

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique



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

**Département : Biologie**  
**Spécialité : Microbiologie Appliquée**

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

**Thème :**

**Valorisation de l'Huile Essentielle de *Mentha pulegium* L  
récoltée dans la région de Rouina  
Wilaya d'Ain Defla**

**Présenté par :**

**M<sup>me</sup>: ABID Aouda**  
**M<sup>lle</sup> : MORDJANI Nawel**

**Soutenu le : 22 /07/2019**  
**Devant le jury composé par :**

<b>Présidente</b>	M <sup>me</sup> GUITARNI	Hassina	MCA	UDBKM
<b>Promoteur</b>	M <sup>r</sup> KOUACHE	Benmoussa	MAA	UDBKM
<b>Co-promotrice</b>	M <sup>me</sup> CHABANE	Safia	Ingénieure	UDBKM
<b>Examineur</b>	M <sup>r</sup> CHORFFA	Mohamed	MAA	UDBKM
<b>Examineur</b>	M <sup>r</sup> HAMIDI	Djamel	MAA	UDBKM

**Année universitaire : 2018/2019**

## ***Remerciements***

Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de DIEU, qui nous offre santé, force, Patience et volonté jusqu'au dernier moment.

« Celui qui ne remercie pas les gens ne remercie guère Dieu ».

Alors, Il ne me serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à notre promoteur Mr KOUACHE Benmoussa pour avoir accepté de nous encadrer et diriger.

Nos remerciements vont également à notre Co-promotrice Mme CHABANE Safia pour avoir bien voulu nous orienter et nous guider, pour sa gentillesse, ses conseils précieux et ses orientations qu'elle n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail de mémoire.

Je remercie également M<sup>me</sup> GUITARNI Hassina, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr CHORFA Mohamed pour avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je voudrais adresser un remerciement particulier plein de reconnaissance et de gratitude à Mr HAMIDI Djamel d'avoir accepté de nous apporter un plus, je ne serai jamais oublier ses bienfaisance.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux personnels du laboratoire de bactériologie de pour leur assistance et leur sympathie

Je n'oublie pas de remercier mes chers amis

Enfin, mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

**AOUDA et NAWEL**



# Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

- \* A mes chers parents.
- \* A mon marie
- \* A mes frères et sœurs.
- \* A toute ma famille
- \* A mon binôme (N)
- \* A tous mes chères amies.

AOUDA



# Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

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

**\*A ma sœur et mes frères qui ont toujours été présents avec moi.**

**\*A mon binôme(A).**

**\*Ainsi qu'à tous mes amies.**

NAWEL

## Résumé

L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium L* par hydrodistillation réalisée sur des échantillon provenant de la commune de Rouina ont permis de donner des rendements variant de 0.54% à 1.8%.

La composition chimique de l'huile essentielle extraite a été déterminée par (GC/MS) et a permis d'identifier 20 composés dont les principaux constituants sont : le Pulegone (71.25 %), le Menthone (11.97 %) limonène (3.56 %), Myrcene (1.20 %) et Mentho l(0.98%).

L'activité antimicrobienne d'HE de *Mentha pulegium L* a été testée sur quatre souches bactériennes et sur la levure par la technique de l'aromatogramme. a montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium L* a une grande action inhibitrice sur la croissance des cinq germes pathogènes testés, à savoir, *Echerichia coli* zone d'inhibition 16mm , *staphylococcus aureus* zone d'inhibition 18.5mm , *Psoudomonas aeruginosa* aucune zone d'inhibition , *klebsiella pneumonia* , et *Candida albicans* zone d'inhibition qui varie entre 21.5et 22mm.

Mots clés : *Mentha pulegium* – hydrodistillation –huile esentielle – aromatoigramme-  
Bactérie – levure.

**Abstract**

Extraction of the essential oil of *Mentha pulegium* L by hydrodistillation performed on samples from the commune of Rouina yielded yields ranging from 0.54% to 1.8%.

The chemical composition of the extracted essential oil was determined by (GC / MS) and identified 20 compounds whose main constituents are: Pulegone (71.25%), Menthone (11.97%) limonene (3.56%) , Myrcene (1.20%) and Mentho l (0.98%).

The antimicrobial activity of HE *Mentha pulegium* L was tested on four bacterial strains and on yeast by the aromatogram technique. has shown that the essential oil of *Mentha pulegium* L has a great inhibitory action on the growth of the five pathogens tested, namely, *Echerichia coli* inhibition zone 16mm, *staphylococcus aureus* inhibition zone 18.5mm, *Psoudomonas aeruginosa* no d inhibition, *klebsiella pneumonia*, and *Candida albicans* inhibition zone that ranges between 21.5and 22mm.

Key words: *Mentha pulegium* - hydrodistillation - essential oil - aromatogram - Bacterium - yeast.

استخراج الزيت العطري من  
يتراوح بين 0.54 و 1.8 .  
عن طريق التعرية المائية التي أجريت على عينات من بلدية الروينة

تم تحديد التركيب الكيميائي للزيوت العطرية المستخرجة بواسطة (GC / MS) وتحديد 20 مركبًا مكوناتها الرئيسية:  
بوليجون (71.25) ( %11.97) ليمونين (%3.56) ، الميرسين (% 1.20) والمينتول (0.98) .

ار النشاط المضاد للميكروبات لزيت العطري من  
على أربع سلالات بكتيرية وعلى الخميرة بواسطة  
تقنية الروماتيزم. قد أظهر أن الزيت العطري له تأثير مثبط كبير على نمو العوامل المرضية الخمسة التي تم اختبارها ،

الكلمات المفتاحية: منتوليا بوليجوم - هيدروديستيليشن - -  
- بكتيريا - خميرة.

## Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

ATF : Antifongique

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

D : dilution

L: Linné

pH : potentiel Hydrogène

UFC = Unités Formant Colonies

µl : micro-litre

OMS : l'Organisation Mondiale de la Sante



### Listes des figures

<b>Figure 01:</b> Représentation schématique de <i>Mentha pulegium</i> L	<b>03</b>
<b>Figure 02 :</b> Aire de répartitions des menthes dans le monde.	<b>04</b>
<b>Figure 03 :</b> lieu de formation et d'accumulation des huiles essentielles.	<b>05</b>
<b>Figure 04:</b> Glande sécrétrice de la feuille de la menthe des jardins.	<b>07</b>
<b>Figure 05 :</b> Situation géographique de site de prélèvement.	<b>14</b>
<b>Figure 06 :</b> plante de <i>Mentha pulegium</i> L avant et après le séchage.	<b>15</b>
<b>Figure 07 :</b> Hydro-distillateur de type clewenger.	<b>17</b>
<b>Figure 08 :</b> dilutions de l'HE .	<b>19</b>
<b>Figure 09 :</b> coullage les milieux dans les boites pétries.	<b>20</b>
<b>Figure 10 :</b> Ensemencement.	<b>20</b>
<b>Figure 11 :</b> Application des disques.	<b>21</b>
<b>Figure12:</b> Mesure des zones d'inhibitions.	<b>21</b>
<b>Figure13:</b> Teneur en MS de <i>Mentha pulegium</i> L. de la région de Rouina.	<b>22</b>
<b>Figure 14 :</b> Représentation graphique de la cinétique d'extraction de l'HE de <i>M pulegium</i> L.	<b>24</b>
<b>Figure15 :</b> Représentation graphique de rendement d'extraction de l' HE de <i>M pulegium</i> l.	<b>24</b>
<b>Figure16 :</b> résultats antibiogramme (Photo personnel).	<b>29</b>

## Listes des tableaux

<b>Tableau01:</b> composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i> .	<b>06</b>
<b>Tableau02 :</b> Influence de l'origine botanique sur le rendement et la composition d'HE.	<b>10</b>
<b>Tableau 03 :</b> coordonnées géographique de site de prélèvement.	<b>14</b>
<b>Tableau04 :</b> Les caractéristiques des souches microbiennes utilisées.	<b>16</b>
<b>Tableau 05 :</b> Caractères organoleptiques de l'huile essentielle	<b>23</b>
<b>Tableau 06 :</b> La quantité d'HE extraite chaque 30 min	<b>23</b>
<b>Tableau07 :</b> la quantité d'HE extraie chaque 30 min	<b>25</b>
<b>Tableau 08:</b> Composition chimiques d'HEde <i>M pulegium L.</i>	<b>26</b>
<b>Tableau 09:</b> Diamètre des zones d'inhibitions en mm en fonction des dilutions de l'huile essentielle.	<b>27</b>
<b>Tableau 10 :</b> Diamètres des zones d'inhibition en fonction desDilutions minimales inhibitrices	<b>30</b>

## **sommaire**

**REMERCIEMENT**

**DEDICACE**

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction** **01**

### **CHAPITRE I : LES LAMIACEES**

**Introduction** **02**

**1-Description général des lamiacées** **02**

**2- Description botanique de *Mentha pulegium L.*** **03**

**2.2. Classification botanique de *Mentha pulegium L.*** **03**

**2.3. Distribution géographique** **04**

**3. Huile essentielle** **04**

**3.1. Définition** **04**

**3.2. Origine de formation et d'accumulation** **05**

**3.3. Composition chimique de *Mentha pulegium L.*** **05**

**3.4. Caractéristiques et propriétés physicochimiques** **06**

**3.5. Propriétés et usages** **06**

**4. Facteurs influençant le rendement et la composition chimiques des huiles essentielles** **07**

**4.1.L'organe producteur :** **07**

**4.2.L'origine botanique** **07**

**4.3.Chémotype** **07**

**4.4.La température** **07**

**4.5.La fréquence et l'intensité de la précipitation :** **08**

**4.6.Cycle végétatif** **08**

**4.7.Le patrimoine génétique** **08**

**4.8. Méthode d'extraction** **08**

**4.9.Les conditions de stockage et de conservation** **09**

**5. Ecologie et conditions culturales** **09**

**6. Activité biologique des huiles essentielles** **10**

<b>6.1. Activité antimicrobienne</b>	<b>10</b>
<b>6.1.1. Sites d'action de quelques composés des huiles essentielles</b>	<b>11</b>
<b>6.2. Activité antifongique</b>	<b>12</b>
<b>6.2.1. Mode d'action antifongique</b>	<b>12</b>
<b>6.3. Synergie et antagonisme entre les constituants des huiles essentielles</b>	<b>12</b>
<b>7. Propriétés Thérapeutiques</b>	<b>13</b>
<b>8. Autres utilisations</b>	<b>13</b>

## **CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES**

<b>1. Objectifs</b>	<b>14</b>
<b>2. Présentation de la région d'étude</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Climatologie de la commune</b>	<b>14</b>
<b>3. Matériel et méthodes</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Matériel végétal</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Le matériel biologique</b>	<b>15</b>
<b>4. Détermination de la matière sèche :</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Extraction de l'huile essentielle</b>	<b>16</b>
<b>4.2. Procédé d'extraction</b>	<b>17</b>
<b>4.3. Cinétique d'extraction</b>	<b>17</b>
<b>4.5. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse cg/sm :</b>	<b>18</b>
<b>4.6 Détermination de l'activité antimicrobienne</b>	<b>18</b>
<b>4.6.2. Préparation des dilutions de l'HE :</b>	<b>19</b>
<b>4.6.3. Technique de l' Aromatogramme</b>	<b>19</b>
<b>4.6.4. Expressions des résultats</b>	<b>21</b>

## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>1. Détermination de la matière sèche</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Caractéristiques organoleptiques</b>	<b>23</b>
<b>1. Résultats de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de <i>Mentha pulegium l</i></b>	<b>23</b>
<b>3. Rendement d'extraction</b>	<b>24</b>
<b>4. Caractérisation des huiles essentielles de <i>M pulegium l</i> par CPG/SM :</b>	<b>26</b>
<b>5. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>M pulegium L</i></b>	<b>26</b>

<b>5.1.Dilutions Minimales Inhibitrices (DMI)</b>	<b>30</b>
<b>Conclusion</b>	<b>31</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

### Introduction

Les plantes sont depuis toujours utilisées par les populations à des fins curatives. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), quatre-vingt pourcent de la population des pays en voie de développement ont recouru presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé primaire (**Kansole, 2009**).

Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant des huiles essentielles des plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne (**Berube-Gagnon, 2006**).

Cette grande variabilité des huiles essentielles, tant au niveau de leur composition que de leur rendement est fondamentale car les activités qui découlent de ces huiles peuvent être très différentes (**Benini, 2007**). Elle peut s'expliquer, en effet, par des facteurs d'origine intrinsèques, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèques, liées à la condition de croissance et de développement de la plante (**Bruneton, 1999**).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur des espèces de la famille des Lamiaceae à l'Algérie (**Khaled khoudja et al., 2014**), du Maroc (**Cherrat et al., 2014**) et de la France (**Regnault-Roger et al., 2004**).

Nous voulons dans notre étude contribuer à la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les lamiacées. Nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Mentha Pulegium*L, récoltée de la commune de Rouina wilaya de Ain Defla.

Nous avons organisé notre travail en deux grandes parties:

La première partie, consiste en une simple synthèse bibliographique sur la plante de *Mentha Pulegium*L. Et les huiles essentielles.

La deuxième partie, consacrée à la présentation du matériel et méthode utilisés ainsi que les résultats obtenus avec discussion.

Enfin une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

**CHAPITRE I**  
**LES LAMIACEES**

## Introduction

Parmi les 400 000 espèces, les botanistes ont recensé environ 10 % de plantes aromatiques qui se retrouvent surtout dans les régions ensoleillées. Ces plantes, dotées d'un degré de sophistication important, se différencient des autres par la présence dans leurs tissus d'un certain nombre de composants très spécifiques par leurs caractères physiques et aromatiques (essences naturelles). Cette essence naturelle a reçu l'appellation d'huile essentielle reflétant son aspect plus ou moins liquide et huileux (**Gérard., 2016**).

### 1-Description général des lamiacées

La famille des lamiacées aussi nommée labiacées, est considérée comme l'une des principales familles méditerranéennes à essences (**Guignard., 1996**). Cette famille angiosperme dicotylédone comprend environ 258 genres et 6970 espèces (**Botineau, 2010**).

La famille des lamiacées est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques, leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portant des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irréguliers groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses. Le calice est synsépale, bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle à tube très développé, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant une lèvre inférieure (**Guignard., 2001**). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine (**Guignard., 1998**).

Selon **Bray., 2005**, la classification des lamiacées est la suivante :

<b>Embranchement</b>	Phanérogames
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous-classe</b>	Gamopétales
<b>Série</b>	Superovariées tétracycliques
<b>Super ordre</b>	Tubiflorales
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiacée



## 2- Description botanique de *Mentha pulegium* L.

L'espèce *Mentha pulegium* L pousse à l'état spontané dans les lieux humides des plaines et des montagnes, Herbe vivace à tiges feuillées et fleuries presque à partir de la base, jusqu'au sommet; feuilles opposées, ovales lancéolées et munies d'un court pétiole; inflorescences en petits groupes de verticilles presque globuleux, plus ou moins espacés le long de la tige. Les fleurs, qui apparaissent l'été, de juillet à fin septembre, sont de couleur bleu violacé clair, rose ou mauve ; son odeur aromatique rappelant la menthe poivrée (**Baba Aissa, 1999**).

La menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.), appelée localement « Fliou », est également appelée pouliot, pouliot royal, herbe aux puces, chasse puce, herbe de Saint Laurent. Elle pousse dans les lieux humides des plaines et des montagnes (**Mossaddak, 1995**).



**Figure N°01:** Représentation schématique de *Mentha pulegium* L

### 2.2. Classification botanique de *Mentha pulegium* L

Selon **Quezel et Santa (1963)**, la classification classique de *Mentha pulegium* L (fig1) est :

Règne	Plantae.
Division	Plantae.
Classe	Magnoliophyta
Ordre	Magnoliopsida.
Famille	Lamiales.
Genre	<i>lamiaceae</i> .
Espèce	<i>Mentha pulegium</i> L.

### 2.3. Distribution géographique

*Mentha pulegium L* est une espèce généralement connue sous le nom de pennyroyal. C'est une plante spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'Afrique du Nord (du Maroc à l'Égypte) et dans l'Asie Mineure et le Proche Orient (Chalchat *et al.*, 2000), assez commune surtout dans le Tell (Quezel et Santa, 1963).



Figure 02 : Aire de répartition des menthes dans le monde. (Chalchat *et al.*, 2000),

### 3. Huile essentielle

#### 3.1. Définition

Le terme « *Mentha pulegium L* » fut inventé par le médecin suisse paracelse von hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel (porter, 2001). On les appelle couramment : essences, essences végétales, huiles ou essences aromatiques, parfums, huiles volatiles.

Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange de substances odorantes, incolores ou jaunâtres, liquides à température ambiante, assez volatiles, très peu solubles dans l'eau et plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, plus ou moins fluides, voire résinoïdes (bardeau, 1978).

Ces molécules sont présentes en faible quantité dans les plantes aromatiques (jouault, 2012). Elles sont extraites de différentes parties des végétaux aromatiques dont les fleurs, les feuilles, les tiges, les fruits, les graines, les racines, les aiguilles, le bois, l'écorce, les boutons floraux, les bulbes, le rhizome, les bourgeons et la sève (pibiri, 2005 ; laurent, 2016).

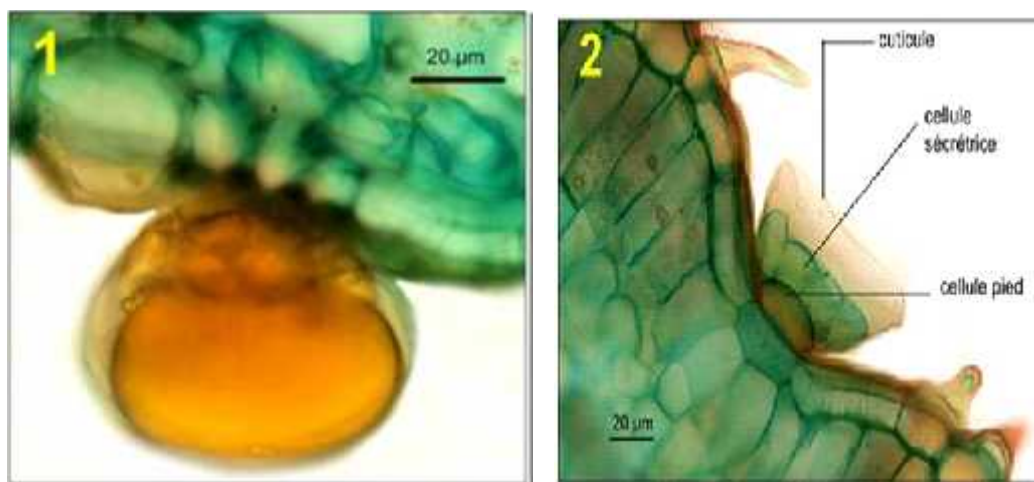
cependant, ils sont obtenus par : entraînement à la vapeur (le plus fréquent) ; hydrodistillation ; distillation sèche, (quelque cas, dont l'huile essentielle de cade utilisée en

dermatologie) ;expression à froid ; procédé mécanique approprié sans chauffage des agrumes (uniquement pour le genre citrus) ( **bruneton, 1999**).

### 3.2. Origine de formation et d'accumulation

Les HEs sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante : Les fleurs, les feuilles, les organes souterrains, les fruits, les graines, le bois et les écorces; elles se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées. (**El kalamounni 2010**).

Ces composés aromatique sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur Presque toutes les parties de la plante, au sein du cytoplasme de certaines cellules ou elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes, ensuite elles sont stockées dans des cavités, les cellules sécrétrices sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante ce qui facilite leur émission (**Brunuton, 1990**).



1-Poil sécréteur contenant une goutte d'HE 2-Poil sécréteur ayant libéré son H  
**Figure 03** : lieu de formation et d'accumulation des huiles essentielles

### 3.3. Composition chimique de *Mentha pulegium L*

La menthe pouliot contient une huile essentielle .C'est un liquide jaunâtre , d'odeurs très fortes, solubles dans l'alcool , composées de 75 à 80% de pulégone liquide incolore d'odeur aromatique et de menthol de limonène lévogyre de dipentène , la menthe pouliot contient également du tanin , des matières cellulosique et pectique , du sucre etc, (**Beloued, 1998**). Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition que de leur rendement .Cette variabilité est fondamentale car les activités qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes ( **Bruneton , 1999 ; Benini, 2007**).Elle peut s'expliquer, en effet par des facteurs d'origine intrinsèques, spécifiques du

bagage génétique de la plante ou extrinsèques, liées au condition de croissance et développement de la plante (**Bouguerra, 2012**).

### 3.4. Caractéristiques et propriétés physicochimiques

Les huiles essentielles sont des liquides de couleur qui varie de l'incolore au brun clair, volatils à la température ambiante avec un indice de réfraction élevé et une densité inférieure à celle de l'eau (de 0,850 à 0,950). Leur point d'ébullition varie de 160° à 240° C (**charpentier et al., 2008**). dévient la lumière polarisée. (**bruneton, 1999**), solubles dans les graisses et les solvants apolaires, organiques (**duraffourd et lapraz, 2002**), se caractérisent par différentes indices, indice d'acide, indice d'ester, indice de saponification et indice de carbonyle (**charpentier et al., 2008**). les huiles essentielles sont neutres au tournesol, s'oxydent à la lumière, absorbent le chlore, l'iode avec dégagement de chaleur. Elles peuvent se combiner à l'eau pour former les hydrates (**duraffourd et lapraz, 2002**).

**Tableau01:** composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium*.

Paramètres	Valeurs
Densité à 20°C	0.9379
Indice de réfraction	1.4805
Indice d'acide	69.88

### 3.5. Propriétés et usages

Les feuilles et les sommités fleuries de *Mentha pulegium* L. sont des antiseptiques et ont été employées pour le traitement du froid, de l'intoxication, de la sinusite, du cholera, de la bronchite et de la tuberculose (**Zargari, 1990**), elles sont aussi des antioxydants (**EL-Ghorab, 2006**).

Cette espèce est très utilisée pour soigner les rhumes, les maux de gorge, la toux et les infections pulmonaires; elle est aussi un excellent digestif (**Hmamouchi, 2001**).

L'huile essentielle de *Mentha pulegium* L possède une activité antibactérienne (**Derwich et al., 2010; Mahboubi, 2008**). L'odeur agréable du pouliot semble déplaire à certains parasites, et son pouvoir insecticide est bien établi. Autrefois, on se brûlait dans des locaux infestés par les puces, et on l'utilisait aussi sous forme de lotion, sur le pelage des animaux domestiques pour les débarrasser de ces nuisibles parasites (**Baba Aissa, 1999**).

La menthe pouliot est surtout employée en Italie, par exemple pour agréments les farces et les pâtes relèves. Elle est également recommandée pour assaisonner le boudin ou les saucisses aux herbes (**Callery, 1997; Seidemann et Wurzmittel-Lexikon, 1997**).

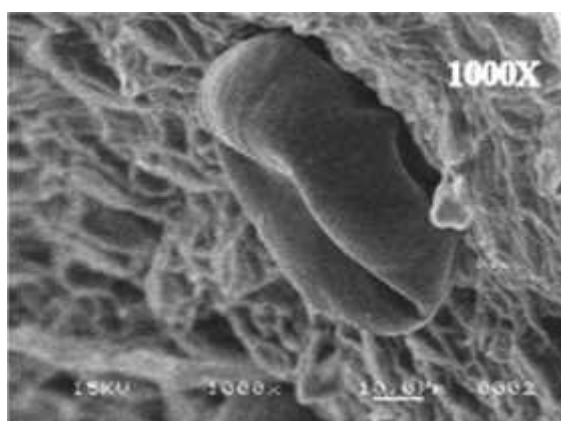
En Algérie on l'apprécie beaucoup, si bien qu'on s'en sert pour préparer un plat traditionnel: le ragout de pomme de terre au pouliot « batatafliou » (Baba Aissa, 1999).

#### 4. Facteurs influençant le rendement et la composition chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui en découlent peuvent être très différentes (Bruneton, 1999 ; Benini, 2007).

##### 4.1.L'organe producteur :

Tous les partis de la plante, de mêmes espèces, peuvent renfermer une huile essentielle et sa composition varie selon sa localisation (Faleiro et al., 2003).



**Figure 04:** Glande sécrétrice de la feuille de la menthe des jardins (Marie-Elisabeth,2005)

##### 4.2.L'origine botanique

Toutes les plantes ne sont pas aromatiques et même quand elles le sont, les constituants sont variables tant dans leur nature que dans leur proportions (Saidj, 2006)

##### 4.3.Chémotype

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle. C'est l'élément qui permet de distinguer de H.E extraite d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation plus précise, et plus efficace. Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotype différent présente non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2005).

##### 4.4.La température

La formation des principes actifs se fait spécialement pendant la période croissance et durant les temps de métabolismes intensifs comme les périodes de floraison et de fructification (Naghdi et al., 2004). Outre la composition, ces facteurs peuvent également

avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (**Brueton, 1999**).

#### **4.5. La fréquence et l'intensité de la précipitation :**

La pluviométrie influe sur variations de la composition chimique d'une plante aromatique donné (**Fallah et al., 2006**).

#### **4.6. Cycle végétatif**

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal concernant le rendement et la composition chimique en huile essentielle ( **Perry et al., 1999**). Pour une espèce donnée, la proportion des différents éléments constitutifs de l'huile essentielle peut varier de façon importante tout au long du développement. Ainsi, des changements importants sont observés au cours de la vie de la plante (**Bruneton, 2009**).

**Hudaib et al (2002)** ont montré l'influence de l'âge ou le stade de développement de la plante sur le rendement et la composition de l'huile. (**Stefanini et al., 2006**). Le stade végétatif a une influence sur la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles

#### **4.7. Le patrimoine génétique**

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est biosynthèse et donc son profil génétique, c'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimique différents, il existe nombreux exemples d'un même phénomène, notamment chez le thym, la sauge (**Anton et al., 2005**).

#### **4.8. Méthode d'extraction**

Des études effectuées par **Huang et al. (1995)** et **Gomes et al. (2004)** avaient montré l'influence de la technique d'extraction sur le rendement et la composition des huiles essentielles.

La labilité des constituants des HEs explique que la composition du produit obtenu par hydro distillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal **Lucchesi (2005)**.

Toutefois, l'hydro distillation possède des limites. En effet, le chauffage prolongé et puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire des réarrangements

C'est ainsi que pour certains végétaux fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit de la distillation dite sèche. Cette technique ancestrale, (**Chemat et al., 2004**).

#### **4.9. Les conditions de stockage et de conservation**

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles (**Besombes, 2008**). (**Fantino, 1990**) a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution sur la composition. Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles

Les huiles essentielles doivent être conservées correctement pour préserver leur qualité. Avec le temps, elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air, la lumière...etc., Il faut les conserver dans un endroit frais, à l'abri de la lumière, dans du verre brun ou de l'aluminium vitrifié. Une essence bien distillée se conserve trois ans au moins (**Benbouli, 2005**).

Pour assurer une bonne conservation, c'est-à-dire favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique après la récolte, il faut éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération microbienne. La distillation immédiate ou un séchage soigneux étant les deux procédés utilisés. D'après **Carette (2000)**, les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

#### **5. Ecologie et conditions culturales**

Toutefois, le rendement et la composition chimique des huiles essentielles peuvent être affectés sous l'effet des conditions pédoclimatiques et ce, pour la même espèce, le même génotype, le même stade de développement (**Bruneton, 1999 ; Bakkali et al., 2008**) ainsi que l'origine géographique de la plante (**Mohammedi, 2006 ; Mohamed et al., 2009**).

Les mauvaises herbes influencent négativement la composition chimique de l'huile (**Rao et al., 2002**). Le désherbage a un effet sur l'augmentation du rendement et pourrait être effectué soit en choisissant une culture intercalaire ou encore un apport de paille. Plusieurs études ont confirmé cette tendance notamment celles de **Mosta (2006) ; Rao Br (2002)** et **Rodolfo et al. (2006)**.

L'altitude joue un rôle important sur le rendement en huiles essentielles. En effet, plus on progresse en altitude plus le rendement en huiles essentielles diminue (**Hazzit et al 2006**,

2009 et Zouari et al 2012). Le tableau ci-dessous montre que quelque soit l'origine de la plante,

**Tableau02 :** Influence de l'origine botanique sur le rendement et la composition d'HE.

Espèce	Origine des plantes	Composants majeurs	Rendement %	Références
<i>Mentha pulegium L</i>	Bulgarie	pulégone menthone	1.6	<b>Sivropoulou et al., 1995</b>
	Brazil	pulégone menthone	1.1	<b>Baydar et al., 2004</b>
	Italy	la pipériténone pulégone	0.44	<b>Stoyanova et al. 2005</b>
	Iran	piperitone pulégone	0.56	<b>Mahboubi et Haghi, 2008</b>
	Algeria	pulégone menthone	1.45	<b>Chalchat et al. 2000</b>

## 6. Activité biologique des huiles essentielles

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires. Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. Le succès connu de la médecine traditionnelle a guidé la recherche de nouveaux agents chimio thérapeutiques alternatifs pour éliminer les infections causées par des microbes pharmaco-résistants et à réduire les méfaits causés par les antibiotiques (**Baydar et al., 2004 ; Udomsilp et al., 2009**).

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes.....

### 6.1. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques. Ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies et les infections. le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité- buccale est un exemple parmi d'autres, des domaines d'application de l'activité des huiles essentielles (**gherib, 2009**).



Elles sont employées dans les aliments pour prolonger leur durée de conservation (Gachkar et al., 2007 ;Ghasemi et al., 2010) mais le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles diminue en raison de leur volatilité et leur lipophilicité (Hadizadeh et al., 2009 ; Foda et al., 2010).

La plupart des études développant l'action des HEs sur la détérioration des organismes et agents pathogènes concluent généralement que les HEs sont plus actives contre les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif (Ouattara et al., 1997 ; Smith-Palmer et al., 1998 ; Ruberto et al., 2000 ; Lambert et al., 2001 ; Smith-Palmer et al., 2001). Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004).

Il existe cependant quelques exceptions, les bactéries à Gram négatif telles que : *Aeromonas hydrophila*, *P. aeruginosa* (Goetz et Ghedira, 2012) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et al., 2005), ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles

IL y a d'autres activités biologiques des huiles essentielles (voire annexe 04)

## 6.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles ont également des propriétés fongicides. Elles sont utilisées en tant que pesticides car elles ne sont pas toxiques pour les plantes et sont facilement dégradables et son très efficace contre les moisissures responsables des denrées alimentaires lors de leurs stockages (Fillatre, 2011).

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles pourraient être employées comme agents de protection contre les champignons Juarez et al. (2016) et les micro-organismes envahissant la denrée alimentaire (Lis- Balchin., 2002).Les plus étudiées dans la littérature, pour leurs propriétés antifongiques

## 6.3.Synergie et antagonisme entre les constituants des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des composés chimiques isolés est qualitativement identique. Cependant, il existe des différences quantitatives. Certaines études ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est supérieure à celle de ses composés majoritaires testés en mélange ou séparément (Lahlou, 2004), ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité et qu'ils peuvent avoir un effet synergique ou amplificateur de l'activité.

Les deux principaux constituants de structure voisine et présents dans les huiles essentielles d'origan, carvacrol et thymol, présentent un effet additif contre *Staphylococcus*

*aureus* et *P. aeruginosa* (Goetz et Ghedira, 2012). Le précurseur biologique du carvacrol, le p-cymène, présente un caractère hydrophobe et provoque le gonflement de la membrane cytoplasmique dans une plus grande mesure que le carvacrol. Utilisé seul, le p-cymène ne présente pas d'activité antibactérienne significative, lorsqu'il est associé au carvacrol, on observe une synergie d'action des deux composés contre *B. cereus* in vitro. Une plus grande efficacité du p-cymène est signalée lorsqu'il est incorporé dans la bicouche lipidique de *B. cereus*, facilitant vraisemblablement le transport du carvacrol à travers la membrane cytoplasmique (Goetz et Ghedira, 2012).

### 7. Propriétés Thérapeutiques

la menthe pouliot est largement utilisée en médecine populaire dans de nombreuses cultures (agnihotri et al., 2005 ; diaz-maroto et al., 2007).

Les parties aériennes fleuries de cette plante sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes, expectorantes, carminatives et antispasmodiques dans le traitement du rhume, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, le choléra, les intoxications alimentaires, les flatulences et les coliques intestinales (zargari, 1990).

Depuis l'antiquité, les menthes conservent une grande diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. Elles fortifient tout le système nerveux, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible, la menthe rend d'éminents services contre la nervosité et les différentes manifestations nerveuses (benayad, 2008).

C'est est un excellent digestif. Elle stimule les sécrétions gastriques, réduit les flatulences et les coliques, et, à l'occasion, élimine les vers intestinaux. elle fait baisser la fièvre, favorise la sécrétion des muqueuses et constitue un bon remède contre les maux de tête et les infections respiratoires bénignes, (hart et al. , 2000).

### 8. Autres utilisations

Les huiles essentielles sont employées en tant qu'agents conservateurs grâce a leurs propriétés antimicrobiennes et antiseptiques qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit (bekkali, 2007).

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antioxydants et antimicrobiennes sur plusieurs bactéries responsable de la pollution des aliments et pourraient servir d'agents de conservation alimentaires (Burt, 2004 ).

**CHAPITRE II**

**MATERIELS**

**ET METHODES**

## 1. Objectifs

L'objectif de notre travail réside, en premier dans l'extraction des huiles essentielles extraite de *Mentha pulegium L.*, la détermination de la composition chimique des huiles et enfin de tester éventuellement antimicrobienne notamment sur les souches *Echerichia coli*, *staphylococcus aureus*, *Psoudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumonia*, et *Candida albicans*

## 2. Présentation de la région d'étude

La région de ROUINA est située à l'extrême sud-ouest, soit à 12 km de la Wilaya d'Aïn Defla .Elle est limitée au nord par la commune de elamra , et au Est par la Wilaya de Aïn Defla , à Sud par la commune de bourached et zodine, à l'Ouest par la commune elattaf .



**Figure 05 :** Situation géographique de site de prélèvement (google MAPS).

**Tableau 03 :** coordonnées géographique de site de prélèvement.

Région	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Nord algérien	186	36° 15' 00''N	1°49'.00'' E

### 2.1. Climatologie de la commune

La commune de Rouina présente un climat méditerranéen semi-aride avec un caractère de continentalité très marqué et un écart de température de 20°C entre les températures du mois de janvier et celle d'août. L'été s'étend sur 5 à 6 mois environ, avec des masses d'air

Chaud à partir du mois de mai. La pluviométrie reste variable et atteint 500 à 600 mm/an. Une série d'étages climatiques Qui va du sub -aride au fond de la vallée au sub-humide sur les reliefs. Cette situation est liée à l'orographie: plus l'altitude est élevée plus l'étage est humide.

Parmi les paramètres climatique qui sont pris on compte sont : la pluviométrie, la Température et le vent). (DPAT, 2010).

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Matériel végétal

Les parties aériennes (feuilles et fleurs) *Mentha pulegium L* ont été récoltées durant les mois d'Août 2018 (période de floraison) et mai 2019. Le matin à 8:30h, Les échantillons recueillis sont étalés, séchés, à l'air libre, pendant sept jours jusqu'à la stabilité du poids et permettant ainsi de garantir plus tard une bonne conservation des paramètres physicochimiques des huiles essentielles et d'empêcher la prolifération éventuelles des bactéries.



phto1 : plante verte



phto 2 : plante séchée

**Figure 06** : plante de *Mentha pulegium L* avant et après le séchage.

#### 3.2. Le matériel biologique

Le teste antimicrobienne est effectué sur des bactéries notamment *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et la levure « *Candida albicans* ATCC 10231 »

**Tableau04** : Les caractéristiques des souches microbiennes utilisées.

Espèce microbienne	Caractéristiques	Provenance
<i>Escherichia coli</i>	Bacille, mobile, Gram-, pathogène.	Laboratoire de microbiologie du laboratoire médicale privé d'Ain Defla
<i>Staphylococcus aureus</i>	coques, immobile, Gram+.	
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Bacilles, Gram-, mobile, pathogène.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilles, Gram négatif, immobile et capsulé.	
<i>Candida albicans.</i>	levure unicellulaire, hétérotrophe.	

#### 4. Détermination de la matière sèche :

La détermination de la matière sèche dans nos échantillons a été faite par le procédé de dessiccation (séchage) d'une quantité de 3g de la matière à une température de  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à la stabilité du poids pris en général pendant 4h (twindell et al., 2007).

Le taux de matière sèche a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{MS \%} = \frac{M^{\circ}}{M} \times 100$$

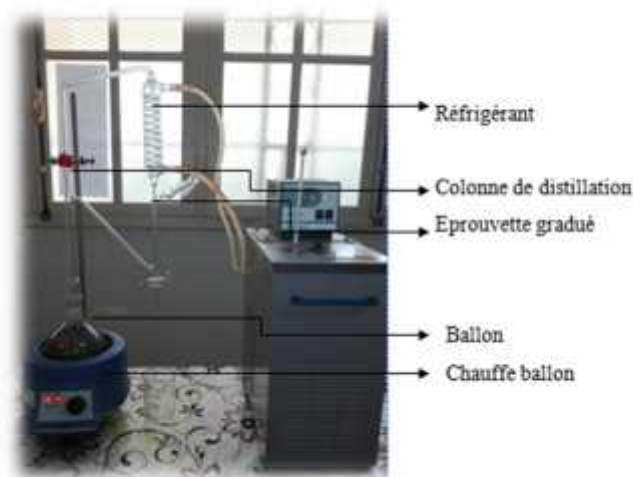
**M°**: la masse en gramme du matériel végétal après déshydratation

**M**: la masse en gramme du matériel végétal séché à l'air libre

**MS%**: le taux de matière sèche.

#### 4.1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium L* a été effectuée par hydro-distillateur de type clewenger. Il est constitué d'une chauffe ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place le matériel végétal et de l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation.



**Figure 07 :** Hydro-distillateur de type clevenger (Photo personnel).

#### 4.2. Procédé d'extraction

Un échantillon de 50 g de feuilles séchées de l'espèce *mentha pulegium* est placé dans un ballon en verre pyrex, additionnées de 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube à décantation de la vapeur, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position verticale pour faciliter l'écoulement du distillat. le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. en fin, le distillat est recueilli puis préservés de l'air et de la lumière puis les conservés dans le réfrigérateur à une température de 4°C le temps de réaliser les différentes testes.

#### 4.3. Cinétique d'extraction

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *mentha pulegium* à l'état sec, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps de 30 min qui s'étalent de 0 à 90 minutes.

- masse de la matière végétale :  $mmv = 50g$
- volume d'eau distillée :  $ved = 500ml$
- chauffage : à la température :  $t^{\circ} = 100^{\circ}c$

nous avons réalisé plusieurs tours d'extractions (hydrodistillation) successives en fonction de la durée de temps.

#### 4.4. Calcul du rendement

Selon la norme **afnor(1986)**, le rendement en huile essentielle (Rd) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (m') et la masse de la matière végétale utilisée (m). .

Les quantités des huiles essentielles obtenues permettent le calcul des rendements à chaque intervalle de temps par la formule suivante :

$$Rd (\%) = M' / M . 100$$

RD: rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%).

M': masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g).

M: masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g).

#### 4.5. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse cg/sm :

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse, type perkin elmer clarus 500, avec détecteur d'ionisation de flamme (fid), couplé à la spectrométrie de masse perkin elmer clarus 600, deux colonnes capillaires de silice fondues (30mx0.25mm, 0.25µm épaisseur de film) sont utilisées: l'elite-wax est une colonne polaire avec du polyéthylène glycol comme phase stationnaire et la colonne elite 1 de la phase stationnaire 100% dimethyl polysiloxane en tant que colonne non polaire. le gaz de transport est l'hydrogène avec un débit de 45 ml / min. la température initiale est de 50 ° c et s'élève à 3 ° c / min puis maintenue isothermiquement à 230 ° c (20min). Volume d'injection: 0,2 µl d'huile pure. l'identification des composants a été effectuée par la comparaison des temps de rétention et de spectre de masse avec les données de la base de données atomiques de l'institut national des normes et de la technologie (nist), de la bibliothèque adams et de la base de données propre au laboratoire de rosier davenne.

#### 4.6 Determination de l'activité antimicrobienne

##### 4.6.1. Mode d'action des HE

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition En générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;



➤ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Burt, 2004).

#### 4.6.2. Préparation des dilutions de l'HE :

On prépare 05 Eppendorfs stérilisés (1/2, 1/4, 1/8, et 1/16) pour notre extrait de l'huile essentielle, *Mentha pulegium L*, le premier Eppendorf représente la dilution (1/2) contient 50 µl du solvant qui est l'éthanol avec 50 µl d'HE. On ajoute dans le deuxième Eppendorf (1/4) avec 50 µl du premier Eppendorf + 50 µl d'éthanol, on agite bien par le Vortex.

On suit le même procédé jusqu'à la dernière dilution.



Figure 08 : dilutions de l'HE (Photo personnel).

#### 4.6.3. Technique de l'Aromatogramme

L'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme. C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (Benkherara et al., 2011). Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle (Kheyar et al., 2014).

##### ) Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 24 heures sur milieu gélose nutritive, une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement de 2 à 3 colonies bactériennes à l'aide d'une écouvillon. Ces colonies ont été mises dans un tube de solution physiologique stérile avec agitation de façon à obtenir une densité optique de 0,5 à 570 nm.

##### ) Préparation des disques

On a coupé le papier buvard en disque de 6mm (0.28cm<sup>2</sup> de surface) par l'emporte-pièce, ces disques doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement. Les disques sont ensuite stérilisés dans un autoclave pendant

20min à 120°C, et stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

### ) **Inoculation et application des disques**

L'inoculation a été réalisée par écouvillonnage et, en procédant comme suit :

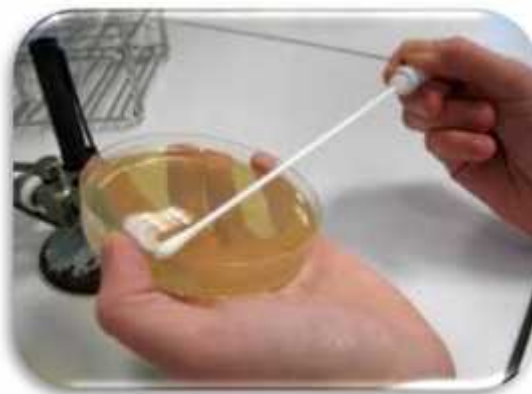
\* La gélose Sabouraud pour la levure et le milieu MH (Mueller Hinton) pour les bactéries, ont été coulés dans des boîtes de pétrie et laissés solidifier.



**Figure 09 :** coulage des milieux dans les boîtes pétries (Photo personnelle).

\* Ensuite, un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne puis légèrement essoré.

\* L'inoculation a été faite à l'aide de cet écouvillon sur la surface de la gélose en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.



**Figure 10 :** Inoculation (Photo personnelle).

\* Dans chaque boîte de pétrie, nous avons déposé les disques de 6 mm imbibés de 10 µl de chaque solution à tester.

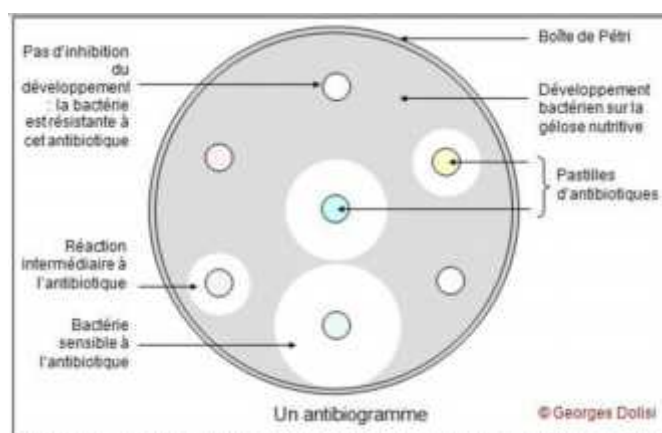


**Figure 11 :** Application des disques (Photo personnel).

### ) Incubation et lecture

\*L'incubation des boîtes a été faite à l'étuve à 37°C durant 24 heures pour les bactéries et 28°C pour la levure. Après l'incubation, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible

\*Le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré avec précision (à l'aide d'un pied à coulisse) pour chaque produit testé.



**Figure12:** Mesure des zones d'inhibitions (Gaborieau., 2015).

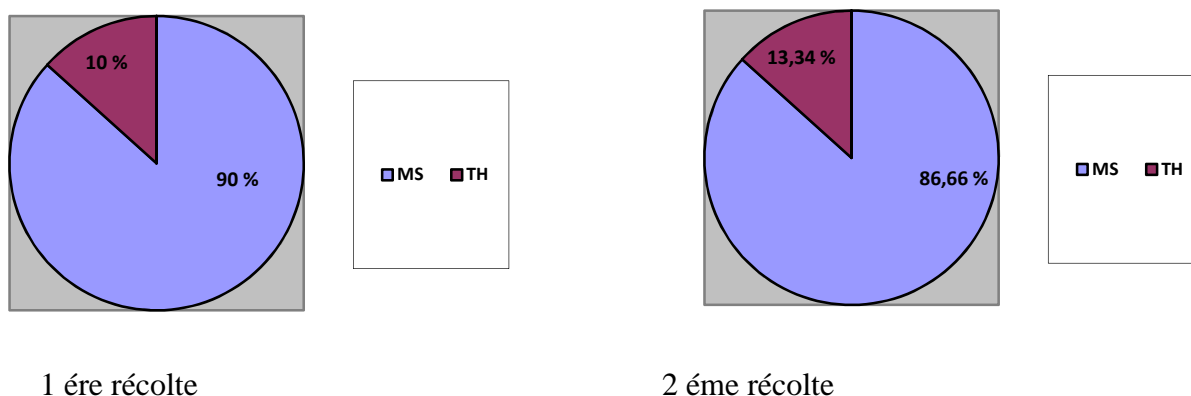
#### 4.6.4. Expressions des résultats

Pour cette méthode, la CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait.

**CHAPITRE III:**  
**RESULTATS**  
**ET DISCUSSION**

### 1. Détermination de la matière sèche

Les plantes sont riches en eau, les analyses de nos échantillons de *Mentha pulegium L.* La 1<sup>ère</sup> récolte présentait un taux de MS de « 90% ». Est-ce dû de quelques facteurs climatiques tel le taux d'humidité relative de l'air diminue (10%) avec une température plus de 34°C (en été). même pour la 2<sup>ème</sup> récolte, la MS est diminuée «86.34% » à cause de la température est diminuée 28°C et le taux d'humidité (%) est augmenté.




**Figure13:** Teneur en MS de *Mentha pulegium L.* de la région de Rouina.

### 1. Caractéristiques organoleptiques

Selon AFNOR (2000), Les critères d'appréciations d'une huile essentielle sont ses propriétés organoleptiques telles que le goût, la couleur, et l'odeur. Ces propriétés ne donnent qu'une information très limitée sur cette 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 en précisant les conditions opératoires des analyses, et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des huiles essentielles les plus courants. Après l'extraction, nous avons déterminé les caractères organoleptiques de notre huile essentielle et comparé avec ceux de norme A F N O R.

## Resultats et discussion

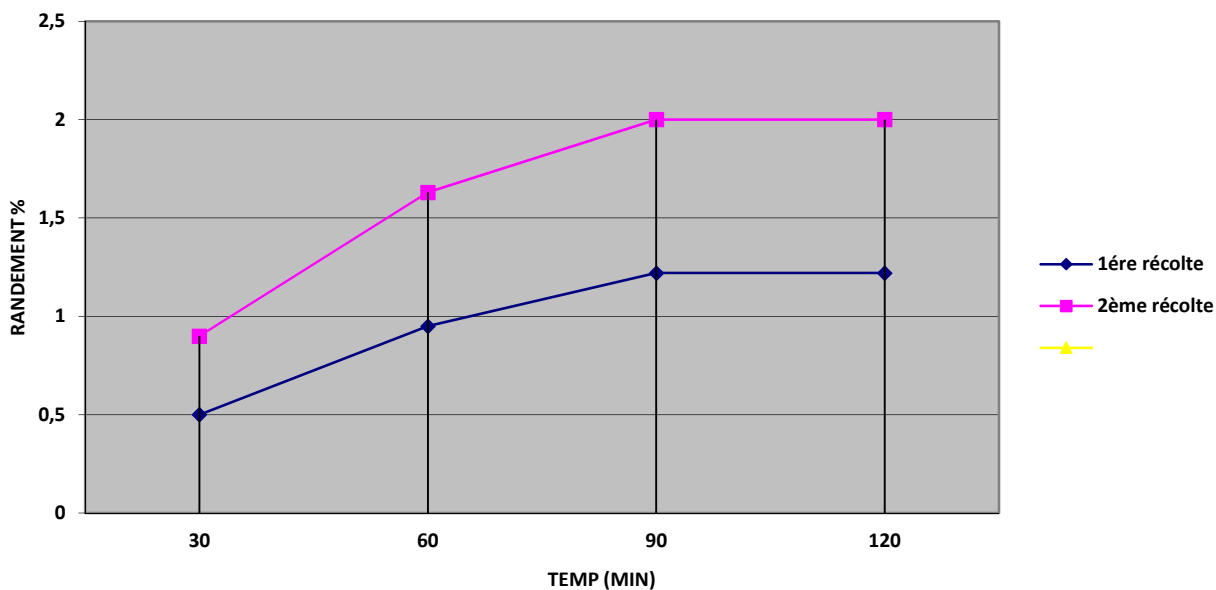
**Tableau 05 :** Caractères organoleptiques de l' huile essentielle

Caractéristiques	Odeur	Couleur	Aspect physique	
<i>Mentha pulegium L</i> Recolté en mai	Forte odeur	Jaune	Liquide	
<i>Mentha pulegium L</i> Recolté en aout	Forte odeur	Jaune	Liquide	
AFNOR	Forte odeur	<b>Jaune</b>	Liquide	

### 2. Résultats de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de *Mentha pulegium l*

**Tableau 06 :** La quantité d'HE extraite chaque 30 min

La durée d'extraction	<i>Mentha pulegium L.</i>	
	1 <sup>er</sup> récolte (ml)	2 <sup>ème</sup> récolte (ml)
<b>0 à 30 min</b>	0,9	0,5
<b>30 à 60 min</b>	0,73	0,45
<b>60 à 90 min</b>	0,37	0.27



**Figure 14 :** Représentation graphique de la cinétique d'extraction de l'HE de *M pulegium L.*

La quantité la plus élevée d'HE de *M pulegium L.* extraite durant la première demi heure cela du à la disposition extérieure des cellules sécrétrices et les poils sécréteurs à la périphérie des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les labiées. (Scimeca et Tetau., 2005). En effet ces structures sécrétrices se rompent rapidement lorsqu'elles exposées à de fortes températures. Les composés volatils sont aussitôt évaporés d'où la courte durée pour atteindre le pic cumulatif de l'extraction (Mosta .,2006). Dans la 2<sup>ème</sup> période (de 30 à 60 min) la quantité des HEs extraites commence à baisse de manière progressive qui varie entre 0,4 ml et 0,5 ml respectivement pour les deux récoltes, dont les cellules sécrétrices secrètent leurs stockage d'huile dans la période de 60 min à 90 min la quantité d'HE diminue peu à peu jusqu'à on n'observe plus d'huile dans le distillat, on peut estimer l'épuisement totale de la matière végétale.

### 3. Rendement d'extraction

Les échantillons de *M pulegium L* ont fourni un rendement en HE qui varie entre 1.8% et 0.54% respectivement pour la première récolte au mois d'Août 2018 qui correspond à la période de pleine florescence de la plante et début floraison. Et la deuxième récolte au mois de Mai 2019.

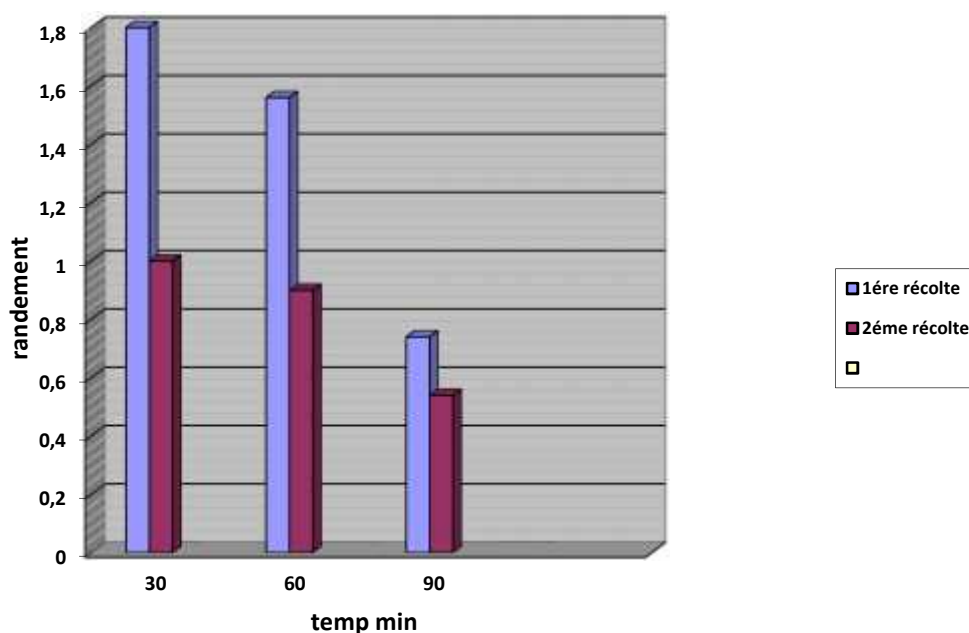
La quantité la plus élevée des HEs de *M pulegium L* extraite durant la 1<sup>h</sup> 30<sup>min</sup> est dû à la disposition extérieure des cellules sécrétrices et les poils sécréteurs à la périphérie des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les labiées (Simeca et Tetau, 2005). En effet, sa

## Resultats et discussion

structure sécrétrice se rampant rapidement lorsqu'elles sont exposées à de fortes températures après l'ébullition. (Tableau).

**Tableau07** : la quantité d'HE extraite chaque 30 min

Temps	Rendement	
	1 <sup>er</sup> récolte	2 <sup>ème</sup> récolte
0-30 min	1,8	1
30-60 min	1.46	0,9
60- 90 min	0.74	0.54



**Figure15** : Représentation graphique de rendement d'extraction de l' HE de *M pulegium l.*

Les rendements moyens en HE ont été calculés par rapport à la matière végétale sèche de la partie aérienne. Les échantillons ont fourni un rendement de 1.8% et 0.54% pour le 1<sup>er</sup> et la 2<sup>ème</sup> récolte respectivement.

**Sivropoulou et al., 1995** ont obtenu une teneur en huile essentielle de *Mentha pulegium* L récoltée dans trois stations en Grèce, de l'ordre de 1,6 à 2% (v/m). Par contre



**Teixeira Duarte et al., 2005**, ont rapporté un rendement supérieur de l'ordre de 1.8%.

#### 4. Caracterisation des huiles essentielles de *M pulegium* L par CPG/SM :

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* L nous a permis d'identifier 20 composés dont les principaux sont : le Pulegone (**71.25 %**), le *Menthone* (**11.97 %**) qui peuvent être rencontrés dans la plus part 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%).

**Tableau 08:** Composition chimiques d'HEde *M pulegium* L.

N°	Nom des composés	Concentration (%)
1	-pinène	0.40 %
2	Camphène	0.01 %
3	Sabinène	0.06 %
4	-pinène	0.29 %
5	<b>Myrcene</b>	<b>1.20 %</b>
6	a.phellarene	0.32 %
7	Carène	0.03 %
8	<b>Limonène</b>	<b>3.56 %</b>
9	gamma-terpinène	0.53 %
10	<i>Linalol</i>	0.02 %
11	<b><i>Menthone</i></b>	<b>11.97 %</b>
12	<i>Bornéol</i>	0.08 %
13	<i>Menthol</i>	0.98 %
14	Alpha.Terpéneol	0.12 %
15	<b>Pulegone</b>	<b>71.25 %</b>
16	Piperitone	0.15 %
17	Thymol	0.45 %
18	Carvone	0.90 %
19	Eugenol	0.03 %
20	B.Caryophellene	0.74 %

#### 5. Activite antimicrobienne des huiles essentielles de *M pulegium* L

Pour l'évaluation in vitro du pouvoir antimicrobien, antifongiques de notre Huile Essentielle, nous avons utilisé dans notre expérience quatre souches bactériennes (Gram+ et Gram-) et une levure. Le pouvoir antimicrobien a été obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions (D) en mm. L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al , (2009)**, qui ont classé les zones d'inhibitions de la croissance en 5 classes, à savoir :

## Resultats et discussion

- ) D 30mm : Très fortement inhibitrice.
- ) 21mm D 29mm : Fortement inhibitrice.
- ) 16mm D 20mm : Modérément inhibitrice.
- ) 11mm D 16mm : Légèrement inhibitrice.
- ) D<10mm : Non inhibitrice.

**Tableau 09:** Diamètre des zones d'inhibitions en mm en fonction des dilutions de l'huile essentielle.

Dilutions	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
1					
1/2	16	18.5	0	12.89	21.5
1/4	0	15	0	12.72	14.5
1/8	0	0	0	11.6	13
1/16	0	0	0	9.7	12
HE	18.8	19	0	13.58	24.6
Ethanol	0	0	0	0	0
Classe	<b>Modérément inhibitrice</b>	<b>Modérément inhibitrice</b>	<b>Non inhibitrice</b>	<b>Légèrement inhibitrice</b>	<b>Fortement inhibitrice</b>

) Nous avons trouvé que H.E pure a un diamètre d'inhibition vis-à-vis aux souches microbiennes compris entre 12.89 et 21.5mm ; cela explique que les souches sont ex-trainement sensibles aux extrait pure de la plante entière, sauf, pour *Pseudomonas aeruginosa* où nous ne signalons aucun diamètre d'inhibition, révélant ainsi une activité antimicrobienne importante.

Egalement, l'utilisation de l'éthanol à l'état pur ne révèle aucun diamètre d'inhibition.

) Pour les différentes dilutions, nous avons remarqué que les différentes souches bactériennes sur lesquelles nous avons appliquées les huiles essentielles, présentent des résistances différentes en fonction des concentrations utilisées. En effet, *Escherichia coli* présente une sensibilité que vis-à-vis de la concentration [1/2], *Staphylococcus aureus* pour les concentrations [1/2] et [1/4], *klebsiella pneumoniae* quant elle présente une sensibilité vis-à-vis de toutes les concentrations alors que *Pseudomonas aeruginosa* monass n'en aucune.

## Resultats et discussion

Concernant la levure, cette dernière présente une importante sensibilité vis-à-vis de toutes les concentration.



\*Effet des HES de *M pulegium* Lsur la croissance de *E coli*.



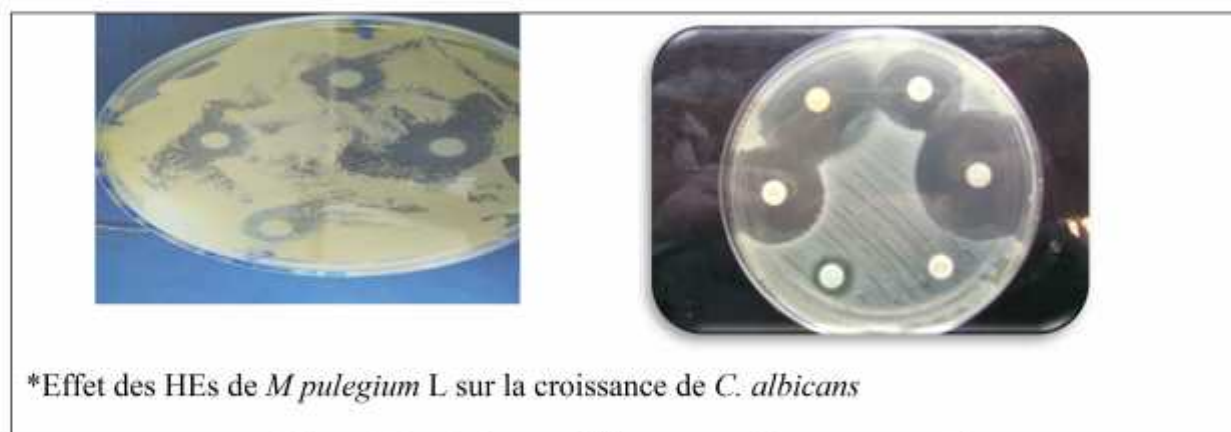
\*Effet des HES de *M pulegium* Lsur la croissance de *S aureus*.



\*Effet des HES de *M pulegium* Lsur la croissance de *k pneumonia*.



\*Effet des HES de *M pulegium* Lsur la croissance de *P. aeruginosa*.



**Figure16** : résultats antibiogramme (Photo personnel).

Nos résultats, notamment ceux relatifs aux souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et la levure coroborent avec des travaux réalisés par **Pibiri (2006)** et **Lahrech (2010)**. Ainsi, nous évquons ce qui suit :

- *Pseudomonas aeruginosa* semble être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens, des études réalisées par (**Pibiri ,2006**), indique que L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha pulegium.L* est totalement nulle contre la souche *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Escherichia coli* s'avère être sensible au pouvoir antimicrobien que présente les huiles essentielles de *Mentha pulegium L*. Le diamètre d'inhibition enregistré était de 17 mm. Par contre la souche d'*E. coli* étudié par **Lahrech en 2010**
- Les résultats montrent que les huiles essentielles de *Mentha pulegium L* ont été beaucoup plus actives contre *Candida albicans* avec des diamètres de 26mm **Lahrech en 2010** a également constaté une forte sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis les huiles essentielles de *Mentha pulegium L* avec un diamètre d'inhibition de 25mm.

\*Selon **Friedman et al. (2002)**, les principaux facteurs peuvent influencer les résultats d'un test de l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle sont:

- La composition et la solubilité de l'huile essentielle.
- Le microorganisme et la vitesse de sa croissance.

Ces différences de sensibilité des microorganismes contre l'huile essentielle peuvent être expliquées par la quantité et la qualité des molécules bioactives ou la nature et la composition de la paroi cellulaire ainsi que la puissance du système enzymatique de la cellule qui contrôle son métabolisme.

\*Selon (**chang et al., 2001**) , le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composées majoritaires.
- Concentration des ces composés.
- Nature et structure des groupements fonctionnels
- L'interaction probable entre les différents constituants

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (El amri et al., 2014), en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides, provoquant ainsi la mort de la bactérie (Fernandez et Chemat, 2012).

### 5.1. Dilutions Minimales Inhibitrices (DMI) :

A la lumière des résultats précédents, nous avons déterminé la dilution minimale inhibitrice de chaque souche. Les résultats des dilutions minimales inhibitrices obtenus sont représentés par le (tableau 09)

Les DMI ont été déterminées à partir d'une gamme de dilution de l'huile essentielle et évaluées après 24 h d'incubation pour les bactéries et 48 h pour la levure

**Tableau 10 :** Diamètres des zones d'inhibition en fonction des Dilutions minimales inhibitrices.

Microorganisme	DMI	Zone d'inhibition (mm)
<i>E coli</i>	1/2	16
<i>S aureus</i>	1/4	15
<i>K pneumonie</i>	1 /16	9.7
<i>C albicans</i>	1/16	12

Les dilutions minimales inhibitrices obtenues de l'HE de *M pulegium L* varient de 0,0625 à 0,5 µL/µL .

*C. albicans* s'est montrée la plus sensible pour l'HE de *M pulegium L*, Microorganisme sauf pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* qui reste toujours une souche résistante

## Resultats et discussion

---

Nous permettent de constater que l'activité antibactérienne est fonction de la bactérie, ce qui confirme que le type de microorganismes est un paramètre important déterminant l'activité antibactérienne (**Bouguerra, 2012**).

## Conclusion

---

### Conclusion

L'expérimentation entreprise, rappelons-le, avait comme objectif la valorisation des huiles essentielles de certaines plantes appartenant à la famille de Lamiaceae, poussant spontanément dans la région de Rouina, en l'occurrence *Mentha pulegium L* (Nom vernaculaire : Fliou).

Les plantes ont été récoltées durant le mois d'Août 2018 où la floraison bas son plein et le mois de Mai 2019.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation et a conduit à des rendements égaux à 1,8% et 0,5% pour le mois d'Août 2018 et Mai 2019 respectivement.

L'analyse chromatographique a révélé la présence de 20 composés dont 04 principaux le Pulegone (71.25 %), le Menthone (11.97 %), limonène (3.56 %), Myrcene (1.20 %) et Menthol (0.98%) donc, nous pouvons dire que notre huile est à chémotype Pulegone.

Les huiles essentielles ont été testées sur l'activité de certaines souches de bactéries notamment, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae* et sur une levure en l'occurrence *Candida albicans*.

Les dilutions des huiles ont été préparées selon les concentrations suivantes à savoir : [1/2], [1/4], [1/8] et [1/16]. Ces concentrations nous indiquent des zones d'inhibition une fois en contact avec les différentes souches bactériennes et la levure. Les résultats ont montré ce qui suit :

- ) Une sensibilité modérément inhibitrice qui regroupe *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- ) Une sensibilité légèrement inhibitrice qui regroupe *klebsiella pneumoniae*.
- ) Une absence absolue de sensibilité pour *Pseudomonas aeruginosa*.
- ) Une sensibilité fortement inhibitrice pour la *Candida albicans*.
- ) Les résultats obtenus ont montré l'effet de blocage de certaines huiles de *Mantha Pulegium* sur le développement et la prolifération de certaines bactéries et levures, ce qui pourrait contribuer sensiblement à la substitution de certains conservateurs et additifs notamment dans les domaines de l'industrie agro-alimentaire, la cosmétologie et la pharmacologie.

## Références Bibliographie

### A

**AFNOR (2000).** Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6<sup>ième</sup> édition. AFNOR, Paris.

**AFNOR (Association française de normalisation) (1986).** Recueil des normes françaises sur les corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés. 4<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc, Lavoisier. Paris la Défense.

**AFNOR (Association Française de Normalisation). 2000.** Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. Monographies relatives aux huiles essentielles. Paris.

**Akrout, A et Arides, R., 2014.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie), (June).

antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science Emerging*. 22: 221-229.

**Anton R. and Lobstein A. (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. *Tec. &Doc.*, Paris, 522p.

### B

**Baba Aïssa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb. Ed. *Librairie Moderne-Rouiba*, pp 46 —47 - 194 - 195 —231.

**Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008).** Review MI-Biological effects of essentielles oils-A review food and chemical toxicology, vol. 46; pp 446-475

**Bakkali.F.,Averbeck S., Averbeck D., et Idaomar M. (2007).** Biological effects of essential oils. A reviw. *Food and Chemical Toxicology .Volume 46, Issue 2*, Pages 446-475

**Bardeau F. :** Les huiles essentielles Propriété et utilisation de l’aromathérapie.

**Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., Karadogan T. (2004).** Antimicrobial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control ;15:169–172*

**Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F. et Abdelouahid, D. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie. 6 :* 153-159.

**Benini C. (2007).** Contribution à l’étude de la diversification de la production des huiles essentielles aux Comores. Mémoire d’ingénieur. Université Gembloux, pp109.

**Benkherara, S., Bordjiba, O., & Djahra, A. B. (2011).** « Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugé officinalis: *Salvia officinalis* L.Sur quelques entérobactéries pathogènes. *Revue Synthèse, 72(23)* ».



**Bernard. (2010).** [Thymus vulgaris, histologie](#). Forum le naturaliste. De la loupe au microscope

**Berube-Gagnon J.** 2006. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de l'université de Québec.

**Besombes C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.

**Bisignano, G. (2005).** « Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(6), 2474-2478 ».

**Botineau, M. (2010).** « Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec & doc ».

**Bouguerra A., Himed L. et Barkat M (Mai 2012):** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite d'écorces de *Citrus reticulata*.

**Bourrel C, Dargent R, Vilrem G, Gaset A. (1995)** Analyse chimique et propriétés fongistatiques de quelques huiles essentielles en milieu liquide. Effet sur la morphogénèse hyphale. *Rivista italiana*, 17, 31-42.

**Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 916.

**Bruneton J. (1999)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120.

**Bruneton J. (2008).** Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> Ed, Paris, Tec & Doc – Edition médicales internationales. 1188p.

**Bruneton J. (2009)** Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 916.

**Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Ed : Tec & Doc, Lavoisier, 4<sup>ème</sup> édition, Paris, 1269p.

**Bruneton, J. (1999).** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Technique et documentation (éd. 2<sup>ème</sup>). Paris: Lavoisier ».

**Buchbauer G. (2010)** Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Edition of Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, 235-280.

**Burt S. (2004)** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

## C

**Carette AS. (2000).** La lavande et son huile essentielle. *In* Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de doctorat*. Université de La Rochelle, 289p.

**Chalchat JC, Garry RP, Michet A, Benjlali B, Chabat JL. (2000)** Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain and France). *Journal of Essential Oil Research*, 5, 613-618.

**Chemat F. (2004)** Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311.

**Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G and Visinoni F. (2006).** Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta* 555, 157–160.

**Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Bartels P.V., et Chemat F. (2004).** Comparison Of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 19, pp : 188 – 195.

**Cherrat L., Espina L., Bakkoli M., Pagan R., et Laglaoui A. 2014.** Chemical composition.

**Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. (2000)** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal Applied Microbiology*, 88, 170-175.

## D

**Derwich E., Benziane Z and Boukir A. (2010).** Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *Int. J. Agric. Biol.* 12 (2), 199–204.

**DPAT (Direction de la planification et de l'aménagement du territoire):** Monographie de la Wilaya de Ain-Defla année 2010. Edition : Lanore (Paris), 1978, pp : 40-43, pp : 199-201.

**El-Ghorab AH, Shaaban HA, El-massry KF, Shibamoto T. (2006)** Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of Juniper berry (*Juniperus drupacea* L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5021-5025.

## F

**Faleiro M, Miguel M.G, Ladeiro F, Venancio F, Travares R, Brito J.C ET Perdo L.G., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 35-40

**Fantino NS. (1990).** Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle. p :41-45.

**Farah A, Bouayoun T, Ghanmi M, El Bouri A, Bourkhiss B, Houari A, Satrani B. (2010)** Chemical constituents of essential oils of wood and wood veneers of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13, 420-425.

Farjon A. (1998) World Checklist and Bibliography of Conifers. In: Royal Botanic Gardens Press, Kew, London, 55-83.

**Fellah S, Ramadhan M, Abderraba M., (2006).**Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*.L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie - Journal de la Société Algérienne de Chimie J. Soc. Alger. Chin.; Vol. 16; N°2; pp 193-202

**Ferhat MA, Meklati BY, Chemat F. (2007)** Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing: hydrodistillation and microwave dry distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 494-504.

**Figuredo, G. (2007, Février).** « Etude et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issue de graines d'origine méditerranéenne. (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II) ».

**Foda M I., El-Sayed M A., Hassan A A., Rasmy N M and El-Moghazy M M .(2010).** Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science*; 6 (5) : pp. 272-280.

## G

**Gaborieau B. (2015)** Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de la Vienne.Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Poitiers, juin 2015, p : 37

**Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M B., Taghizadeh M., Astaneh S A And Rasooli I .(2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.

**Garneau FX. (2004).** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 1-16.

**Garnéro J. (1991).** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. *Encyclopédie des médecines naturelles*, Paris, France, pp. 2-20.

**Ghasemi P A., Rahimi E and Moosavi S A .(2010).** Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta agriculturae Slovenica*, 95-3, pp.219-223.

Gill AO, Holley RA. (2006) Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 170-174.

**Gill AO, Holley RA. (2006)** Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 170-174.

**Gilles M. (2012)** .Blocage de ponte et sélection. *La Santé de l'Abeille*. 248 ;149-154.

Goetz P, Ghedira K. (2012) *Phytothérapie anti-infectueuse*. Edition Springer-Verlage, Paris, France, 382.

**Gomes A. V. da C., Vieira F da S., Crespi M. P. A. L. de., Coll J. F C. and Pessoa M. F. (2004).** Performance and carcass characteristics of rabbits under different particle size of sugar cane bagasse as fibre source. *Veterinaria Noticias*, 10 (1): 87-92

**Gomes P B, Mata V G, Rodrigues A E., 2004.** «Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res.* 16 (2004) 490–495.

## H

**Hadizadeh I., Peivastegan B and Hamzehzarghani H. (2009).** Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences* 6 (5): pp. 857-861.

**Hart PH, Brand C, Carson CF, Riley TV, Prager RH, Finlay-Jones JJ. (2000)** Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49, 619-626.

**Hazzit M. and Baaliouamer A. (2006).** Composition of essential oils of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. and *Thymus numidicus* Poiret from Algeria. *Rivista Italiana EPPOS*, 43, 11–18

**Hengi SS, Huang CG, Chen WJ, Kuo Yh, Chang ST., 2008.** Larvicidal activity of tectoquinone isolated from red heartwood-type *Cryptomeria japonica* against two mosquito species. *Bioresour Technol* 99: 3617 –3622.

**Hmamouchi M. (2001)** Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie. Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), 389.

**Hudaib M, Speroni E, Pietra A M D, Carvin V., 2002.** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and varia.

## K

**Kansole M.M.R (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Lauca martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire d'Etudes Approfondies en Sciences Biologiques Appliquées. Université de Ouagadougou. 54 p.

**Khaled khoudja N., Boulekbache- Makhoul L., et Madani K. 2014.** Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*. 52: 177–182.

## L

**Lahlou M. (2004)** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.

**Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. (2001)** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiol*, 91, 453-462.

**Lis-Balchin M. (2002).** Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London. p: 37, 40, 50, 155-200.

**Lucchesi ME. (2005)** « Extraction sans solvant assistée par microondes: Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ». Thèse de Doctorat en sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, juillet 2005. p 17 ; 23, 52.

## M

**Marie-Elisabeth Lucchesi. (2005).** Extraction Sans Solvant Assistée par Microondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Autre. These doctorat .147p. Université de la Réunion

**MAHBOUBI M. and HAGHI G., (2008),** Antimicrobial activity and chemical composition of *L.* essential oil, ., 119, 325-327

**Mohammadi A., Ahmadzadeh Sani T., Ameri AA., Imani M., Golmakani E and Kamali H .(2016).** Seasonal variation in the chemical composition, antioxidant activity, and total phenolic content of *Artemisia absinthium* essential oils. *Pharmacogn Res.* 7:329–34.

**Mosta N.M., (2006).** Essential oil yield and composition of rose scented geranium (*Pelargonium* sp) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age. Thesis of doctorat MSC Agronomy, faculty of natural and agricultural sciences, university of Pretoria, South Africa, October 2006.

## N

**Naghdi Badi H., Yazdani D., Mohammad Ali S. and Nazari F. (2004).** Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 19: 231–236.

**Nakamura CV, Ishida K, Faccin LC, Filho BD, Cortez DG, Rozental S, Souza WD., (2004)** In vitro activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L., against four *Candida* species. *Research in Microbiology*, 155, 579-586.

## O

**Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Gabriel J, Piette P, Begin A. (1997)** Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oil against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155-162.

## P

**Perry N. B., Anderson R. E., Brennan N. J., Douglas M. H., Heaney A. J., Mc Gimpsey J. A. and Smallfield B. M. (1999).** Essential Oils from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.) : Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons, and Sites. *Journal Agric. Food Chem.* 47 (5), 2048–2054.

**Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat. Polytechnique fédérale de Lausanne

**Porter N. (2001).** - Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39. Projet de classe d'agents pathogènes des plantes du sol,

## Q

**Quézel P. and Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

## R

**Rao S. G., Bachhawat AK., Gupta C.M. (2002).** Two-hybrid-based analysis of protein-protein interactions of the yeast multidrug resistance protein, Pdr5p. *Funct Integr Genomics* 1(6):357-66

**Rao, S. V. R., Sunder, G. S., Panda, A. K. ; Reddy, M. R. ; Raju, M. V. L. N. ; Praharaj, N. K. (2002).** Utilization of different millets replacing maize in coloured broiler chicken diet. *Indian J. Anim. Nutr.*, 19 (4): 353-358

**Rasooli I, Owlia P. (2005)** Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1): 1-6  
**Teixeira Duarte MC, Mara Figueira G, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. (2005)** Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97 (9), 305-311.

**Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bateau I., Blanchard P., Gil-Munoz M.I., et Barberan F.T. 2004.** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*. 40: 395-408.

**Rodolfo-Metalpa R., Richard C., Alleman, D., Bianchi C. N., Morri C. and Ferrier-Pagès C. (2006).** Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica* to elevated temperatures. *Mar. Biol.* 150,45 -55.

**Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJD. (2000)** Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica*, 66, 687-693.

## S

**Saidj F. (2006).** Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus* kabylica- Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Université Boumerdes, Algérie.

**Scimeca D et Tétou M (2005).** Votre santé par les huiles essentielles, Guide pratique pour prévenir et guérir tout les maux quotidien, ed. Alpen, p. 12, 13. Selmi S., ET Sadok, S. (2008) The Effect Of Natural Antioxidant (*Thymus Vulgaris* Linnaeus) On Flesh Quality Of Tuna (*Thunnus* Linnaeus) during Chilled Storage .*pan-American Journal Of Aquatic*, 3(1).pp:36-45.

**Scimeca D et Tétou M (2005).** Votre santé par les huiles essentielles, Guide pratique pour prévenir et guérir tout les maux quotidien, ed. Alpen, p. 12, 13. Selmi S., ET Sadok, S. (2008) The Effect Of Natural Antioxidant On Flesh Quality Of Tuna (*Thunnus Linnaeus*) during Chilled Storage .pan-American Journal Of Aquatic, 3(1).pp:36-45.

**Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. (1998)** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Food Microbiology, 26, 118-122.

**Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. (2001)** The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology, 18, 463-470.

Société Algérienne de Nutrition, p :35.

**Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A. and Sousa L.A. (2006).** Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, Vol.8, pp.193- 198.

#### T

**Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Nuno R, Nogueira NMF, Saraivab J A and Nunesa M L.(2013).**Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. [wileyonlinelibrary.com/jsfa](http://wileyonlinelibrary.com/jsfa) c\_ 2013 Society of Chemical Industry *J Sci Food Agric* p1-8  
Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., & .

#### U

**Udomsilp J., Piyo A J., Khang-Khun P. and Thobunluepop P. (2009).**Antifungal properties of essential oils from Thai medical plants against rice pathogenic fungi. *As. J. Food Ag-Ind.* 2009, Special Issue, S24-S30

**Ultee A, Slump RA, Steging G, Smid EJ. (2000)** Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. Journal of Food Protection, 63 (5), 620-624.

#### W

**Walsh SE, Maillard JY, Russell AD, Catrenich CE, Charbonneau DL, Bartolo RG. (2003)** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Applied Microbiology, 94, 240-247.

**Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. (2005)** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76, 233-236.

**Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S. (2005)** Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76, 233-236.

**Wong M Y. 2003.:** *Fusariumoxysporum* f. sp. *Lycopersici*.

## Z

**Zeghad N. (2009).** Etude de contenu polynolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*thymus vulgaris*, *Rosamariuns officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Université Mentouri Constantine

**Zhiri A. 2006:** Science, Nutrition, Prévention et Sante Éditeur : Fondation pour le libre choix, , pp :9-10.

**Zouari N., Ayadi I., Fakhfakh N., Rebai A, and Zouari S. (2012).** Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut., a North African endemic Species. *Lipids in Health and Disease*, 11, 28 – 39.



# ANNEXES

---

## ANNEXES : 01

### Composition des milieux de culture

#### Milieu de culture Mueller Hinton : pH=7.3

Extrait de viande .....	03g
Hydrolysate acide de caseine.....	17.5g
Amidon.....	1.5g
Agar.....	16g
Eau distillee.....	1000ml

#### Milieu de culture Sabouraud : pH= 5.6± 0.1

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillee.....	1000ml

## ANNEXES

### ANNEXE : 02

Tableau 1: Liste d'appareillages et de verrerie utilisés dans notre étude expérimentale.

Appareils	Verreries	Produits utilisés
Autoclave	Ballon 500ml	Eau distillée
Bain marie	Béchers	Ethanol
Balance de précision	Boîtes de pétri	Eau physiologique
Chauffe ballon	Disques	
Etuve	Ecouvillons	
Four Pasteur	Anse de platine	
Hydrodistillateur	Emporte-pièce	
de type Clevenger	Epindorffs	
Réfrigérateur	Flacon en verre	
Vortex	Gants	
	Micropipette	
	Papier aluminium	
	papier buvard	
	Pince	
	Pipettes pasteur	
	seringues	
	Tubes à essai	
	Verres de montre	

### ANNEXE : 03

#### 1. Activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant toute substance, à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, pouvant retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Beirão et Bernardo-Gil, 2006 ; Alais et al., 2008 ; Rashid et al., 2010**). Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant **Jeantet et al. (2006)**. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

Plusieurs auteurs rapportent que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que certains antioxydants synthétiques (**Pamphile et al., 2009 ; Dongmo et al., 2010 ; Hussain et al., 2010 ; Dashti et al., 2015**). Les effets antioxydants des huiles essentielles et des extraits des plantes sont dus principalement à la présence de groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (**Hussain, 2009 ; Pamphile et al., 2009 ; Dongmo et al., 2010**).

#### 2. Activité insecticide

L'efficacité des huiles essentielles en tant qu'insecticides est la préoccupation de nombreux chercheurs (**Rajgovind, 2016 ; Song, 2016**). Les travaux effectués concourent à mettre en évidence les différents éléments pouvant accroître l'action des huiles essentielles sur les ravageurs. Ces études constituent une étape indispensable pour le développement de l'utilisation des huiles essentielles dans la lutte contre les ravageurs de grains. Pour ces auteurs, les huiles essentielles sont des substances fumigènes dotées de réelles potentialités insecticides à valoriser.

Dans le domaine agro-phytosanitaire, plusieurs travaux ont fait référence à l'utilisation des huiles essentielles pour la protection des cultures contre les ravageurs des cultures et en particulier contre les ravageurs des denrées stockées (**Ngamo et Hance, 2007**).

#### 3. Activité larvicide

Les femelles de nombreuses espèces de moustiques se nourrissent de sang de vertébrés vivants. En se nourrissant de sang, certains d'entre elles transmettent des maladies

## ANNEXES

---

extrêmement nuisibles, telles que la fièvre jaune, la Blue tangué, la fièvre aphteuse (**Heng, 2008**). Les larves de moustiques et de chrysalides sont actuellement contrôlées par l'utilisation d'insecticides chimiques de synthèse , Leur utilisation répétée a perturbé les systèmes de contrôle biologique naturelle, résultant parfois au développement généralisé de résistance ainsi que des effets indésirables sur les organismes non cibles, les résidus toxiques dans les aliments, la sécurité des travailleurs, et le coût élevé de l'approvisionnement (**Sman, 2006 ;Murugan et al., 2014**). Ces problèmes ont justifié la nécessité de développer des stratégies alternatives à l'aide de produits écologiques. De ce point de vue, des pesticides d'origine végétale, notamment les huiles essentielles, sont prometteurs car ils sont efficaces, sans effet négatif sur l'environnement et facilement biodégradables et souvent peu onéreuses.

## Annexe :04

### Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

#### 1. Définition :

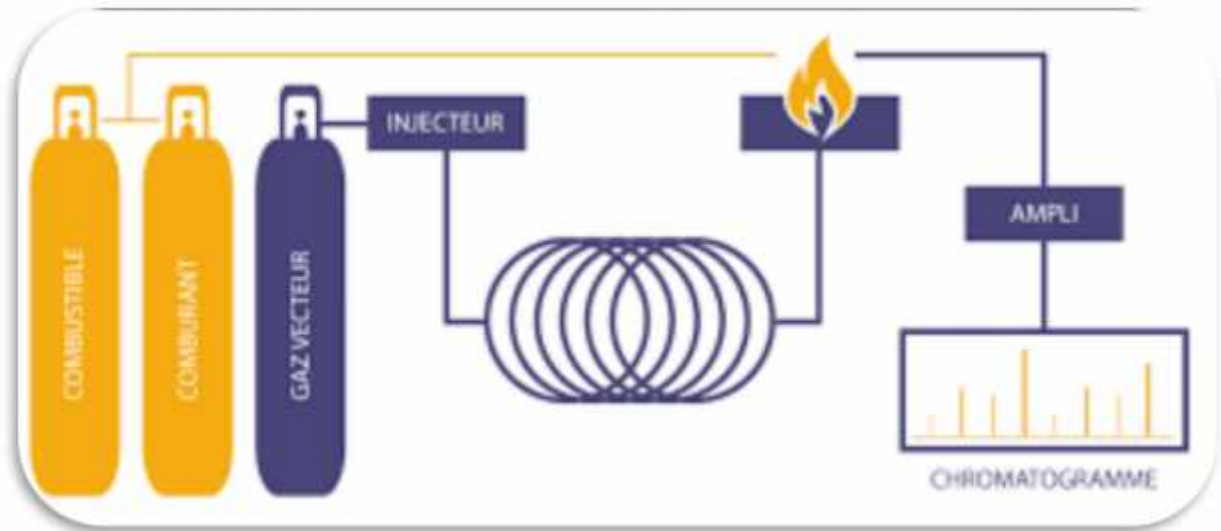
La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie (**Rouessac .F et al ; 2004**).

#### 2. Le principe de la séparation par C.P.G :

Consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile qui s'écoule à travers l'ensemble stationnaire (**Marchal. R et al ; 1998**). Introduction de l'échantillon est effectuée, on Une très petite quantité d'échantillon en solution (ex. 0,5  $\mu\text{L}$ ), est introduite dans l'appareil avec une micro-seringue (voir Annexe) dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes (**Rouessac.F et al ;2004**).

## ANNEXES

---



## ANNEXES

### Annexe : 05

Espèce microbienne	Caractéristiques	Maladies provoquées	Référence	Provenance
Escherichia coli	Bacille, mobile, Gram-, pathogène.	Diarrhée, infection urinaire, méningite.	(Avril et al.,1992 ; Donnenberg, 2002)	Laboratoire de microbiologie du laboratoire médicale privé d'Ain Defla:
Staphylococcus aureus	coques, immobile, Gram+.	Infection cutanées, toxiinfection alimentaire. infection nosocomiales		
pseudomonasaeruginosa	Bacilles, Gram-, mobile, pathogène	Les infections (nosocomiale, pulmonaires, urinaire)	(Richard et Kiredjan,1995)	
K				
Candida albicans.	Champignon (levure unicellulaire, hétérotrophe	Candidose	(Assous et al.,1999 ;Beddou,2015)	