

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة جيلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master
Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Extraction et Activité biologique des huiles essentielles de la menthe à feuilles rondes

Devant le jury constitué de:

Melle LAISSAOUI A., MCB à UDBKM Présidente
Melle LATTAB A., MAB à UDBKM, Examinatrice
Mr BRADA M., Professeur à UDBKM, Encadreur

Présenté par :

TOUMI Sabiha
SAHNOUN Amina

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à remercier Allah El Karim Le Tout Puissant pour nous avoir donné la force et la patience.

Nous tenons à exprimer nos infinis remerciements à notre promoteur Mr BRADA Moussa pour son encadrement, son aide précieuse et surtout pour tous ses conseils et ses remarques qui nous ont permis de réaliser ce modeste travail.

Nos remerciements vont aussi à :

Melle LAISSAOUI A., MCB à UDBKM Présidente du jury et Melle LATTAB W., MAB à UDBKM, Examinatrice. Elles nous ont honoré à juger ce travail.

Tous nos enseignants particulièrement ceux de la spécialité Microbiologie appliquée pour leurs conseils précieux.

Nous remercions également tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

Pour toute la promotion 2019 /2020

Sabiha et Amina

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes très chers parents pour leurs innombrables sacrifices

*A mes chers frères et soeurs, en reconnaissance de leur affection toujours
constante*

A tous mes proches

A tous mes ami(e)s et tous ceux qui me sont chers

Sabiha

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents, sources constantes d'encouragement, de soutien et d'affection

A mes très chères sœurs

A mes chers frères

A tous mes proches

A toutes mes amies et tous ceux qui me sont chères

Amina

Table de matière

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	01

Partie théorique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I - La matière végétale: <i>Mentha rotundifolia</i>	02
I -1 Généralités.....	02
I -2 Les différentes espèces de Menthe en Algérie.....	03
I -2-1 Origine et répartition géographique (habitat).....	03
I -2-2 Classification botanique.....	03
I -2-3 Description botanique.....	04
I -3 Propriétés et domaine d'application.....	04
I -4 Toxicologie.....	05
I -5 Les huiles essentielles.....	05
I -5-1 Définition.....	05
I -5-2 Localisation et répartition des huiles essentielles.....	05
I -5-3 Composition chimique de l'huile essentielle.....	05
I -5-3-1 Composition terpénique.....	06
I -5-3-2 Composition aromatique.....	06
I -5-4 Le rôle des huiles essentielles dans la plante.....	06
I -5-5 Les facteurs influençant la composition d'huile essentielle.....	06
I -5-6 La toxicité des huiles essentielles.....	07
I -5-7 Emploi des huiles essentielles.....	08

I -6 Activité biologique des huiles essentielles.....	08
I -6-1 Activité antimicrobienne.....	08
I -6-2 Activité antibactérienne.....	08
I -6-3 Activité antivirale.....	08
I -6-4 Activité Antiseptique.....	08
I -6-5 Activité Antifongique.....	08
I -6-6 Activité anti-inflammatoires.....	08
I -6-7 Activité antioxydante.....	09
I -7 Procédé d'extraction des huiles essentielles.....	12
I -7-1 Hydrodistillation.....	12
I -7-2 L'entraînement à la vapeur.....	12
II - Travaux antérieurs.....	13

Partie expérimentale

Chapitre 2: Matériel et Méthodes

I - Lieu d'expérimentation.....	18
II - Zone d'études et période de récolte.....	18
III - Matériel.....	19
III-1 Matériel végétal.....	19
III-2 Matériel biologique.....	19
IV- Méthodes.....	19
IV-1 Séchage des plantes.....	19
IV-2 Extraction des huiles essentielles.....	19
IV-2-1 Principe d'extraction des huiles essentielles.....	19
IV-2-2 Détermination du rendement d'extraction.....	21
V - Composition chimique des huile essentielle de Mentha rotundifolia.....	21

V-1 Protocole expérimental.....	21
VI- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite.....	21
VI-1 La méthode de diffusion sur milieu solide	21
VI-2 La méthode de dilutions (micro-dilution).....	25
VII- Activité antioxydante de l'huile essentielle extraite.....	26
VII-1 Test de DPPH (essai de piégage antioxydant).....	26
VII-2 La méthode du DPPH.....	26
VII-3 Paramètre IC50.....	27

Chapitre 3: Résultats et discussions

Conclusion.....	29
------------------------	-----------

Références

Liste des Tableaux

Tableau I : Les différentes espèces de Menthe d'Algérie.....	03
Tableau II : Activité biologique de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	14
Tableau III : Situation géographique du site de récolte.....	18
Tableau IV : La récolte de <i>Mentha rotundifolia</i>	28
Tableau V : Zones d'inhibition.....	24

Listes des Figures

Figure 1 : <i>Mentha rotundifolia</i> (la menthe à feuilles rondes).....	04
Figure 2 : L'hydrodistillation.....	12
Figure 3 : Principe de la distillation par entrainement à vapeur d'eau.....	13
Figure 4 : Les Différentes parties de plante destinées à l'extraction.....	19
Figure 5 : Principe de la technique d'hydro-distillation.....	20
Figure 6 : Zone d'inhibition.....	22
Figure 7 : Préparation des dilutions.....	23
Figure 8 : Zone d'inhibition.....	24
Figure 9 : Structure du radical DPPH après et avant réaction.....	26

Résumé

Cette étude a pour objectif l'étude et l'analyse des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* récoltée dans la région de Bourached (W. Ain Defla) et l'étude de leur activité biologique. Selon la littérature, les huiles essentielles de *M. rotundifolia* obtenues par hydrodistillation, à l'échelle semi pilote (rendement : 0,8%), sont analysées par GC-MS et GC-FID. Les résultats obtenus montrent l'existence de deux chémotypes. Le premier contient l'oxyde de pipéritone (19,7–31,4 %) et l'oxyde de pipériténone (27,8–29,4 %) comme constituants majoritaires tandis que le second révèle une teneur très élevée en pipériténone (54,9%) et en oxyde de pipériténone (17,6%). Les activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* ont été étudiées. La sensibilité des bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), des champignons (*Trametes pini*, *Aspergillus niger*, *Penicillium parasiticus*) et des insectes des céréales stockées (*Rhyzopertha dominica* et *Sitophilus oryzae*) vis-à-vis de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été étudiée à différentes concentrations. A une concentration de 1/1000VN, l'huile essentielle a inhibé toutes les bactéries et tous les champignons, alors que pour les insectes des céréales stockées, elle a pu détruire la totalité des insectes à une concentration de $6,5 \cdot 10^{-2}$ ml/cm³. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *M. rotundifolia* a été étudiée par le test du DPPH et elle est exprimée par le pourcentage d'inhibition et l'IC₅₀ du radical DPPH. L'activité comparable à celle du témoin positif (le BHT) qui est inhibé avec $98.73 \pm 1.3\%$, alors que pour les huiles essentielles, une faible inhibition ($15.93 \pm 2.2 \%$) est obtenue.

Mots clés : Extraction, huile essentielle, *Mentha rotundifolia*, GC/MS, activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة و تحليل الزيوت العطرية *Mentha rotundifolia* التي تم جمعها من منطقة بوراشد (ولاية عين الدفلى) و دراسة نشاطها البيولوجي , يتم تحليل الزيوت الأساسية من *Mentha rotundifolia* التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير المائي، على مقياس شبه تجريبي (العائد 0.8%) ، بواسطة GC-MS. أظهرت نتائج بعض الأداب وجود نمطين كيميائيين الاول يحتوي على *piperitone oxyde* (19,7-31,4%) و *piperitenone oxyde* (29,4-27,8%) كمكونات رئيسية بينما يظهر الثاني نسبة عالية جدا من *piperitenone* (54,9%) و *piperitenone oxyde* (17,6%). تمت دراسة الأنشطة المضادة للميكروبات و المبيدات الحشرية للزيت العطري لنبات *M. rotundifolia* حساسية البكتيريا (*Escherichia coli* و *Bacillus Rhyzopertha*) و حشرات الحبوب المخزنة (*Aspergillus niger, subtilis* و *Penicillium parasiticus*) و حشرات الحبوب المخزنة (*Sitophilus oryzae* و *dominica*) للزيت العطري من *M. rotundifolia* بتركيزات مختلفة . بتركيز VN1000/1 يثبط الزيت العطري جميع البكتيريا و الفطريات بينما بالنسبة لحشرات الحبوب المخزنة كان قادرا على تدمير جميع الحشرات بتركيز 6,5*10 مل/ سم3. تمت دراسة تقييم النشاط المضاد لأكسدة لمستخلصات *M. rotundifolia* بواسطة اختبار DPPH و تم التعبير عنه بواسطة نسبة تثبيط و *IC50* لجذر DPPH . النشاط المماثل لعنصر التحكم الايجابي (BHT) الذي تم تثبيطه بنسبة 98,73+-1,3% , بينما بالنسبة للزيوت الاساسية , تم الحصول على تثبيط ضعيف (15,93+-2,2%).

Introduction
générale

Introduction

Dans le passé et jusqu'à présent et dans toutes les régions du monde, les plantes occupent une place importante en médecine. Il y a des médicaments d'origine végétale et des médicaments dont au moins une molécule active est d'origine végétale (FAO, 2003). L'histoire des substances naturelles s'identifie en partie à celle de la pharmacie, dont une discipline, la pharmacognosie, étudie les poisons et les remèdes naturels, ou par extension la plupart des substances biologiquement actives (Mohammedi, 2013). En effet, les plantes sont souvent caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles connues depuis longtemps pour leurs activités antiseptiques et thérapeutiques dans la médecine populaire (Selles, 2012). Les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. Aujourd'hui, elles sont très recherchées, car elles sont généralement dotées de propriétés biologiques intéressantes. L'évolution des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile surtout en présence de beaucoup infection microbienne et la résistance des bactéries qui s'observe de plus en plus.

L'Algérie possède un patrimoine riche en plantes (plus de 3000 espèces) appartenant à plusieurs familles et sont largement utilisées dans la médecine traditionnelle. De notre part, nous proposons d'étudier la menthe à feuille rondes (*Mentha rotundifolia*), en fixant comme principaux objectifs :

- L'extraction et la récupération des huiles essentielles de *M. rotundifolia* par hydrodistillation.
- L'analyse des huiles essentielles par la chromatographie en phase gazeuse.
- Evaluation de leur activité antimicrobienne et antioxydante.

Notre travail se subdivise en trois parties :

- Synthèse bibliographique.
- Partie expérimentale.
- Résultats et discussion.
- Nous terminons par une conclusion et des recommandations.

Partie
théorique

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

I –LA MATIERE VEGETALE : *MENTHA ROTUNDIFOLIA*

I -1-Généralités:

La menthe fait partie de Genre « Mentha » appartient à la famille des labiées ou lamiacées qui est l'une des plus importantes dans le monde végétal, elle comporte plus de 200 genres et 3500 espèces (**Talahagcha; 2008**). On trouve la menthe dans les milieux humides et les régions tempérées de l'Europe, l'Asie, l'Australie, L'Amérique du nord et l'Afrique.

L'Algérie, de par sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives de la menthe (**Boukhatem; 2010**). Autant les menthes sont faciles à reconnaître à leur odeur (**Benayad ; 2008**). Les menthes se plaisent sur un sol léger et humide, aiment avoir leurs racines à l'ombre et leurs tiges au soleil. Ce sont généralement des herbes vivaces , sont toutes caractérisées par une tige carrée, des feuilles persistantes opposées et dentées, et des racines longs stolons qui se développent sous terre et donnent naissance à de nouveaux pieds un peu partout aux alentours, leur étalement est sans fin. Très odoriférantes en raison de l'huile essentielle qu'elles contiennent, elle atteint une hauteur variant de quelques centimètres à près d'un mètre, selon les espèces. En été, les fleurs regroupées en épis ronds ou allongés, de couleur lilas, blanche ou rose, attirent les abeilles (**Anton; 2005**). Les feuilles et les fleurs des menthes étaient utilisées dans des buts thérapeutiques au 16^{ième} et 17^{ième} siècle. Elles auraient des vertus digestives, carminatives, antiseptiques, toniques et stimulantes. Elles participeraient à l'équilibre digestif et amélioreraient le tonus général, actuellement elles sont employées dans plusieurs domaines. En alimentaire, pour les préparations des crèmes, les chocolats, les bonbons, les pâtes à mâcher, les desserts etc...En parfumerie et cosmétique, les produits à base de menthe ont connu un développement spectaculaire avec les pâtes dentifrices, bain de bouche, crèmes, rouges à lèvres et mousse à raser (**El Fadi; 2010**).

I-2-Les différentes espèces de menthe en Algérie :

Nous notons la présence de certaines espèces de menthe en Algérie (Tableau I).

Tableau I : Différentes espèces de menthe d'Algérie (**Baba aissa; 1999**)

Espèce	Nom connu en Algérie	Nom connu en France
<i>Mentha rotundifolia</i>	Timerssat	Menthe a feuille rondes
<i>Mentha aquatica</i>	H'bak lma	Menthe aquatique
<i>Mentha puleguim</i>	Fliyou	Menthe pouliot
<i>Mentha pipireta</i>	Naanaa Har	Menthe poivrée
<i>Mentha spicata</i>	Naanaa	Menthe verte
<i>Mentha longifolia</i>	Naanaa sahra	Menthe sylverstre

I -2-1 Origine et répartition géographique (habitat):

Mentha rotundifolia est une plante vivace que l'on trouve fréquemment au bord des chemins, dans les fossés ou autres lieux humides. Elle se rencontre dans toute la méditerranée sauf Chypre et l'Europe. (**Hadouche; 2010**)

I -2-2 Classification botanique :

La systématique de l'espèce *Mentha rotundifolia* est représentée dans le tableau ci- dessus :

<i>Menthe à feuilles Rondes</i>	
Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Famille	labiées, lamiacées
Genre	Mentha
Espèce	<i>Mentha rotundifolia</i>

I -2-3 Description botanique :

Cette espèce est une plante vivace vigoureuse de 25 à 80 cm de hauteur. Elle ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes, épaisses et ridées. L'ensemble de la plante est couvert de poils denses et blanchâtres qui la rendent douce au toucher ; comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme.

Les feuilles sessiles sont ovales à presque rondes, au plus 4.5 cm de long et 3 cm d'épaisseur de couleur vert vif et légèrement duveteuses. Les fleurs blanches ou mauves claires de 5mm de long sont rassemblées en épis terminant les rameaux (**Bézanger-Beauquesne ; 1986**).



Figure 1. *Mentha rotundifolia* (menthe à feuilles rondes)

I -3. Propriétés et domaine d'application :

Mentha rotundifolia possède des effets sédatifs, myorelaxants, anticonvulsivants et non toxique aux doses thérapeutiques, c'est ce qui ressort des travaux réalisés sur une batterie de tests utilisés en psychopharmacologie par des scientifiques (**Hadouche; 2010**).

Dans la pharmacopée traditionnelle, elle est utilisée comme analgésique en infusion (voies respiratoire et digestives) et bactéricide pour purifier l'eau. Elle est utilisée contre la grippe et le rhume, contre la nausée, contre les maux de dents, piqûres d'insectes rafraichissant (**Brada et al.; 2007**).

I -4 Toxicologie :

Aux doses usuelles, la consommation de ses parties aériennes à des fins culinaires ou pour préparer des boissons d'agrément, ne présente aucun risque de toxicité. (**Anton; 2005**).

I -5 Les huiles essentielles :

I -5-1 Définition :

L'huile essentielle (HE) est un produit obtenu à partir de matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par un procédé physique (**Afnor ; 2000**).

I -5-2 Localisation et répartition des huiles essentielles:

Les HEs sont largement réparties dans le règne végétal ; certaines familles en sont particulièrement riches (labiées). Elles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux: sommités fleuries (Menthe), écorces (cannelier), racines (vétiver), rhizomes (gingembre), fruits (anis, fenouil, badianier)... dans une même plante. Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes; la composition des essences peut alors varier d'un organe à l'autre.

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (Lauracées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs : poche sécrétrices schizogènes (rutacées), canaux sécréteurs (conifères, ombellifères), poils sécréteurs (labiées, composées) (**Bruneton; 1999**).

I -5-3 Composition chimique de l'huile essentielle:

Les huiles essentielles contiennent un nombre considérable de familles biochimiques (chémotypes) incluant les alcools, les phénols, les esters, les oxydes, les coumarines, les monoterpènes, les sesquiterpènes, les cétones et les aldéhydes (**Binet et Brunel; 2000**). Les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes: les terpènes et les composés aromatiques dérivés du phényle propane beaucoup moins fréquents (**Bruneton; 1999**).

I -5-3-1 Composition terpénique:

Les terpènes sont les composants les plus abondants dans les huiles essentielles (**Bruneton ; 1999**). Ils sont subdivisés en deux classes : les mono et les sesquiterpènes.

- Les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) : Ils représentent la classe la plus simple de la série des terpènes. ils contiennent 10 atomes de carbones et constituent 80 à 98 % d'huiles essentielle totale par rapport aux sesquiterpènes.
- Les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes et contient plus de 3000 molécules. Ils sont souvent représentés en faible quantité dans les huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

I -5-3-2 Composition aromatique :

Les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car Ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des HEs (**Kunel et OKogun ; 2003**).

I -5-4 Le rôle des huiles essentielles dans la plante :

Différents rôles biologiques sont reconnus aux huiles essentielles :

- la protection de la plante : elles agissent comme agent antibactérien, antifongique, antivirale et insecticide. Elles protègent aussi contre les herbivores par son odeur défavorable et inhibitrice de l'appétit de l'animal à cette plante (**Bakkali et Averbeck , Idaomar; 2008**).
- Les plus utiles comme arme de défense contre les parasites et les déprédateurs (**Houel, 2011**).
- Elles protègent la plante contre le stress photo-oxydatif et participent aussi dans la croissance et le développement de la plante (**Pichersky et Gershenjon, 2002**).

I -5-5 Les facteurs influençant la composition des huiles essentielles:

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique et le rendement de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant des facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques (**Piochon; 2008**)

➤ **Chémotype :**

Une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera (**Lamamra ; 2007**).

➤ **Influence du cycle végétatif :**

Les différents composants d'huile essentielle peuvent varier de façon remarquable tout au long du cycle végétatif en rapport avec l'âge de la plante et la période de récolte ou la saison (**Mapola ; 2003**).

➤ **Influence du procédé d'extraction :**

Au cours de l'extraction, les constituants des huiles essentielles connus pour être fragiles, sont soumis aux effets combinés d'un milieu aqueux, de son acidité et de sa température, et peuvent subir des conversions chimiques essentielles (**Bruneton ; 1999**).

La composition d'une huile essentielle varie aussi en fonction du temps d'extraction, des traitements préliminaires (transport, durée de séchage et de stockage du matériel végétal) (**Selles ; 2012**).

I -5-6 La Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation de plus en plus populaire tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie (**Piochon; 2008**).

a. Toxicité aigue :

Les huiles essentielles en générale ont une toxicité aigue par voie orale faible ou très faible. D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. Les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (**Bruneton; 1999**).

b. Toxicité chronique :

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue, au moins en ce qui concerne leur utilisation dans le cadre de pratique comme l'aromathérapie (**Piochon; 2008**).

c. Toxicité dermique :

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou phototoxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines **(Paris, Hurabielle ; 1986)**)

d. Cancérogénicité :

Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers **(Piochon; 2008)**.

I -5-7 Emploi des huiles essentielles :**1. En pharmacie :**

Les drogues à l'huile essentielle peuvent être utilisées:

- Pour leur action physiologique:
 - en nature (menthes, verveine, camomille)
 - pour l'extraction de l'essence : l'usage est externe ou interne
- Pour l'isolement de certains constituants: eugénol, anéthole, pinènes,...
- Comme excipients de nombreux médicaments : adjuvants ou aromatisants **(Brueton; 1999)**.

2. Dans l'industrie :

- Parfumerie et cosmétologie: de nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des " bases " de parfums irremplaçables exemple: Rose, Jasmin,...
- Alimentation: les HE sont très utilisées comme aromatisants des aliments (jus de fruits, pâtisserie) **(Brueton; 1999)**

I -6 Activités biologiques des huiles essentielles :**I -6-1 Activité antimicrobienne:**

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins en moins sensibles aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers.

L'usage des huiles essentielles grâce à leur forte action antimicrobienne développée depuis plus d'une vingtaine d'année, constitue un sérieux substitut au traitement par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses (**Haddouche; 2008**).

I -6-2 Activité antibactérienne :

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à une autre et d'une souche bactérienne à une autre (**Ben Ayache, 2013**).

Mode d'action contre les bactéries :

D'une manière 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 (**El- Kalamouni; 2010**).

I -6-3 Activité Antivirale :

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques. De nombreuses pathologies virales sévères montrent des améliorations importantes avec leur utilisation (**Zhiri; 2006**).

I -6-4 Activité antiseptique :

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Hamoudi; 2008**).

I -6-5 Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des HE a été mise en évidence par de nombreux acteurs contre les moisissures allergisantes et contre les champignons pathogènes (**Oussou et al., 2004 ; Teixzira-duarte, 2005 ; Sisaber et Ballahcene, 2012**).

I -6-6 Activité anti-inflamatoire:

- Un grand nombre d'huiles essentielles ont la capacité d'activer la circulation sanguine, de réduire les hémorroïdes et de soulager les jambes lourdes et combattre la cellulite.
- Elles sont efficaces contre la formation de gaz au niveau abdominal, et elles favorisent la formation des sucs gastriques nécessaires à une bonne digestion. (**Alessandra, 2008**)

I -6-7 Activité antioxydante :**L'oxydation :**

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices (**Hamzaoui; 2010**). Les radicaux libres sont générés naturellement au cours du métabolisme normal de l'oxygène in vivo en très faible quantité mais peuvent être libérés suite à un stress oxydatif (**Delattre; 2005**).

Les radicaux libres :

Le radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Ce sont des dérivés instables, incomplètes et toxiques de l'oxygène qui peuvent se retrouver dans l'organisme et qui tentent de s'accoupler à des éléments de nos propres cellules afin de se compléter (anonyme), ils réagissent et dégradent l'ADN, les lipides, les protéines, ils détruisent alors des cellules saines (**Delattre; 2005**).

La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et indissociable de la vie dans une atmosphère oxydante, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs.

- Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telles que la mort cellulaire programmée.
- Le contact entre l'oxygène et certaines protéines du système respiratoire, induit une production d'anions super-oxydes nécessaires pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par des cellules phagocytaires activées.
- Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit l'oxydation des molécules comme les quinones dans l'organisme.
- L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, c'est également le cas des antibiotiques et des anticancéreux.
- L'infection au virus d'immunodéficience humaine (VIH) a pour effet d'accroître la production des radicaux libre dans l'organisme.

Certaines maladies génétiques causent une surproduction de radicaux libres ou une efficacité réduite du système de défense. Une surproduction de radicaux libres a été observée lors des maladies d'Alzheimer et de Parkinson (**Hamzaoui ; 2010** et **Delattre; 2005**).

Antioxydant :

Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (enzymes, protéines, oligo éléments), ils sont produits par l'organisme, mais aussi apportées par notre alimentation. Parmi de bons capteurs de radicaux libres on trouve les HE soufrés, contenant des aldéhydes mono et di terpéniques, des dérivés des aldéhydes benzéniques et cinnamiques, des mono phénols (eugénol) qui peuvent former des hémiquinones relativement stable. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Haddouche ; 2008**).

a. Les antioxydants endogènes

Ils sont capable soit de maintenir les espèces réactives de l'oxygène à des concentrations quasi stationnaires soit de piéger ces espèces (antioxydants non enzymatiques).

b. Les antioxydants naturels

La vitamine E: capable d'une part de piéger chimiquement l'oxygène singulet (O_2) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH).

La vitamine C: c'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogènes et de l'oxygène singulet.

La Caroténoïdes: leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation d'espèces électroniquement activées telles l'oxygène singulet O_2 et la désactivation d'espèces chimiques réactive telles les radicaux peroxydes $ROO\bullet$ et alkyles $R\bullet$, qui peuvent être générés a l'intérieur des cellules et occasionner des dommages oxydatifs.

Le Zinc: le Zinc joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-ZnSO₄, cependant il possède d'autres propriétés antioxydantes dont le mécanisme précis est encore incomplètement connu.

Le Sélénium: joue un rôle dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire, le maintien de l'intégrité membranaire réduit la probabilité de propagation de lésions oxydative à des biomolécules (**Delattre; 2005**).

I -7 Procédés d'extraction des huiles essentielles :

Le procédé d'obtention d'une essence végétale intervient de façon déterminante dans la nature des produits d'extraction. Plusieurs procédés d'extraction des principes végétaux sont connus et utilisés à ce jour, dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les plus employés à l'échelle industrielle pour la production des huiles essentielles (Wang; 2008)

I -7-1- L'hydrodistillation :

L'hydro distillation consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide, l'huile essentielle se sépare par différence de densité et ensuite récupérée après décantation (Bruneton; 2008)

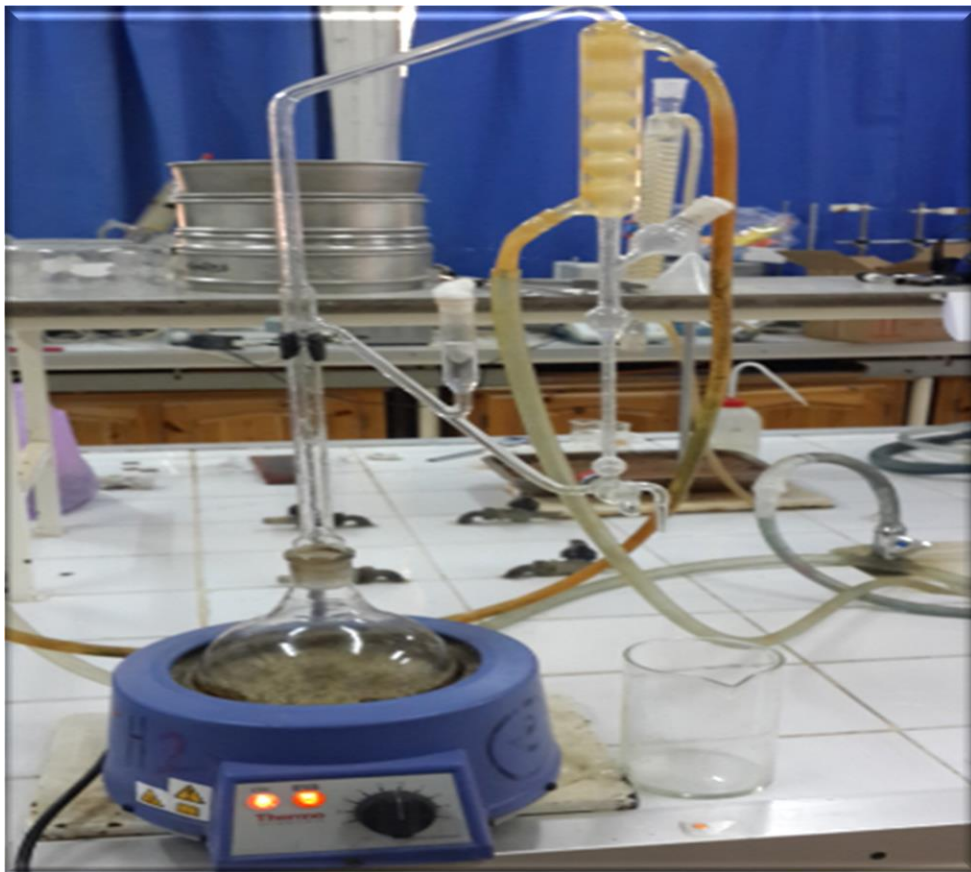


Figure2 : L'hydro distillation.

I -7-2- L'entraînement à la vapeur d'eau:

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur

endommage la structure de cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant.

Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations. (Marzouk; 2006)

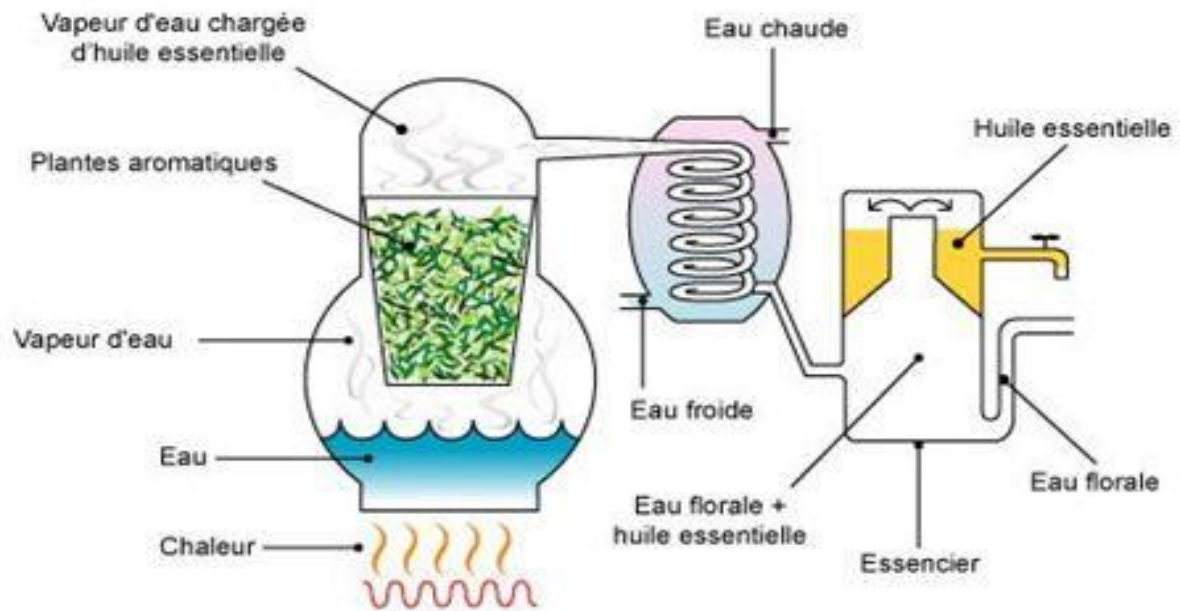


Figure3 : Principe de la distillation par entraînement à vapeur d'eau

Il existe d'autres méthodes d'extraction des huiles essentielles telles que :

- Extraction par solvant.
- Extraction par les fluides supercritiques.
- Extraction par micro-ondes

II- Travaux antérieurs :

Les huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* ont fait l'objet de plusieurs travaux. Compte tenu de la dégradation constatée du constituant essentiel, le temps d'extraction a toujours été limité à 1 heure. Les rendements en huiles essentielles varient de 0,7- 0,9 % (g d'huile essentielle/100 g de matériel végétal). Ces faibles valeurs du rendement peuvent être attribuées à la sénescence des feuilles récoltées au mois de novembre correspondant à la période après floraison. On note que les meilleurs rendements (1,6–1,8 %) sont obtenus durant la période de floraison (juin – juillet). Les composés identifiés dans les huiles essentielles de *M. rotundifolia* provenant de trois régions différentes. Quarante-quatre composés sont identifiés pour l'échantillon provenant de Rouina et quarante-cinq pour celui

provenant de Miliana ; les composés majoritaires sont l'oxyde de pipéritone (Miliana :31,4% ; Rouina : 19,7%) et l'oxyde de pipériténone (Miliana : 27,8% ; Rouina : 29,4 %) représentant le chémotype 1. L'oxyde de pipéritone a été rapporté comme constituant majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* de Grèce (**Kokkini, Papageorgiou, 1988**) et d'Allemagne (**Van Os et Hendriks, 1975**). Quarante-huit constituants sont identifiés pour l'échantillon provenant de Chlef. Les molécules majoritaires sont la pipériténone (54,9 %) et l'oxyde de pipériténone (17,6 %) représentant le chémotype 2. L'oxyde de pipériténone a été rapporté comme constituant caractéristique des huiles volatiles de quelques chémotypes de *M. rotundifolia* (**Lorenzo et al., 2002 ; Nagell, Hefendehl, 1974**). Des travaux antérieurs à la présente étude ont porté sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *M. rotundifolia* et ont révélé l'existence de chémotypes particuliers avec comme composés majoritaires l'acétate de menthyle (**Kokkini, Papageorgiou, 1988**), la dihydrocarvone (**Hendriks et al., 1976**), le 2,4(8), 6-p-menthatrien-2,3 diol (**Pino et al., 1999**) et la pulégone (**Il Idrissi, Bellakhdar, 1989**). La différence de composition constatée sur les huiles essentielles est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol. L'échantillon provenant de Chlef représente un nouveau chémotype typique du Nord de l'Algérie (**Brada et al., 2006**).

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* sont regroupés dans le tableau II. On note l'inhibition de toutes les bactéries, même à la plus faible concentration. Les champignons manifestent la même sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et ont résisté jusqu'à la concentration de 1/500 V/Y. Les bactéries sont donc plus vulnérables que les champignons de cette huile. Cette constatation est contraire à ce qui a été rapporté par plusieurs auteurs (**Benjilali et al., 1984; Kivan et Akgiil, 1986**).

Tableau II : Activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* (**El Arch et al ;2013**).

Concentration V/V	1/100	1/250	1/500	1/1000	T
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Echerichia coli</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> 	-	-	-	-	+
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Trametes pini</i> • <i>Penicillium porasiticus</i> • <i>Aspergillus niger</i> 	-	-	-	+	+
	-	-	-	+	+
	-	-	-	+	+

- : inhibition, + : croissance, T : témoin.

Cette grande activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* ne peut être expliquée que par son profil chimique riche en pulegone (85%) (**El Arch et al ., 2013**).

Différents activités ont été étudiées: l'activité sédatrice, anti-inflammatoire et analgésique *in vivo* sur les rats de souche Wistar et l'activité antioxydante (test de la capacité antioxydante en équivalent Trolox, test de la réduction du fer et test au DPPH) et antibactérienne (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus*).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de *M. rotundifolia* étudiée par le test de DPPH sont exprimés par le pourcentage d'inhibition et la CI₅₀ du radical DPPH par les extraits. Les extraits aqueux des deux plantes présentent un très bon pouvoir antioxydant. En effet, à la concentration de 100 µg/ml les extraits testés réduisent plus de 90% du radical DPPH, *M. rotundifolia* avec 96.20 ± 1.2 %. L'activité comparable à celle du témoin positif (le BHT) qui est inhibé avec 98.73 ± 1.3%. Tandis que pour les huiles essentielles, nous n'avons trouvé qu'une faible inhibition (15.93± 2.2% pour *M. rotundifolia*).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux présente un effet antioxydant très important vis à vis du radical DPPH. En effet, la concentration inhibitrice piégeant 50% du radical DPPH (IC₅₀) est de $28.75 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ pour l'extrait aqueux de *M. rotundifolia*, et $6.1 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ pour le BHT. Tandis que l'huile essentielle des deux plantes a un IC₅₀ très élevée. L'extrait aqueux de la plante possède une forte activité antioxydante par rapport aux huiles essentielles qui présente une faible activité.

L'activité antibactérienne a été étudiée vis-à-vis de six souches bactériennes, les huiles essentielles de menthe exercent une activité antibactérienne remarquable. *Staphylococcus aureus* et la souche la plus sensible avec un diamètre de zone d'inhibition de 29mm. L'espèce *M. rotundifolia* possède des activités biologiques et pharmacologiques intéressante. Aux regards de ces activités, il convient de mener des investigations intenses pour enrichir la production des médicaments à base des plantes (**Bounihi, 2016**).

La résistance aux antibiotiques/antifongiques est devenue un grave problème de santé publique touchant la quasi-totalité des agents antibactériens dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques/antifongiques perdent de leur efficacité et les maladies que l'on croyait éradiquées réapparaissent. La diminution de l'efficacité des moyens de lutte oblige de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques / antifongiques, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides / fongicides (**Alami et al ; 2005**). Les plantes possèdent un système de défense naturel très efficace, basé sur la biodiversité de leurs métabolites secondaires. Cette diversité des groupes structuraux et fonctionnels, permet de se protéger efficacement contre de nombreux pathogènes tels que les bactéries, les champignons et les virus. Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, à titre d'exemples de molécules antimicrobiennes contenus dans les plantes, nous citerons les huiles essentielles et les extraits qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies, et pour améliorer la santé et le bien être (**Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008**).

Chaisson et Beloin (2007) rapportent que les bio-insecticides à base d'huiles essentielles présentent plusieurs caractéristiques intéressantes : ils ont une efficacité à large spectre, mais avec une spécificité pour certaines classes d'insectes et comme ils sont très peu rémanents, ils peuvent être appliqués jusqu'au moment de la récolte. Ces HE sont stables à la température ambiante et peuvent être entreposées pendant plusieurs années.

Les antioxydants sont des composants des aliments utilisés par l'organisme pour se protéger des radicaux libres – molécules produites normalement lors du métabolisme, mais qui peuvent se multiplier de manière incontrôlable dans certaines circonstances. Ces

antioxydants naturels se trouvent sous forme d'extraits (composition chimique complexe) ou de composés purs : les huiles essentielles et certaines huiles végétales (**Fernandez X ; 2012**).

En consommant des antioxydants qui neutralisent l'action délétère des radicaux libres, on a pensé que l'on pourrait diminuer l'émergence de ces maladies (**Leclere; 2013**).

- En fixant directement l'oxygène,
- En chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation (**Elkolly ; 2017**).

Partie expérimentale

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

I - Lieu d'expérimentation :

La plante *Mentha rotundifolia* a été récoltée dans la région de Bourached (W. Ain Defla) durant le mois de Mars. La cueillette s'est effectuée le matin.

L'identification de l'échantillon de la plante a été réalisée au Laboratoire de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université Djilali Bounaama de Khemis-Miliana).

Les plantes ont été débarrassées des débris, rincées avec de l'eau de robinet, ensuite séchées au laboratoire à l'air libre et à l'abri de la lumière.

II – Zone d'étude et période de récolte :

La région de Bourached est l'un des communes de la wilaya d'Ain Defla , il fait partie de l'Atlas moyen du massif de l'Ouarsenis, il est situé au Sud-ouest de la ville d'Ain Defla environ à 13 KM , il est limité au Nord par la commune d'Ain Defla et au Sud par les deux communes Djemaa Ouled chiekh et Zaddine , à l'Est par la commune Djelida et à l'Ouest par la commune Rouina. Il est situé à la périphérie des montagnes de Doui et le barrage d'Ouled Mellouk. Leur climat méditerranéen est caractérisé par des étés chauds et secs, les hivers doux et humides puis des pluies violentes au printemps et en automne. Les coordonnées du site de prélèvement sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III: Situation géographique du site de prélèvement.

Région	Latitude	Longitude	Climat
Bourached	36 ° 10' 9 "	1 ° 55 '45 "	Climat méditerranéen avec été chaud

M. rotundifolia pousse dans les zones humides à cote des rivières, leur longueur peut atteindre les 2m, elle est très utilisée par la population locale.

Les conditions de récolte de notre plante sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau IV: Récolte de *M. rotundifolia*.

Lieu de récolte	Heure de récolte	Température
Bourached	10 :30	23°C

III-Matériel :

III-1 Matériel végétal : L'espèce sélectionnée : *Mentha rotundifolia*. (région de Bourached)



Figure 4 : différentes parties de la plante destiné à extraction

III-2 Matériel biologique :

Le pouvoir antibactérien de *Mentha rotundifolia* est testé par deux souches bactérienne pathogène *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et Levure *Candida albicans*.

IV- Méthodes :

IV-1 Séchage de plante :

La plante récolté puis séchées à l'air libre, à l'ombre à température ambiante, nous avons pris 04 parties de la plante : la plante entière, les feuilles, les Graines et les tiges sont isolées séparément, et récupéré dans des sacs en papiers. Elles seront soumises à l'extraction pour récupérer les huiles essentielles destinés à des tests ultérieures : caractérisation physico-chimique, analyse étude de leur activité biologique (tests antibactérien ,antifongique et larvicide).

IV-2 Extraction des huiles essentielles :

L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* effectuée à l'aide hydro-distillateur de type Clevenger (**Joseph franklin clevenger ;1928**). 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.

IV-2-1 Principe d'extraction des huiles essentielles :

Trente grammes des 04 parties de la plante (la plante entière, les feuilles, les Graines et les tiges) de l'espèce *Mentha rotundifolia* sont mises dans un ballon en verre pyrex,

additionnées de 300 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation 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.

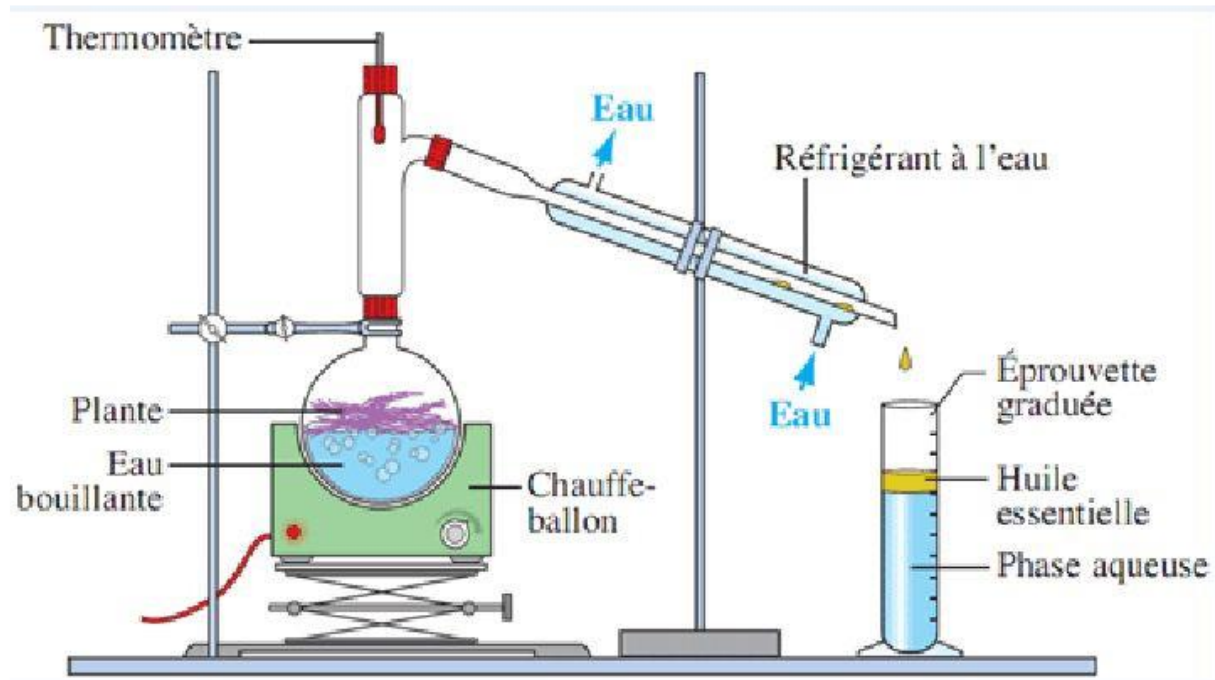


Figure5 : Principe de la technique d'hydro distillation.

IV-2-2 Détermination du rendement d'extraction :

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). Il est donné par la formule suivante :

$$Rd(\%) = \frac{M'}{M} \cdot 100$$

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).

V–Détermination de la composition chimique d’huile essentielle de *Mentha rotundifolia* par la méthode chromatographie en phase gazeuse :

Les analyses chromatographiques de l’huile essentielle de *Mentha rotundifolia*, de ses 04 parties(la plante entière, les feuilles, les Graines et les tiges), seront effectuées chromatographe en phase gazeuse.

V-1 Protocole expérimentale :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d’une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25µm d’épaisseur de film, d’un détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d’un injecteur split splitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l’azote à 1 ml/min. Le mode d’injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de fuite 66 ml/min). La température de la colonne est programmée de 50°C (3min) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10 min.

VI– Activité Antimicrobienne d’huile essentielle extraite :

Deux méthodes différentes seront employées pour la détermination *in vitro* de l’activité Antimicrobienne, appelé aussi Aromatogramme qui est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles, Différents types d’aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables (Zhiri; 2006).

Pour l’évaluation du potentiel antimicrobien des extraits de *Mentha rotundifolia* . Nous avons préféré de les tester contre deux(bactéries, Gram + Gram –) et une levure proviennent de laboratoire privé du Dr Zibouche à Ain defla , Il s’agit d’*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Candida albicans*.

VI-1 La méthode de diffusion sur milieu solide (méthode des disques) :

a- Principe :

La méthode de diffusion a été utilisée pour mettre en évidence l’activité antimicrobienne. Inoculum de 18 à 24 heures de chaque souche est préparé. Des boites de Pétri contenant le milieu de culture spécifique pour chaque germe sont uniformément ensemence avec Inoculum à étudier. A la surface de Chaque une des deux boite de Pétri, on dépose des disques de papier filtre (Wattman) stériles de 9 mm de diamètre dans la premier boite on dépose trois disques imbibés par 10µl de d’huile essentielle pure (Témoin N°01), du solvant qui est Diméthyl sulfoxyde(DMSO) (Témoin N°02) et dernier disque de antibiotique

ou antifongique. Dans la deuxième boîte de Pétri, on dépose cinq disques imbibés par 10µl d'huile essentielle de différentes concentrations diluées dans un solvant qui est le Diméthylsulfoxyde (DMSO) (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32). Cette méthode est répétée trois fois et dans des conditions d'asepsie.

Le disque se décharge très rapidement vers le milieu solide. Parallèlement, le milieu étant mis à incuber à 35-37°C, la croissance des microorganismes peut débuter. Il existe donc une compétition entre deux phénomènes antagonistes : l'augmentation de l'espace occupé par l'huile essentielle et la multiplication du germe (Renaud. F et al ; 1994). On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de germe, appelée zone d'inhibition (photos). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle, et plus il est petit, plus la souche est résistante (Faucher et al ; 2002).

On obtiendra donc, autour du disque, une zone circulaire d'inhibition de la croissance des germes.

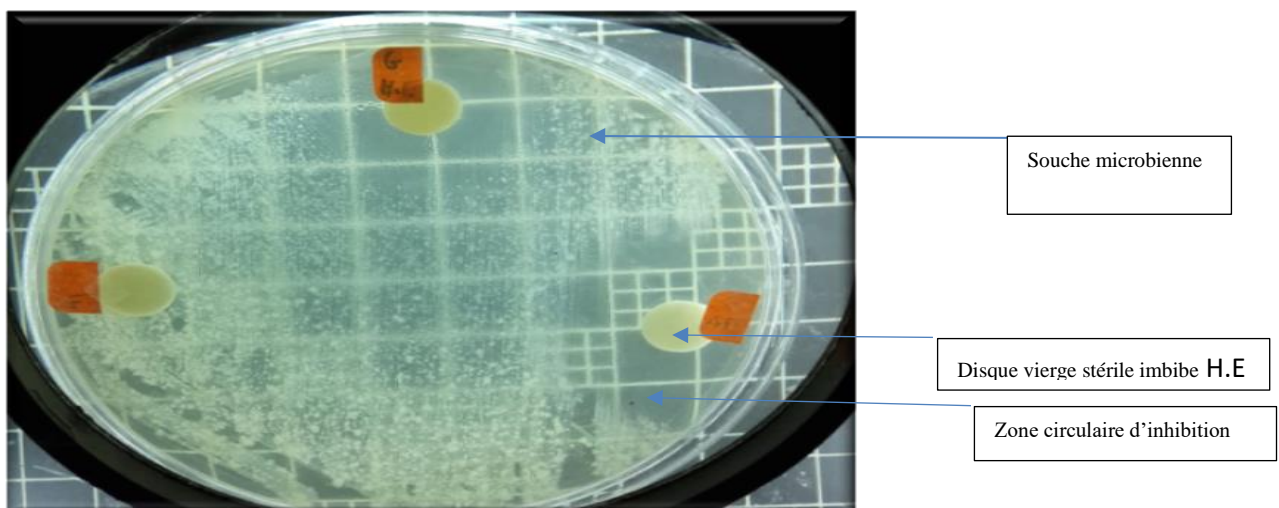


Figure6 : Zone d'inhibition

b- Préparation du milieu de culture :

Les milieux de culture appropriés à cette étude sont le milieu Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure, préparés comme suit :

Le milieu Muller_hinton et Sabouraud sont commercialisés, préparés dans des bouteilles et en tubes respectivement. Donc, ils doivent être bouillis dans un bain-marie jusqu'à dissolution complète, on les laisse refroidir à 45°C, puis on les coule dans des boîtes de Pétri, environ 10ml par boîte. Après séchage et solidification sur la paillasse. La même procédure pour la préparation des milieux (GN et BGT)

c-préparation de l'inoculum :

A partir des tubes inoculum de gélose nutritif contenant les germes pathogènes de (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) et de la gélose Sabouraud contenant la levure pathogène (*Candida albicans*), on racle quelques colonies à l'aide d'une pipette Pasteur pour revivification des germes avoir des souches jeunes et pure, puis on la décharge dans un tube de 9ml de bouillon nutritif pour les bactéries et bouillon glucose tamponné pour la levure. La suspension bactérienne est diluée ensuite à 1/10 soit environ 10^8 UFC/ml et 10UFC /ml pour la levure ; elles sont ensuite homogénéisées et incubées à 36-37°C pendant 18 à 24h (Renaud. F et al ; 1994). Ce même inoculum est utilisé pour les deux méthodes.

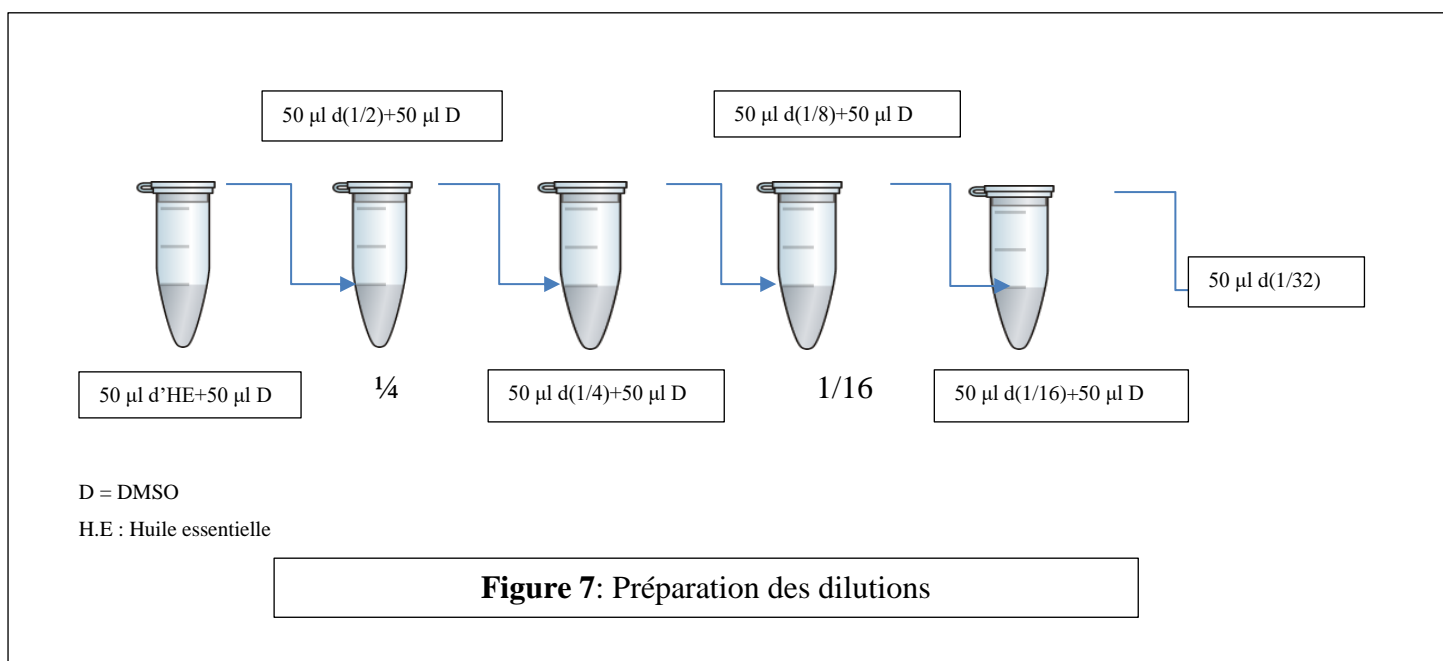
d-L'ensemencement :

Cette opération se fait après la préparation de l'inoculum, avec un écouvillon on trempe l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface des milieux de culture, en stries serrées, un étalement uniforme dans les quatre sens.

e-Préparation des dilutions de l'HE :

On prépare cinq Eppendorfs stériles (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et 1/32) pour l'huile essentielle extraite de, *Mentha rotundifolia*,; le premier Eppendorf représente la dilution (1/2) contient 50µl Diméthyl sulfoxide (DMSO) et 50 µl d'HE. On ajoute dans le deuxième Eppendorf (1/4) 50 µl du premier Eppendorf + 50 µl DMSO, agité bien par le Vortex. On suit le procédé jusqu'à la dernière dilution.

Les dilutions préparées sont présentées dans cette figure ;



f-Application des disques :

On utilise une pince stérile pour mettre les disques vierges stériles ($\varnothing = 9\text{mm}$) dans les boîtes de Pétri ; à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par $10\ \mu\text{l}$ des cinq dilutions ($1/2, 1/4, 1/8, 1/16$ et $1/32$) dans la 1^{er} et la 2^{eme} boîte on place trois disques imbibés respectivement par $10\ \mu\text{l}$ l'huile essentielle pure (T1), Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (T2) et de ATB ou ATF.

Toutes les boîtes sont fermées hermétiquement avec du para film.

j-Lecture de l'aromatogramme sur milieu solide :

La lecture se fait après incubation à $36-37^\circ\text{C}$ pendant 18h à 24h, on mesurant le diamètre de zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre ; D'après **Ponce et al (2003)** . les résultats peuvent être symbolisés par des signes selon la sensibilité des souches vis à vis de huiles essentielles (**Bouguerra. A et al ;2014**).

Tableau V : zones d'inhibition (**Ponce et al (2003)**).

	\varnothing disque = 6mm	\varnothing disque notre teste=9mm
Non sensible (-) ou Résistante	< 8mm	<12mm
Sensible (+)	$9\text{mm} \leq \varnothing \leq 14\text{mm}$	$13.5\text{mm} \leq \varnothing \leq 21\text{mm}$
Très sensible (++)	$15\text{mm} \leq \varnothing \leq 19\text{mm}$	$22.5\text{mm} \leq \varnothing \leq 28.5\text{mm}$
Extrêmes sensible (+++)	>20mm	>30mm

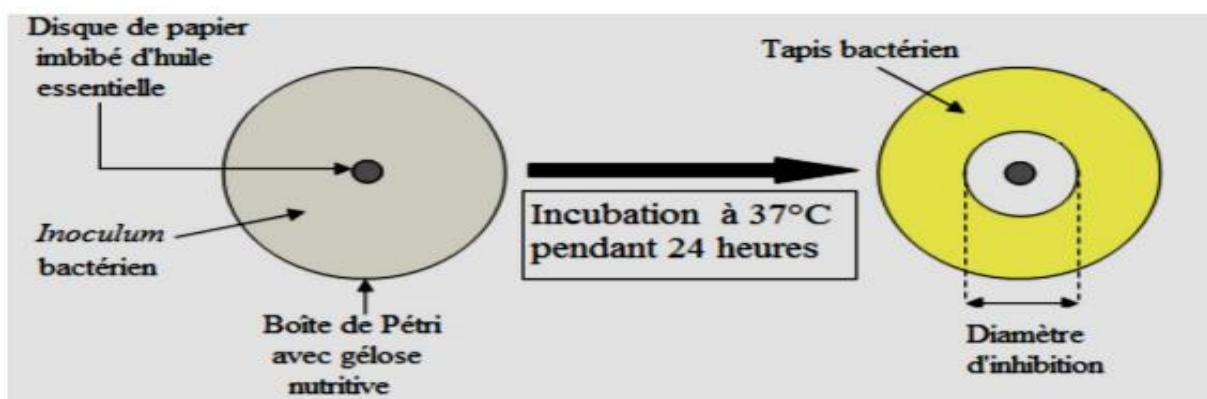


Figure 8: zone d'inhibition (**Gaborieau. B ; 2015**)

VI-2 La méthode des dilutions (micro-dilution) :

a-principe :

C'est une méthode de dilution sur milieu liquide permettant de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la plus petite concentration du composé inhibant toute croissance visible à l'œil nu d'une substance antimicrobienne.

Par analogie à la CMI, et pour tenter de vérifier son activité (Bactériostatique ou Bactéricide), a été créé le terme de Concentration minimale Bactéricide (CMB) qui se définit par la plus faible concentration du composé laissant après 18h à 24h d'incubation un taux 0.01% de survivants après ensemencement (**Denis.F et al ; 1987**).

Cette méthode est répétée trois fois et dans des conditions rigoureuses d'asepsie :

*Remplit toutes les Eppendorfs stériles par 50µl de bouillon (B.N pour les Bactéries et BGT pour la levure)

*Introduire 50 µl d'H.E dans le 3^{ème} Eppendorf

*On commence de ce dernier à réaliser des dilutions binaires (1/2,1/4,1/8,1/16 et1/32) de l'huile et jeter 50µl du dernier Eppendorf.

*Remplir autres par 50µl de la suspension microbienne à l'exception du 2^{ème}Eppendorf.

*Introduire dans 2^{ème} Eppendorf 50 µl d'H.E. Le 1^{er}et 2^{ème}Eppendorfs serviront ainsi comme Témoin.

b-Lecture de l'aromatogramme sur milieu liquide :

La lecture se fait après incubation à 36-37°C pendant 18h à 24h, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle qui inhibe complètement la croissance bactérienne visuelle dans le premier Eppendorf qui ne présente pas un trouble microbienne. La concentration minimale bactéricide (CMB) est considérée comme la plus faible concentration qui ne donne aucune croissance bactérienne, elle a été mise en évidence en transférant à partir des Eppendorfs de croissance négative une goutte dans des tubes de bouillon nutritif, et observer la présence ou l'absence d'un trouble après 24h d'incubation à 37°C (**Yakhlef et al, 2011 ; Okusa, 2012**).

Le rapport CMB sur CMI permet de classer le composé à tester en « Bactéricides / Fongicide » lorsque le rapport = $CMB / CMI \leq 0,4$; et le composé à tester est « Bactériostatiques / Fongistatique » si le rapport = $CMB / CMI > 0,4$ (**Denis.F et al ; 1987**).

VII- Activité Antioxydants d'huile essentielle extraite :**VII-1 Test du DPPH (essai de piégeage antioxydant) :**

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir anti-radicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Peyrat J F et al ; 2016).

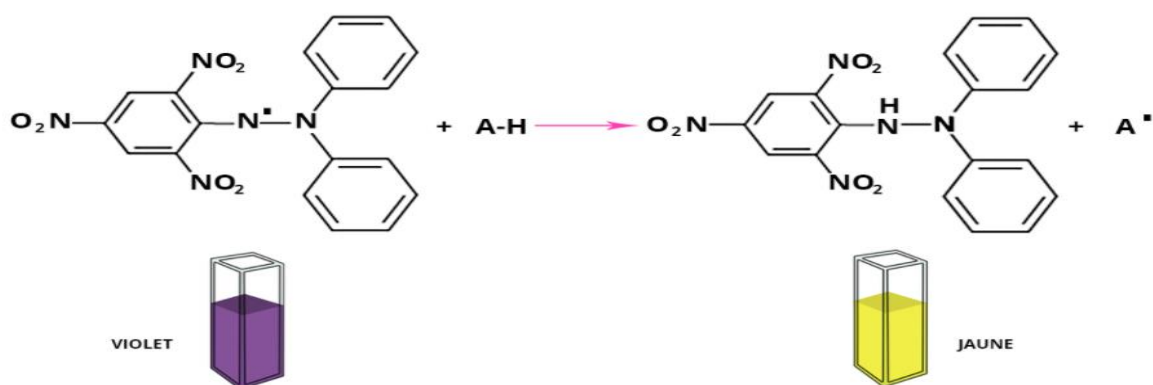


Figure 9: Structure du radical DPPH après et avant réaction (Peyrat J F et al ; 2016).

VII-2 La méthode DPPH :

Elle représente les méthodes employant des radicaux modèles dans l'évaluation des capteurs de radicaux, les méthodes ayant acquis une grande popularité au cours de la dernière décennie en raison de leur rapidité et de leur sensibilité. Les effets radicaux libres des fractions sur DPPH ont été estimés selon la méthode de (Sancher Moreno ;2002) avec quelques modifications.

Dans notre cas 50µl des solutions éthanoïques et / méthanoïques d'huiles essentielles des Extraits de *Mentha rotundifolia* à différentes concentrations (1000, 800, 600, 400, 200,100 µg/ml) sont mélangées avec 02ml d'une solution éthanoïques et /méthanoïques de radical 2,2-diphényl-1-peirylyhydrazyle (0.003% DPPH).On a ensuite secoué vigoureusement et laissé reposer à température ambiante pendant 30 min ,et à l'abri de la lumière ; les absorbances sont mesurées par Spectrophotomètre à 517 nm contre le blanc qui est compose par 02 ml de la solution éthanoïques et / méthanoïques au DPPH et de 50µl d'éthanol et / méthanol.

La diminution de l'absorbance de la solution de DPPH indique une augmentation de l'activité de piégeage des radicaux DPPH. En pourcentage d'inhibition contre DPPH, il est calculé comme suit (Gokcekus H et al, 2011) :

$$\% \text{ d'activité antioxydant} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

VII-3 Paramètre IC50:

Selon Tepe et al., 2005), la concentration équivalente à 50% de DPPH perdu (IC 50), est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Les valeurs IC50 ont été calculées par des régressions linéaires où l'abscisse est représentée par la concentration des composés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en %.

Le témoin est composé par 02ml de la solution DPPH et de 50µl de éthanol. Le control standard est représenté par un antioxydant standard : l'acide ascorbique ou BHT ; dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons test pour comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour l'antioxydant standard et pour l'H.E des extraits de *Mentha rotundifolia* (% I, IC50).

Chapitre 3

Résultats et discussions

Résultats et discussion :

A cause de la pandémie mondiale COVID -19, nous n'avons pas pu réaliser le travail expérimental. Nous nous contentons des résultats rapportés par la littérature.

Conclusion

Conclusion

L'étude a porté sur la plante *Mentha rotundifolia* récoltée dans la région de Bourached (W. Ain Defla). L'objectif principal était la détermination de la composition chimique et les activités antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle (HE) extraite. Plusieurs travaux ont porté sur les huiles essentielles de *M. rotundifolia*, nous rapportons quelques résultats. L'extraction de ces HE de *M. rotundifolia* est réalisée par hydro-distillation ; les rendements obtenus varient de 0,7% à 0,9%. Les meilleures rendements (1,6–1,8 %) sont obtenus durant la période de floraison (juin – juillet). L'analyse des HE par CG et CG/SM a permis d'identifier Quarante-quatre composés pour l'échantillon provenant de Rouina et quarante-cinq pour celui provenant de Miliana. Les composés majoritaires sont l'oxyde de pipéritone (Miliana : 31,4% ; Rouina: 19,7%) et l'oxyde de piperiténone (Miliana : 27,8% ; Rouina : 29,4%). Quarante-huit constituants sont identifiés pour l'échantillon provenant de Chlef, Les principaux constituants sont la pipériténone (54,9 %) et l'oxyde de pipériténone (17,6 %)(**Brada et al., 2006**).

Selon **El Arch et al ., 2013**, l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a inhibé la croissance de toutes les bactéries étudiées, même à la plus faible concentration, soit 1/1000V/V. Quant aux champignons ils ont résisté jusqu'à la concentration de 1/500VN. Pour les insectes des céréales stockées, les concentrations de $3,5.10^{-2} \text{ ul/cm}^3$ et $6,5.10^{-2} \text{ ul/cm}^3$ ont été suffisantes pour provoquer une mortalité de 100% chez respectivement *Sitophilus oryza* et *Rhizopertha dominica* au bout d'une journée de traitement.

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle sur le développement bactérien, fongique et insecticide laisse entrevoir des perspectives d'application dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits et l'HE de *M. rotundifolia* par la méthode anti-radicalaire contre le DPPH, montre que l'extrait aqueux présente un effet antioxydant remarquable vis à vis du radicale DPPH avec une IC_{50} de l'ordre de $28.75 \pm 0.04 \mu\text{g/mg}$ pour *M. rotundifolia*, alors que les extraits aqueux exercent un potentiel antioxydant plus important que celui de l'huile essentielle (**Bounihi, 2016**).

Conclusion

Les résultats rapportés par la littérature montrent que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est douée de propriétés biologiques remarquables. L'effet inhibiteur de cette huile sur le développement bactérien, fongique et larvicide laisse entrevoir des perspectives prometteuses pour l'application dans l'industrie alimentaire, cosmétique, et pharmaceutique. Il est recommandé :

- D'évaluer et tester les différentes molécules chimiques isolées in vivo sur différents modèles biologiques en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et de conservations alimentaires.

- Tester l'activité anti-tumorale et anticorrosive de cette huile essentielle.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographique

1. **Afnor. (1986).** Recueil des Normes françaises – huiles essentielles-, AFNOR. Paris. 57p.
 2. **Afnor. (2000).** Association française des normes, recueil de norme. les Huiles essentielles Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1). Monographies relative aux huiles essentielles (Tome II , volume 1 p :323et 2 p :663). Ed.Afnor,France.
 3. **Alami M., Barret R., Brion J. D., Enguehard-Gueiffier C., Foliot P., Gaudy C., Gerondeau N., Gueiffier A., Lanotte P., Leconte-Astruc V., Mereghetti L., Peyrat J. F., Ratsimbazafy V., Tandé D. (2005):** In Pharmacothérapie Pratique à L'officine : L'essentiel, Antibiotiques: Pharmacologie et Thérapeutique. Elsevier, p14
 4. **Alessandra M B., (2008) :** (Grande Guide Des Huiles Essentielles Santé Beauté Bien-etre) hachette pratique France. Pp :205-10-23
 5. **Anton R et Annelise L (2005).**plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Lavoisier, édition Tec &Doc.
 6. **Baba Aissa F., 1999 ;** Encyclopédie des plantes utiles-Flore d 'Algérie et du Maghreb, Ed, Libraire modern-Rouiba. Pp :20-21,171-173.
 7. **Benayache F. (2013).** Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Mémoire de magister en chimie organique. Université de constantine.3-58p
 8. **Benayad N (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal de Rabat .Pp13-30.
 9. **Benmessaoud L D., Zertoubi M.,Irhzo A. et Azzi M (2013).** Revue : Huiles et Extraits de plantes comme inhibiteurs de corrosion pour différents métaux et alliages dans le milieu acide chlorhydrique, journal of materials and Environmental science.
 10. **Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M et Torck M (1986).** Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2ème édition révisée, Ed. Maloine.
 11. **Binet P, et Brunel J.-P., 2000;** Physiologie Végétale. Tome II. Edit Doin .P: 54.
 12. **Bouguerra A., Himed L. et Barkat M (2014):** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite d'écorces de *Citrus reticulata*. Société algérienne de nutrition, p :35.
 13. **Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F et Hakim Y (2010).** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Nature et Technologie, p :37.
 14. **Bounihi A ;(2016) :** Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentharotundifolia* (Lamiacées) thèse de doctorat national science de médicament, p :112.
-

Références Bibliographique

15. **Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A et Lognay G (2007)** : Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 11(1)
 16. **Bruneton J (1999)** : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tech. & doc, Lavoisier, Paris
 17. **Bruneton J (2008)** : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e édition, Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
 18. **Delattre J., Beaudoux J .L et Bonnefont Rousselot D (2005)** : Radicaux libres et stress oxydant, Aspect biologiques et pathologiques. édition Tec & Doc, Lavoisier.
 19. **Denis F. Carbonnelle B. Marmonier A. Pinon G. et Vargues R.(1987)** : Bactériologie médicale Technique usuelles 2^{em} édition (paris),p :229
 20. **-El Arch M., Satranie B., Farahe A., Bennani L.,Boriky D., Fechtale M., Blaghene M et Talbie M. (2002):** Composition chimique et activités antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc article : *acta botanica gallica*.
 21. **El Fadl A et Chtaina N (2010).** Etude de base sur la culture de la menthe du Maroc programme régional de lutte intégrée contre les organismes nuisibles (integrated pest management) au proche orient. Office national de sécurité sanitaire des produits alimentaires(ONSSA).ONSSA/FAO, Rabat.
 22. **El Kalamouni Ch (2010).** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat en sciences des Agro-Ressources.Université de Toulouse Pp :22-38.
 23. **Elkolly . M(2017)** : structure et activités des substances naturelles : principes et applications cours : écologie microbienne, université Ferhat Abbas de Sétif ,p :49
 24. **FAO (2003)** ; Stratégie et politique agricoles ; la filière (Plantes Aromatiques et médicinales), préparé par Anthola DOSSIDES
 25. **Faucher J L. et Avril J L.(2012):** Bactériologie Générale et Médicale édition :eclipse (paris), p :37.
 26. **Fernandez X.,Merck F. et Kerdudo A.(2012)** : Conservateurs pour cosmétiques-Antioxydants et anti-UV Technique de l'ingénieur.
 27. **Gaborieau B.(2015)** : Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines : enquête sectorielle dans le département de la Vienne. Thèse pour la diplôme d'état de docteur en pharmacie faculté de Médecine et de Pharmacie université Poitiers, p :37
 28. **Gokcekus H., Turker U. etLamoreaux J W.(2011):** Survival and Sustainability environmental concerns in the 21st century Edition:springer Heidelberg Dordrecht London ,now york,p:538 .
 29. **Haddouche F et Benmansour A (2008).**Article de synthèse: Huiles essentielles et activités biologiques, Application à deux plantes aromatiques. *Journal les technologies de laboratoire* N°8.
 30. **Hamoudi R.,(2008)** ; Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plantes *Teurium polimeryii* provenant de la région Tamanrasset. Magister université Kassdi Marbeh Ouargla Pp :15-43
 31. **Hamzaoui N (2010).** Etude de la composition chimique de l'*Artemisia Herba-Alba* poussant en Algérie. Thèse de Doctorat U.S.T.H.B.
-

Références Bibliographique

32. **Hendriks H., Van Os FHL. (1976).** Essential Oils of two chemotypes of *M. suaveolens* during ontogenesis. *Phytochemistry* 15, p. 1127–1130.
 33. **Houël E., 2011 :** Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne analyse de préparation phytotérapeutique a base de caussiaamaral et psidiuma cutamgilum D.C MYRTACEAE utilisé en guyane française pour une indication anti paludique . edantification et analyse métabolique des huiles essentielles a activité fongiquethèse de doctora en chimie des substance université des Antilles et de la giyan p :220
 34. **Il Idrissi A., Bellakhdar J. (1989).** Étude chimiotaxinomique de diverses populations de *Mentha suaveolens* Ehrh. Du Maroc : Nouvelles données. *Al Biruniya* 5 (2), p. 79–88.
 35. **Jones J.D. et Dangl J.L. :** The plant immune system nature ,2006 Pp:323-329.
 36. **Joseph franklin Clevenger:** le montage Clevenger est désigné par le nom de son inventeur qui publié en 1928
 37. **Kaloustian J. et Hadji-Minaglou H(2012) :** La connaissance des huiles essentielles :qualitologie et aromathérapie springer-verlag-France (paris), p :37.
 38. **Kunle O, et Okogun J.,(2003),** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from lippiamulti flora leaf extract phytomedicine. Vol 10.Pp :59-61.
 39. **Kokkini S., Papageorgiou VP. (1988).** Constituents of Essential Oils from *Mentha X rotundifolia* Growing Wild in Greece. *Planta Med.* 38, p. 166–167.
 40. **Lamamra M. (2007) :**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 en sciences biologiques.8-17 p.
 41. **Leclere J P. :** guide des aliments antioxydants.edition :thierrysouccar , 2013, p :05.
 42. **Lehbab A. :** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Mentha rotundifolia* L. (Domrane) de la région de Tlemcen, Composition chimique des huiles essentielles.
Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme master en biologie, 2013,p :26.
 43. **Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Canigueral S. (2002) :** Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil. Technol.* 45 (4), p. 519–524.
 44. **Mapola G. (2003) :** Variations individuelle et saisonnière de la teneur et de la composition des huiles essentielles de *E.citriodora* acclimaté à Point-Noire(Congo-Brazzaville). Mémoire de diplôme d'étude approfondie en chimie et technologie alimentaire. Université Marien Ngouabi.p : 5-9.
 45. **Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraieff., Khemiss F., Chekir Ghedira L et Boukef K (2006) :**Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian;Rosmarinus officinalis L. Oil from Kasrine. *Journal of Food Agriculture and environment*; Vol.4, pp 61-65.
 46. **Mohammedi Z. (2013) :** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la région Nord et Sud - Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en biologie. Université de Tlemcen.p :23
 47. **Oussou K R ,Kano C, Guessenn N , Yolou S , Koukoua G , Dosso M ,Nguessan Y T ,Figuerdo G , Chalchat J C ;(2004) ;** Activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes aromatique de Côte d'Ivoire ;CR chimie. Pp :292-297
 48. **Paris M., Hurabielle.M (1986) :** Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. parfumes for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* . pp 237-243;5
-

Références Bibliographique

49. **Peyrat J F., Danan A ., Bosc V., Camel V., Cladiere M., Eveleigh L., Giampaoli P., Maillard M N. et Soto P.(2016)** :Détermination de l'activité d'un antioxydant par le test DPPH CHIMACTIV université Paris-Saclay et Agro Paris Tech.
 50. **Pichersky E,et Gershenzon J., (2002)** : The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defence .curropin plant biol . Pp : 273-243 ;5.
 51. **Piochon M (2008)** : Étude Des Huiles Essentielles D'espèces Végétales De La Flore Laurentienne: Composition Chimique, Activités Pharmacologiques Et Hémi-Synthèse. Mémoire présenté à Université Du Québec À Chicoutimi.
 52. **Pino JA., Rosado A., Fuentes V. (1999)**. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Mentha rotundifolia* (L.Hudson from Cuba. J. Essent. Oil Res. 11, p. 241–242.
 53. **Renaud F.,Frenney J., Hansen W. et Bollet C. (1994)** : Manuel de Bactériologie Clinique. 2^{ème} Edition Scientifique Elsevier (Paris), p :434.
 54. **Sanchez-Moreno C. (2002)** : Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. Food Science and Technology International 8: 121-137.
 55. **Selles C. (2012)**. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse de doctorat en sciences physiques. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. p : 30-45.
 56. **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.
 57. **Tepe B., Daferera,D., Sokmen A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005)**. Antimicrobial And antioxydant Activities of the essential oil and various extract of *salvia tomentosa* miller (lamiaceae). Food Chemistry 90 , Elsevier , p: 333-340.
 58. **Van Os FHL., Hendriks H. (1975)**. Investigation of a population of *Mentha X niliaca* Juss. ex Jacq. found in natural conditions at oudemolen. Acta Bot. Neerl. 24, p. 129–133.
 59. **Wang J., Sun B., Cao Y., Tian Y et Lix (2008)** : Optimization of ultrasound- assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. Food chemistry; Vol-106; pp 804-810.
 60. **Yakhlefet G, Laroul S, Hambaba L, Aberkane M C et Ayachi A. (2011)** : Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. Article de synthèse, phytothérapie 9, p :209-218.
 61. **Zhiri A. (2006)** : les huiles essentielles, au pouvoir antimicrobien avéré Nutra news : Science, Nutrition, Prévention et Santé. p :10.
-