Phenolic composition and antioxidant potential. *Phytochemical Analysis*, 23(1), 72–83. <https://doi.org/10.1002/pca.1326>.
- 78- Guerfa S. Ounaissia N. (2015). Contribution à l'étude d'activités antioxydante et antiinflammatoire de certaines huiles essentielles. Mémoire de master, université 8 mai 1945, Guelma.
- 79- Guérin-Faubleé, V., Carret. (1999). L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GTV-INRA, 5-12.

- 80- Guignard, J. L. (2000). « Biochimie végétale », Masson, Paris, 166.
- 81- Gulluce . M, Fekrettin. S, Munevver. S, Hokan. O. (2007). *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia*. Food Chemistry 103(4):1449-1456.
- 82- Guo, Y., Sakulnarmrat, K., Konczak, I., (2014). Anti-inflammatory potential of native Australian herbs polyphenols. Toxicology Reports, 1, 385-390.
- 83- Guy, G. (2005). Les plantes aromatiques et huile essentielle a graisse, édition l'Harmattan.
- 84- Halliwell B, Gutteridge JMC.(2006). *Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Oxford : Clarendon Press*.
- 85- Halliwell B. (2008). *Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies. Arch Biochem Biophys. 476(2):107-12*.
- 86- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ? British journal of pharmacology, 142(2), 231-255.
- 87- Halliwell, B., (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology., 141, 312-22.
- 88- Harbone, J. (1998). *phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis*. (3ème edit).
- 89- Hart, P. H., Brand, C., Carson, C. F., Riley, T. V., Prager, R. H., & Finlay-Jones, J. J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. Inflammation Research, 49(11), 619-626.
- 90- Hmiri S., Rahouti M., Habib Z., Satrani B., Ghanmi M et El Ajjouri M. (2011), evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de Mentha pulegium et d'eucalyptus camaldulensis dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Maroc, 80 :824-836.
- 91- Huang, D.J., Lin, C.D., Chen, H.J. and Lin, Y.H. (2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipouroea batatas) Lam « Tamong 57 » constituents. Botanical Bulletin of Academi. Sinica. 45 : 175-186.
- 92- Hulin, V., Mathot, A.G., Mafart, P. et Dufossé, L. (1998) Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. Sciences des aliments (France), 18 : 563-582.
- 93- Huyan, T., Li, Q., Wang, Y. L., Li, J., Zhang, J. Y., Liu, Y. X., ... Li, H. Q. (2016). Antitumor effect of hot aqueous extracts from Sonchus oleraceus (L.) L. and Juniperus sabina L - Two traditional medicinal plants in China. *Journal of Ethnopharmacology*, 185, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.044>.
- 94- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables Ioana. *Food Chemistry*, 126, 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- 95- Iserin, P., & Al, E. (2007). *Encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparation, soins ; Ed 2 : LAROUSSE*.
- 96- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J, P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., Vican, P., Deesalle –Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J. et Botrel, A. (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins : Ed Larousse (10-12p).
- 97- Joulain, D. (1994). Method for analysing essential oil. Modern analysis methodologies : use and abuse, perfum., Flavor, vol. 19, pp. 5–17.

- 98- Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- 99- Kansole, M. (2009). Etude ethnobotanique, phytocimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'E.
- 100- Karray-Bouraoui, N., Rachi, M., Neffati, M., Baldan, B., Ranieri, A., Marzouk, B., ... & Smaoui, A. (2009). Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 338-343.
- 101- Kazemi Oskuee, R., Behravan, J., & Ramezani, M. (2011). Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of *Carum copticum* from Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 1(2), 83-90.
- 102- Khenaka, K. (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Diplôme de magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri, Constantine.
- 103- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review : Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- 104- Kueny-Stotz, M. (2008). *Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum et aux sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Stra.*
- 105- Lahlou, M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research : An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
- 106- Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique*.
- 107- Lamamra, M. (2018). Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Setif.
- 108- Laouer, H. (2004). Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- 109- Latifah-Munirah, B., Himratul-Aznita, W. H., & Mohd Zain, N. (2015). Eugenol, an essential oil of clove, causes disruption to the cell wall of *Candida albicans* (ATCC 14053). *Frontiers in Life Science*, 8(3), 231-240.
- 110- Laurent, J. (2017). Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse III.
- 111- Lewis, K., & Ausubel, F. M. (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24(12), 1504-1507.
- 112- Lin, W. W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183.
- 113- Lis-Balchin M. (2002). *Lavender : the genus Lavandula*. Taylor and Francis, London : 37, 40, 50, 155-200.

- 114- Lis-Balchin, M, Deans, S.G. (1997). *Bioactivity of selected plant essential oils against Listeria monocytogenes*. *JAppl Microbiol*, 82(6):759-62.
- 115- Lorenzi, H., Matos, F. J. A. (2002). *Plantas medicinales do Brasil : Nativas exoticas cultivadas*. Instituto Plantarum, p 512.
- 116- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique Couverture* (PPUR press).
- 117- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S. et Salunkhe, D. K., (1996), *Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives*. Marcel Dekker, Inc. New York. 65p.
- 118- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>.
- 119- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmit, R. (2007). *Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants*, *Food Chemistry*, Vol.100; pp 1409- 1418.
- 120- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C., (2015). *In vivo* anti-candida activity of phenolic extracts and compounds: Future perspectives focusing on effective clinical interventions. *BioMed Research International*, 2015.
- 121- Maruyama, N., Sekimoto, Y., Ishibashi, H., Inouye, S., Oshima, H., Yamaguchi, H., & Abe, S. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of Inflammation*, 2(1), 1-11.
- 122- Maurice N., 1997, *De l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle*, Ed : Lavoisier, Paris, p. 12- 14.
- 123- Moro Buronzo, A. (2008). *Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être*; Ed : HACHETTE PRATIQUE.
- 124- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. 17(13), 1061-1066.
- 125- Okusa, P.N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., (2007). *Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of Cordia gillettii De Wild (Boraginaceae)*. *J. Ethnopharmacol.* 112, 476–481.
- 126- Ottolenghi, A. (1959). Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79(C), 355–363. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90414-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90414-X).
- 127- Oussou, K.R., (2009). *Etude chimique et activités biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne*. Thèse de Doctorat, Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- 128- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- 129- Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., & Delikanli, B. (2014). Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 393–396. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.416>.
- 130- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.

- 131- Paré, J. (1997). Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 : p.4.
- 132- Paris R, Moysse H. Précis de matière médicale. Paris: Masson. 1969.
- 133- Paris, M., Hurabielle, M. (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339.
- 134- Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726.
- 135- Pfaller MA, Messer SA, Karlsson Å et al. (1998) Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol* 36(9): 2586-9.
- 136- Pilotto, A., Franceschi, M., Leandro, G., Paris, F., Niro, V., Longo, M. G., ... & Di Mario, F. (2003). The risk of upper gastrointestinal bleeding in elderly users of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs : the role of gastroprotective drugs. *Aging clinical and experimental research*, 15(6), 494-499.
- 137- Pincemail, J. et Defraigne J.O. (2004). Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone.
- 138- Piochon, M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Université du Québec à Chicoutimi.
- 139- Platzer, N. (2002). Application de la RMN à la détermination des structures. Base documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- 140- Pradeau, D., Dauphin C. (2007). Chromatographie planaire : applications. Dossier P1476, Base documentaire : Techniques d'analyse, vol. papier n° TA2.
- 141- Prescott ML, Harley JP, Klein DA, Willey MJ, Sherwood ML, Woolverton JC. 2010. Microbiologie. De boeck. pp.835-834.
- 142- Quezel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales* (2ème Tomes).
- 143- Quyou A. , 2003 . Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doct. Univ. Ibn Tofail. Fac.Sci. Kénitra, Maroc. 110 p.
- 144- Rahal, S. (2004). Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162.
- 145- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxicogenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International journal of food microbiology*, 122(1-2), 135-139.
- 146- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- 147- Raynaud, J. (2006). Prescription et conseil en AROMATHERAPIE. Editions TEC & DOC - EM inter - Lavoisier.
- 148- Rizk, A.M., (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*, Elsevier B.V. Amsterdam 52 (2) : 35-42.
- 149- Rodrigues, L., Póvoa, O., Teixeira, G., Figueiredo, A. C., Moldão, M., & Monteiro, A. (2013). Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 43, 692-700.

- 150- Rouessac, F., Rouessac, A., & Daniel Cruch. (2004). Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, méthodes séparatives. 6ème Ed. Dunod, Paris, p.102.
- 151- Roux, R. (2008). Conseil en aromathérapie. 2ème Edition, pro-officia., p. 187. Their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128 : p. 151-153.
- 152- Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles : alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*, 21(7), 836.
- 153- Salzer, U. J. (1977). The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings-A critical review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 9(4), 345-373.
- 154- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006). *polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 398 p.
- 155- Schauenberg, P et Paris, F., 1997. Guide des plantes médicinales : Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (396 P).
- 156- Scheffer, J.J.C. (1996). Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10 : S6-S7.
- 157- Schwedt, G. (1993) - Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.
- 158- Shahidi, F. (Ed.). (1997). Natural antioxidants : chemistry, health effects, and applications. The American Oil Chemists Society. 174-197.
- 159- Sijelmassi, A. (1993). Les plantes médicinales du Maroc. 3ème édition, Fennec, Casablanca, 285.
- 160- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025>.
- 161- Sofowora, A.O. (1993). Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. University of Ife Press 2nd Ed. pp 320.
- 162- Soobrattee. M.A, Neergheen.V.S, Luximon-Ramma. A, Aruoma. O.I. b, Bahorun. T. (2005). *Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions Mutation .Research 579 200–213*.
- 163- Spinola, M. (2016). Prise en charge de l'arthrose par les thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires à l'allopathie (homéopathie – phytothérapie – aromathérapie – compléments alimentaires). Thèse Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Bourgogne UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie.
- 164- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., ... & Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4115-4124.
- 165- Sutour, S. (2010). Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats. Thèse de doctorat, Université de Corse, France.
- 166- Svoboda, K. P. and Hampson, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>
- 167- Tabuti, J. R., Lye, K. A., & Dhillon, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda : plants, use and administration. *Journal of ethnopharmacology*, 88(1), 19-44.
- 168- Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J.C.M., Soković, M., Achour, L., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., (2018). *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bre.

- 169- Talahagcha, Kh et KASSA, S (2008). Extraction et caractéristiques organoleptiques et chimiques de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*. (menthe pouliot). D.E.S en biologie.
- 170- Taviano, M. F., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., ... Miceli, N. (2013). *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.049>.
- 171- Testore GP, Dori L, Buonomini AR, Schito GC, Soro O, Fortina G, Andreoni S, *et al.* (2004); *In vitro* fluconazole susceptibility of 1565 clinical isolates of *Candida* species evaluated by the disk diffusion method performed using NCCLS M44-A guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 50(3):187-192.
- 172- Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145.
- 173- Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A., & Casanova, J. (1995). Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Analysis*, 1, 25–34.
- 174- Trease, E., Evans, W.C. (1987). *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. London 13 th Edition. P 61-62. In Karumi Y, Onyeyili PA et Ogugduaja VO, 2004. Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pommé). *Journal of Medicine and scientific. Nigeria*. Vol. 4(3) : 179- 182.
- 175- Tripathi, K.D. (2008). *Essentials of medical pharmacology*. 6th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. : New Delhi.
- 176- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of food protection*, 63(5), 620-624.
- 177- Valnet, J. (2005). *phytothérapie. 10^{ème} Edition Maloine*.
- 178- Viaud, H. (1993). Les huiles essentielles, qualité distillation. GNOMA, Revue électronique. www.naturehelps.com/France/viaud2.htm.
- 179- Viuda-Martos, M., Mohamady, M.A., Fernández-López, J., Abd El-Razik, K.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A. and Sendra, E.(2011): *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22(11): 1715-1722.
- 180- Vokou, D., Kokkini, S., & Bessiere, J. M. (1988). *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece : distribution, volatile oil yield, and composition. *Economic Botany*, 42(3), 407-412.
- 181- Wendakoon, C. N., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of food protection*, 58(3), 280-283.
- 182- Williams, C. ., & Grayer R.J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*, 21(4), 539–573.
- 183- Zhiri, A. (2006). *Aromathérapie*, Nutranews, Ed : fondation libre choix. 2-16.
- 184- Ziyayat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., & Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 58(1), 45-54.



Annexe 01 : Epuisement du matériel végétal

L'épuisement est réalisé dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant contenant 50 g de poudre de matériel végétal en présence de 300 ml de solvant : éthanol ou eau.

L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et soumis à différents tests.



Annexe 01 : le mélange de l'extrait éthanolique



Annexe 01 : Filtration de l'extrait éthanolique

Annexe 02 : Préparation de l'infusé aqueux

Une masse de 5 g de poudre végétale est mise dans 100 ml d'eau bouillante pendant 15 minutes.

Nous avons filtré les extraits sur du papier filtre et rincé avec de l'eau chaude de manière à obtenir 100ml.

Annexe 03 : Réactifs et réaction de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests sont les suivants :

Réactif de Wagner : Dissoudre 2 g de KI et 1,27g d'I₂ dans 75 ml d'eau. Ajouter le volume total à 100ml d'eau.

Réactif de Mayer : Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60ml d'eau et également 5g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajouter le volume total à 100 ml d'eau.

Réactif d'amidon : Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.

Réactif de Liebermann-Burchardt : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter le tout et laisser la solution reposer pendant 30 minutes à 21°C.