الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RépubliqueAlgérienneDémocratiqueet Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية
Département De Biologie Cellulaire Et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

Extraction et caractérisation physicochimique et biologique des huiles essentielles extraites à partir d'une plante médicinale (*Mentha aquatica* L.) de la région d'El oued

Mme BENINE Roumaissa

Mme REDOUANI Kaouthar

Devant le jury composé de:

Président :	**Mr BOUALI Noureddine**	**M.A.A. Université d'El Oued**
Promotrice :	**Mme MAHBOUB Nasma**	**M.C.B. Université d'El Oued**
Examinatrice :	**Mme RAMDANE Farah**	**M.C.B. Université d'El Oued**

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu « **Allah** » le tout puissant miséricordieux de non avoir donné le courage et la confiance ainsi que la volonté pour préparer ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent d'abord, à notre promotrice, **m^{me} MAHBOUB Nasma**, maître de conférences B à l'Université Echahid Hamma- Lakhdar El-oued, pour ses conseils chaleureux, son soutien et son encadrement afin de réaliser ce modeste travail.*

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury qui ont bienvoulu accepter d'examiner notre travail :

***Melle RAMDANE Farah**, maître de conférences B à l'Université Echahid Hamma- Lakhdar El-oued. Vous nos faites le grand honneur de présider ce jury. Nous vous prie de bien vouloir recevoir le témoignage de nos profonds respects.*

***Mr BOUALI Noureddine**, maître assistant A à l'Université Echahid Hamma- Lakhdar El-oued. Nous vous remercions de nos honorer par votre présence entant qu'examinateur et pour avoir acceptée d'évaluer ce mémoire.*

Nos remerciements vont également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences de la nature et de la vie.

Et tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin à la concrétisation de ce travail.

dédicace

Dédicace

Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

A mes chers parents REDOUANI Ali et MENASSEURE Ouassila ,

A mon mari Khaled BEN AMOR et mon fils Hichame.

A mon chèr frère nizar et ainsi que mes chères sœurs Liela ;wafa ; Soumaia ; khadidja ; khaoula et Islam .

tous ma famille.

A ma amie «ROUMAISSA» pour leur solidarité envers moi. Et tout autre amis qui j'aime

KAOUTHAR

DÉDICACE

Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

A mes chers parents BENINE Hamza et BENINE Messouda,

A mon mari MEISSA Hichame et mes enfants Moutasimebellah et Razane .

A mes chèrs frères Abbase, Ali, Salime et Moussa et ainsi que mes chères sœurs Zineb, Meriem, Manar, Rayne et Hadile.

Et à toute ma famille.

A ma amie «Kaouthar» pour leur solidarité envers moi. Et tout autre amis qui j'aime

ROUMAISSA

Résume

الملخـــــــــــص

هذا العمل هو جزء من تثمين النباتات الطبية الجزائرية المعروفة بخصائصها العلاجية، ونحن مهتمون بدراسة نبات النعناع المائي *Mentha aquatica* المعروف بغناه بالمواد الفعالة المستخدمة من قبل السكان المحليين في مختلف العلاجات ويكرس هذا العمل من ناحيتين أولا ،إستخراج الزيوت العطرية، وتأثير التجفيف على مردود المستخرج وتحديد التركيب الكيميائي وذلك بهدف دراسة النشاطية البيولوجية بما في ذلك النشاطية المضاد للبكتيريا ، والنشاطية المضادة للأكسدة للزيوت الأساسية المستخرجة من النبات ، وثانيا لتسليط الضوء على هذه الأنشطة النباتية (*Mentha aquatica*). تم استخراج الزيت الأساسي من الجزء الهوائي للنبات بواسطة تقنية التقطير بالبخار hydrodistilation. مردود الاستخراج الناتج% 5.136 ودراسة خصائصها الفيزيائية والكيميائية ، بما في ذلك الخصائص الحسية نجد أن هذا الزيت الأساسي يملك مظهر سائل و لون ابيض شفاف و رائحة عطرية و نجد ان نسبة الحموضة تساوي 7.55 ، و مؤشر الانكسار 1.339،والقدرة على الامتزاج بالايثانول (1v/6.4) و منه فان هذا الزيت قاعدي و قابل للذوبان. و فيما يتعلق بالتحليل الكيميائي وجدنا ان مؤشر الحمض قدر ب 2.204 ومؤشر الاسترة يساوي 10.019 و مؤشر اليود يقدر 0.158 ،و مؤشر التصبن يساوي 12.21 . أما بخصوص النشاطية البيولوجية فتمحورت حول ، دراسة النشاطية المضادة للاكسدة باستخدام •DPPHتؤكد ان قيمة IC_{50} للزيت الأساسي قدرت ب 0.976 مع /مل و بالنسبة لحمض الاسكوربيك قدرت ب 0.007مغ / مل والنشاطية المضادة للبكتيريا من أجل معرفة مدى فعالية الزيت الأساسي على بعض السلالات البكتيرية الممرضة مثل

Bacillus subtilis ATCC 6633، Escherichia coli ATCC 25922و من خلال تحليل هذا الزيت الأساسي وجدنا ان لديه نشاطية ضعيفة و محدودة ضد البكتيريا المدروسه

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية ،l *Mentha aquatica*، hydrodistilation ، الخصائص الفيزيائية والكيميائية , DPPH .

Extraction et caractérisation physicochimique et biologique des huiles essentielles extraites à partir d'une plante médicinale (*Mentha aquatica* L.*)* de la région d'El oued

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales algériennes réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Mentha aquatica* L. connue par sa richesse en matière active utilisée par la population locale dans différents thérapies. Le présent travail est consacré d'une part, à L'extraction des huiles essentielles, l'influence du séchage à l'ombre sur le rendement d'extraction et l'identification de la composition chimique dont l'objectif visé est d'étudier les activités biologiques dont l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites, et de l'autre part de mettre en évidence ces activités (*Mentha aquatica* L.). Nous avons procédé l'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante par la technique d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction obtenu est de 5.136 %, et ses propriétés physiques et chimiques, y compris ses propriétés sensorielles, sont étudiées. Cette huile essentielle a l'apparence d'une odeur aromatique liquide et blanche. Par ailleurs, les propriétés physique, on trouve le pH égale 7.55, indice de réfraction est égale 1.339, et la miscibilité à l'éthanol estimée à (v1 / 6.4) v d 'Et OH). C'est-à- dire nos HEs sont basique , et soluble. Concernant , les analyses chimiques on trouve que l'indice d'acide estimée est 2.204, indice d'ester est égale 10.019, indice d'iode estimée à 0.158 et indice de saponification est égale 12.21. En termes d'activité biologique, l'étude s'est concentrée sur l'étude de l'activité antioxydante à l'aide de DPPH •, confirment que la valeur de IC_{50} d'huile essentielle *Mentha aquatica* L. égale 0.976 mg/ml et 0.007 mg/ml pour l''acide ascorbique et l'étude l'activité antibactérienne afin de connaître l'efficacité de l'huile essentielle sur certaines souches bactériennes pathogènes telles que *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 En analysant cette huile essentielle, nous avons constaté qu'elle avait une activité faible et limitée contre la bactérie étudiée.

Mots clés : huile essentielle , *Mentha aquatica* L , hydrodistilation, propriétés physiques et chimiques DPPH.

Extraction and physicochemical and biological characterization of essential oils extracted from a medicinal plant (*Mentha aquatica* L.) from the El oued region

Abstract

This work is part of the valuation of the Algerian medicinal plants known for their the rapeutic properties; we are interested in the study of the plant *Mentha aquatica* L known for its richness in active material used by the local population in various therapies . This work is dedicated on the one hand, to the extraction of essential oils the influence of drying in the shade on the extraction yield and the identification of the chemical composition of which the objective is to study biological activities including antimicrobial activity and the antioxidant activity of essential oils from medicinal plant *Mentha aquatica* L, and secondly to highlight these activities (*Mentha aquatica).* We performed the extraction of essential oils from the aerial part of the plant by the technique of steam distillation. The resulting extraction yieldis 5.136% and its physical and chemical properties are studied , including sensory properties . This essential oil has the appearance of a clear white liquid and aromatic odor .We find the pH equal to 7.55, the refractive index is 1.339, and the ability to mix with ethanol (v / 6.4) and thus this essential oil is basic , and soluble. Regarding chemical analysis, we found that the acid index was 2.204, esterification index 10.019, iodine index 0.158, and saponification index 12.21. The results of the antioxidant activity of our oils by the use of the DPPH• test, confirm that the IC_{50} value of essential oil of *Mentha aquatica* L estimated equal 0.976mg / ml and 0.007mg / ml for ascorbic acid. and antibacterial activity in order to know the effectiveness of essential oil on some pathogenic bacterial strains such as Escherichia coli ATCC 25922, Bacillus subtilis ATCC 6633 By analyzing this essential oil we found that it has a weak and limited activity against the studied bacteria

Keywords: Essential Oils, *Mentha aquatica* l, hydrodistilation, Physical & Chemical Properties ، DPPH .

Liste des abréviations

Liste des abréviations

A: Acide ascorbique.

AB : Absorbance du blanc (uniquement du DPPH) (t=0).

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AT: Absorbance des différents concentrations (t=15min).

CCl_4 : Tétrachlorure de carbone

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DMAPP : Diphosphate de diméthylallyle.

DMSO : Diméthylsulfoxide.

DPPH : 2,2- diphényl-1-picryl-hydrazyl

FPP : Le diphosphate de farnesyl (C_{15})

g : Gramme

GPP : Géranyl diphosphate (C_{10})

H : Heure

HCl : Acide chlorhydrique

HEs : Huiles essentielles

Ia : Indice d'acide

IC_{50} : Concentration a 50 % de DPPH perdu

IPP: Le diphosphate d'isopentényle

KOH : Hydroxyde de potassium

Li : Lamelle interne

m_0 : Masse en gramme de la matière végétale sèche.

m : Masse en gramme de l'HE .

MeOH : Méthanol

Mg : Milligramme

Mm : Millimétre

MVA : Acide mévalonique

N : Normalité

$Na_2S_2O_3$: Thiosulfate de sodium

Nm : Nanomètre

PH : Potentiel hydrogénique

PG : Plato globules

PT : Prényltransférases

R (%) : Pourcentage du rendement des huiles essentielles

R : Ribosomes

RE : Réticulum endoplasmique

T : Terpène

V : Volume

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

µl : Microlitre.

µM : Micromole

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 01	(a.b.c) Biosynthèse des terpènes.	8
Figure 02	Structure schématique du leucoplaste sécréteur	9
Figure 03	Compartimentation de la biosynthèse des monoterpènes dans les cellules sécrétrices	11
Figure 04	Structure chimique des composés seléctionés (les tèrpènes) des huiles essentielles .	12
Figure 05	Structure chimique des composés seléctionés (les composés aromatiques) des huiles essentielles	12
Figure 06	Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	17
Figure 07	Espèce Mentha aquatica	25
Figure 08	Répartition géographique Mentha aquatica	26
Figure 09	Plant générale de la partie experimentale	30
Figure 10	Réduction du radical libre DPPH	38
Figure 11	Spectre d'absorption du radical DPPH	38
Figure 12	Technique de diffusion sur gélose par disques.	51
Figure 13	Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de HE.	51
Figure 14	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	52
Figure 15	Courbe d'étalonnage d'acide gallique .	53
Figure 16	Histogramme représentant les valeurs des IC50 des huile essentielle de Mentha aquatica , acide ascorbique et acide gallique .	54
Figure 17	Zones d'inhibition (en mm) des souches bactériennes testées enfonction de déférentes concentrations d'huile essentielle	56
Figure 18	Test de corrélation de H.E de Mentha aquatica L. vis-à-vis la souche Bacillus subtilis.	57

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
1	Récolte, séchage et conservation des plantes	5
2	Exemples de la diversité des applications des huiles essentielles	19
3	Exemples de la diversité des applications des huiles essentielles	24
4	Classification classique de l'espèce Mentha aquatica .	46
5	Rendement des H.Es obtenus par hydrodistillation	46
6	Caractéristiques organoleptiques des essences étudiées.	48
7	Caractéristiques physiques des H.Es puisées dans littérature	48
8	Propriétés chimiques d'essence étudiée.	52
9	Valeur de IC50 de DDPH et acide ascorbique et l'acide gallique.	54

LISTE DES PHOTOS

N°	Titre	Page
1	Montage pour l'hydrodistillation	32
2	Zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes gram (-) et Gram testés en fonction des déférents concentrations d'HEs.	56

Sommaire

Sommaire

Remerciments	
dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photos	
Sommaire	
Introduction	**1**
Première partie : synthèse bibliographique	
Chapitre I : Généralité sur les plantes médicinales et les huiles essentielles	
1. Les plantes médicinales	**3**
1.1. Métabolisme secondaire	**3**
1.2. Récolte et conservation des plantes	**4**
2. Les huiles essentielles	**6**
2.1. Répartition et localisation des huiles essentielles	**6**
2.2. Biosynthèse des huiles essentielles	**7**
2.2.1. Biosynthèse des terpènes	**7**
2.2.2. Biogénèse des monoterpènes	**8**
2 .2.2.2. Elaboration et sécrétion	**10**
2.3. Méthodes d'extraction des H.E	**13**
2.3.1. Hydrodistillation simple	**13**
2.3.2. Entrainement à la vapeur d'eau	**13**
2.3.3. Extraction par les solvants	**13**
2.4.Pouvoir antimicrobienne des huiles essentielles	**14**
2.5.Propriétés et mode d'action des huiles essentielles	**14**
2.6.Toxicité des huiles essentielles	**18**
2.7.Application des huiles essentielles	**18**
2.8.1. En industrie agroalimentaire	**18**
2.8.2. En parfumerie et cosmétique	**20**
2.5.3. En pharmacie	**21**

2.8.L'aromathérapie	21
2.9.Contrôle de qualité des huiles essentielles	21
2.10. Activité antioxydante des huiles essentielles	21
Chapitre II : La plante étudiée	
1. Généralités sur les Lamiacées	24
1.1.Présentation du genre Mentha	24
1.2.Classification de *Mentha aquatica*	25
1.3.Description botanique de la menthe	25
1.3.1. La composition biochimique	26
1.3.2. La répartition géographique	26
1.3.3. Utilisation médicale Espèce *Mentha aquatica* L.	27
Deuxième partie : partie expérimental	
Chapitre I : Méthodologie de travail	
I. Matériels et méthode	30
I.1. Cadre d'étude.	30
I. 2. Matériel d'étude	31
I.3. Matériel végétal	31
1.3.1. Provenance du matériel végétal	31
1.3.2. Parties utilisées	31
I.4. Matériels de laboratoire	31
I.5. Méthodes	32
I.5.1. Extraction	32
I.5.1.1. Procédés d'extraction et conservation de l'huile essentiels	32
I.6. Détermination des indices physico -chimiques des H.E s extradites	33
I.6.1. Propriétés physiques	33
I.6.2. Propriétés chimiques	37
I.7. Activités biologiques	37
I.7.1. Activité antioxydante	37
I.7.1. 1. Calcul des IC_{50}	39
I.7.2. Activité antibactérienne	39
Chapitre II :Résultats et discussion	
II.1. Rendement d'extraction	46

II.2. Caractéristiques organoleptiques	**46**
II.3. Détermination des indices physico -chimiques des HE s extraites	**47**
II.3.1. Propriétés physiques	**47**
II.3.2. Propriétés chimiques	**48**
II.4. Activités biologiques	**50**
Conclusion	**52**
Références bibiliographiques	**54**
ANNEXES	

INTRODUCTION

Introduction générale

Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant de nombreux siècles, Seulement un peu d'espèces de plantes ont été étudiées pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent **(Heide, 1991).**

Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne surtout avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Cette source semble inépuisable puisque seuls près de 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans chimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents **(Hostettmann *et al,* 1998).**

C'est dans le cadre d'une valorisation des matières végétales en vue des utilisations thérapeutiques que l'étude des trois espèces de la famille des Lamiaceae est présentée ici.Une large variété de produits naturels caractérise les espèces de cette famille, les plus rencontrés sont les flavonoïdes, iridoïdes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes. Les espèces de la famille des Lamiaceae sont connues pour leurs utilisations en médecine traditionnelle à cause de leurs diverses activités comme : anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, cardioactive, antifongique, antituberculoses, antitumorale et antioxidante **(Fraga *et al,* 2005).**

Ainsi que le potentiel anticholinestérase, grâce à leurs compositions riches en terpénoïdes, polyphénols et flavonoïdes rapportés comme médicaments potentiels dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. En plus, de nombreux composés naturels, peuvent aider à piéger les radicaux libres générés lors de l'initiation et la progression de la maladie d'Alzheimer **(TopçuetKusman, 2014).**

Le domaine d'application des huiles essentielles sont diversifiés malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse ; c'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications dans l'industrie chimique et dans le domaine de l'agroalimentaire (condiments, épices, aromatisants,...) et l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie) **(Petitjean, 1974).**

Le présent travail consiste à effectuer : L'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires de la plante *Mentha aquatica* ainsi que les activités biologiques de la plante : *Mentha aquatica L*.de la famille des *Lamiaceae.*

De nombreuses études ont montré que l'huile essentielle de *Mentha aquatica* a plusieurs utilisation dans le traitement, cosmétique alimentaire et autres et pour cela, nous voulions confirmer cela, donc

- est-ce que les caractères physico-chimiques de huile essentielle de *Mentha aquatica* L permettent-elle utilisé dans les domaines mentionnés si- dessue? et si valeur du rendement correspond aux résultat des études précédant ?

-est –ce que cette huile affecte la croissance des souches bactériennes ? et inhibe les radicaux libre ?

Le manuscrit comprend 2 parties : La première a été consacrée à données bibliographiques ¸ des Généralités sur les plantes médicinales et les huiles essentielles dans le chapitre I , comportant une présentation botanique et phytochimique de la famille des *Lamiaceae*, du genre Mentha.

La deuxième partie est divisée en deux parties : chapitre I rassemble le matériel et les méthodes utilisées dans nos travaux d'extraction de l'espèce *Mentha aquatica L*, des tests biologiques effectués sur les espèces Mentha, chapitre II comprend les résultats et discussion des résultats de l'étude phytochimique de la plante *Mentha aquatica* et en fin on termine par une conclusion générale.

Première partie: synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales et les huiles essentielles

1. Plantes médicinales

Depuis très longtemps, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité ; Il ya environ 500 000 plantes sur terre dont 10 000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales **(Iserin, 2001).**

Selon la réglementation française et d'après la circulaire n°346 du 2 juillet 1979 du code de la santé publique : Un plante médicinale est " une plante présentant des propriétés médicamenteuses, sans avoir ni ne pouvant avoir aucune utilisation alimentaire, condimentaire et hygiénique ; pour les plantes présentant des propriétés autres que des propriétés médicamenteuses, elles sont considérées comme des plantes aromatiques condimentaires **(Veuillot, 2000).**

1.1. Métabolisme secondaire

Depuis toujours les plantes ont constitué une source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire : Parmi les milliers de molécules produites par ce métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes et de corriger ses troubles métaboliques **(Fouché *et al.,* 2000).**

La vie sur terre dépend du monde végétal. C'est par la transformation énergétique qui se réalise dans les grains (chloroplastes) des cellules chlorophylliennes des plantes vertes opérant comme de véritables laboratoires biochimiques qu'est apparu l'oxygène, et donc la vie sur terre, plaçant l'humanité sous la dépendance du monde végétal. En effet, la chlorophylle, pigment vert des plantes, aide à capter l'énergie solaire. Cette réaction appelée photosynthèse, produit des substances complexes et nutritives (amidon, protéines, voir graisses) à partir de corps très simples et incombustibles (eau, gaz carbonique de l'air, nitrates). A partir du glucose produit dans les feuilles, la plante peut synthétiser d'autres molécules appelées métabolites secondaires et notamment, parmi les 10 000 recensées à ce jour, des lipides (graisses) des huiles essentielles, des glucosides, des tanins, des vitamines, et d'autres composants actifs comme les alcaloïdes, les terpènes, les saponines…etc. Certains de ces molécules ont été synthétisés comme un élément de défense de la plante, pour l'aider à lutter contre certaines bactéries et champignons **(Lucienne, 2010).**

-On peut classer les métabolites secondaires en différents groupes :

- Les composés phénoliques : avec un groupe hydroxyle sur un cycle aromatique. Ils interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). On a, par exemple, la lignine, les flavonoïdes, les phényl propanoïdes et les anthocyanes.

- Les composés azotés: Ils comprennent les alcaloïdes et les glycosides (qui larguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées). Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On a, par exemple, la nicotine, l'atropine, la codéine et la lupinine.

- ✓ les terpènes.
- ✓ les poly-isoprène **(Lamarti *et al.,* 1994).**

Les composés aromatiques peuvent être classés en fonction de la longueur de la chaine aliphatique liée au noyau benzénique. On distinguera :

- ✓ Les dérivés en C6 - C1 et C6-C2.
- ✓ Les dérivés en C6-C3 (phénylpropanoides).
- ✓ Les dérivés en C6 - C1 (ou C2, C3) – C6 ou dérivés « mixte ».

Les tanins, composés provenant de la polymérisation de dérivés aromatiques et les quinones **(Guignard *et al.,* 1985).**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par **Wallach** dès 1887 **(Lamarti *et al.,* 1994).**

1.2. Récolte et conservation des plantes

Les propriétés pharmacologiques des plantes médicinales dépendent essentiellement de la région de production, de la période de récolte, des techniques de cueillette et des modalités de conservation (Tableau 01). La connaissance de ces conditions doit toujours être présenté à l'esprit afin de garantir la qualité des produits et de protéger leur source de production. Par contre la négligence de ces données a

contribué, pour beaucoup à faire tomber les plantes à plusieurs reprises, dans le discrédit **(Valnet, 2001. In : Haddouchi, 2007).**

Tableau 01 : Récolte, séchage et conservation des plantes **(Valnet, 2001. In : Haddouchi, 2006).**

Partie de la plante	Cueillette	Séchage	Conservation
Racines		**A l'air sec**	**A l'abri de l'humidité**
Racines charnues		**A l'étuve**	
Racines mucilagineuses		**Au four**	
Racines vivaces	**Au printemps**		
	En automne		
Ecorce des plantes annuelles et bisannuelles	**Quand il a acquis une certaine épaisseur et se sépare facilement du Corps**	**Au soleil ou à l'étuve**	
Ecorce d'arbre	**En hiver**		
Ecorce d'arbrisseau	**En automne**		
Ecorce de résineux	**En printemps**		
Bois			
Fleurs	**Au début de leur épanouissement Les fleurs de rose se cueillent en Boutons**	**Au soleil ou à l'étuve**	
Feuilles	**Avant la floraison**		
Semences	**Quand la plante se dessèche**		
Tiges	**En même temps que les feuilles**	**A l'ombre et à atmosphère sèche Feuilles**	
Feuilles épaisses			
Bourgeons	**Au début du printemps**		
Fruits	**Un peu avant complète maturité**		

2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (H.E), Les molécules actives impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices des huiles essentielles **(Guinoiseau, 2010)**.

Pour la huitième édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences=huiles volatiles) sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation » **(Bruneton, 1999).**

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie. Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine trapénoïde et possédant un noyau aromatique **(Iserin, 2001 et Guinoiseau, 2010).**

2.1. Répartition et localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs qui sont répartis dans un nombre limité de familles. Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs bien sur (bergamotier, tubéreuse…) mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier…) et, bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal…), des racines (vétier), des rhizomes (curcuma, gingembre…), des fruits (tout épices, anis, badiane…), des grains (muscade…). La composition de ces huiles essentielles peut varier selon leur localisation **(Bruneton, 1999).**

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associes à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou a proximité de la surface de la plante :

-Cellules à huiles essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae,

-Poiles sécréteurs des Lamiaceae,

-Poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae,

-Canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae **(Bruneton, 1999).**

2.2. Biosynthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles produits du métabolisme secondaire des plantes, se compose généralement de :

1. Les métaux volatils synthétisés via le précurseur isopentenyl pyrophosphate **(IPP)**, consistent en des mélanges complexes se composants des mono-sesquiterpènes hydrocarboneset des matériaux oxygénés dérivé d'eux.
2. Phényl propanoides de la voie acide shikimique, et leurs produits de biotransformation **(Hatanaka *et al.*, 1987).**

2.2.1. Biosynthèse des terpènes

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal (figure 01). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leursquelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C_5H_8) reconnue par Wallach en1953. Cet isqoprène (I) est la base du concept de la « règle isoprénique » énoncée en 1953 par Ruzika. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényl (II), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique **(Hazzit , 2009).**

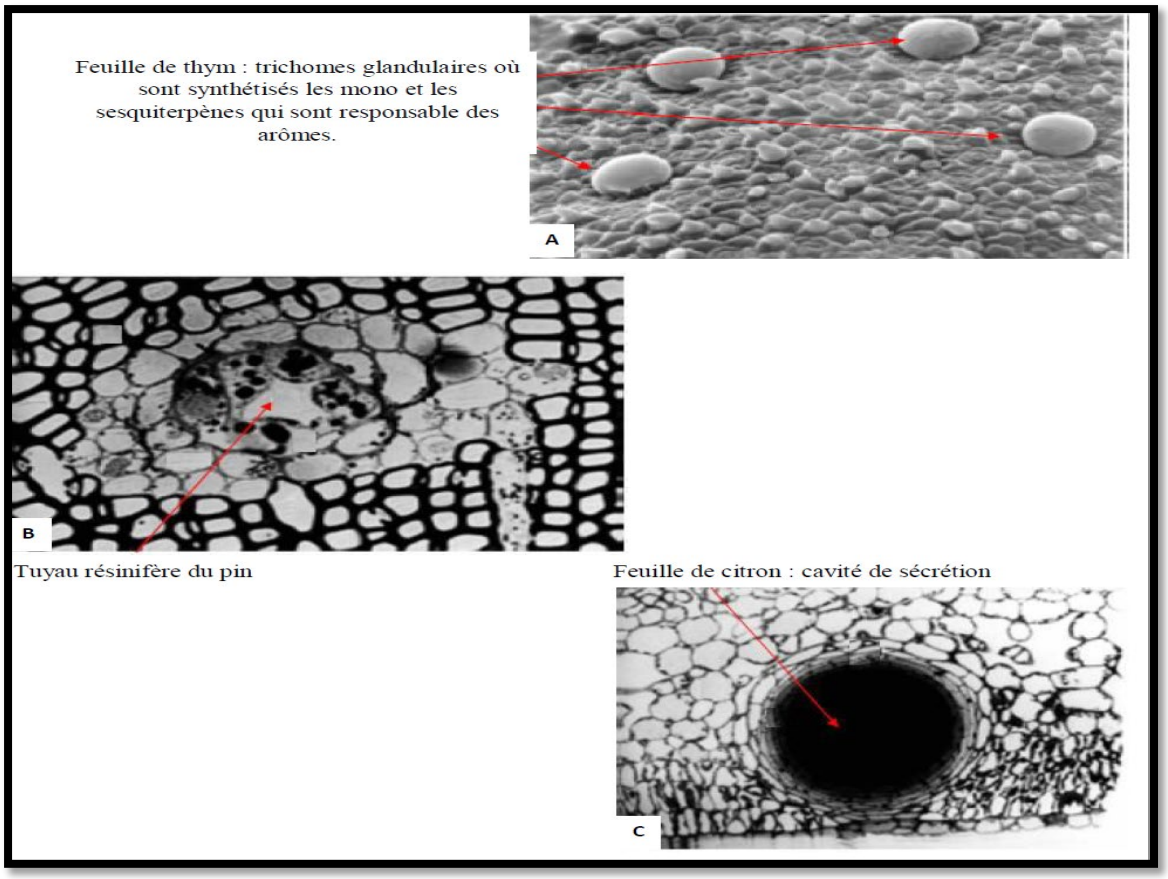


Figure 01 : (a.b.c) Biosynthèse des terpènes. **(Gleizes, 1983)**

2.2.2. Biogénèse des monoterpènes

2.2.2.1. Site de biosynthèse

Les leucoplastes jouent un rôle primordial dans la biosynthèse des monoterpènes, selon un processus intense et bref (Figure 02).

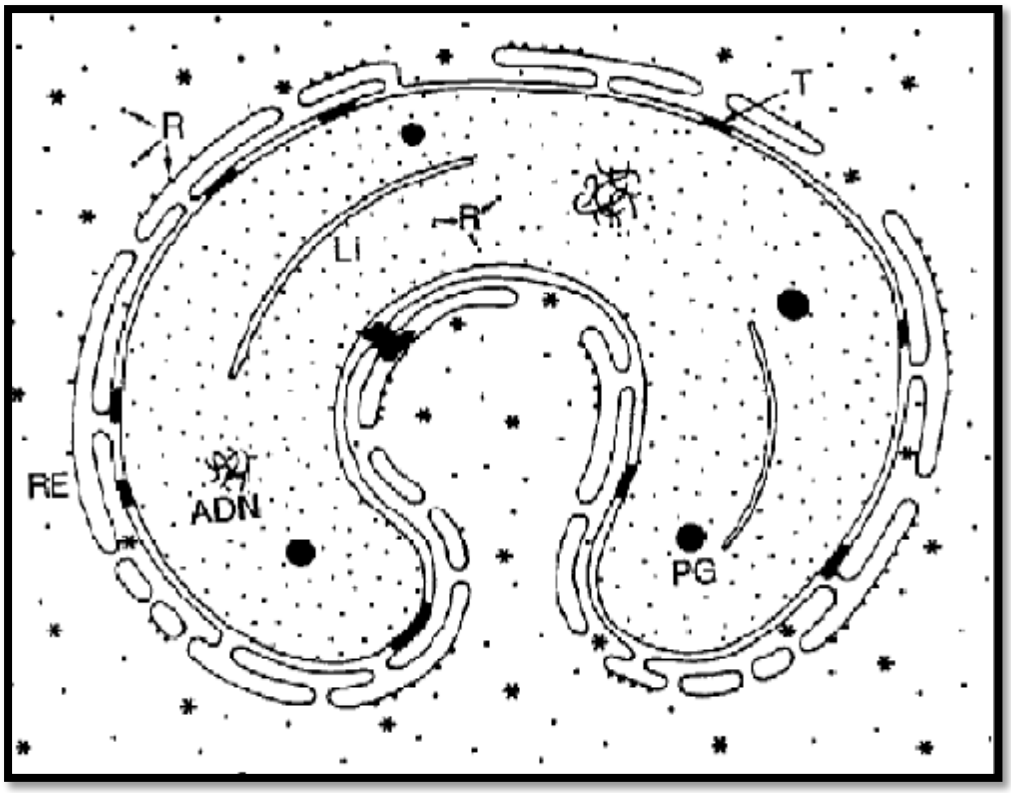


Figure 02 : Structure schématique du leucoplaste sécréteur (Carde, 1979).

ADN : fibrilles d'acide désoxyribonucléique

PG : platoglobules

R : ribosomes

RE : réticulum endoplasmique

T : terpène

Li : lamelle interne

Le transport et l'accumulation de ces composés seraient assurés par le réticulum endoplasmique. Des structures d'association de type membranaire se mettent en place entre les leucoplastes et le réticulum endoplasmique. Les cellules sécrétrices vivantes mais inactives peuvent retrouver leur potentialité de synthèse terpénique après une blessure **(Lamarti *et al.*, 1994).**

2.2.2.2. Élaboration et sécrétion

L'IPP est l'intermédiaire clé dans la formation des composés terpéniques. La première étape de la formation des diphosphates des prényles est l'isomérisation de l'IPP en diphosphate de diméthylallile (DMAPP). Cette réaction est catalysée par une enzyme hydrosoluble, l'isopentényl diphosphate isomérase **(Lamarti *et al.,* 1994) (Dudariva *et al.,* 2005).**

La biosynthèse des terpènoides implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le géranyl diphosphate (GPP, C 10), condensé avec une autre unité IPP forme le diphosphate de farnesyl (FPP, C15) à l'origine des sesquiterpènes. Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, l'hydratation, la conjugaison et/ou d'autres transformations donnent une variété de terpènoides **(Dubey *et al.,* 2003).**

Le diphosphate d'isopentényle (IPP), élaboré dans le cytoplasme, pénètre par un mécanisme encore inconnu dans le leucoplaste, où il subit dans le stroma l'isomérisation en diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). MVA : acide mévalonique ; PT : prényl transférases (figure 03) **(Dagan, 1988).**

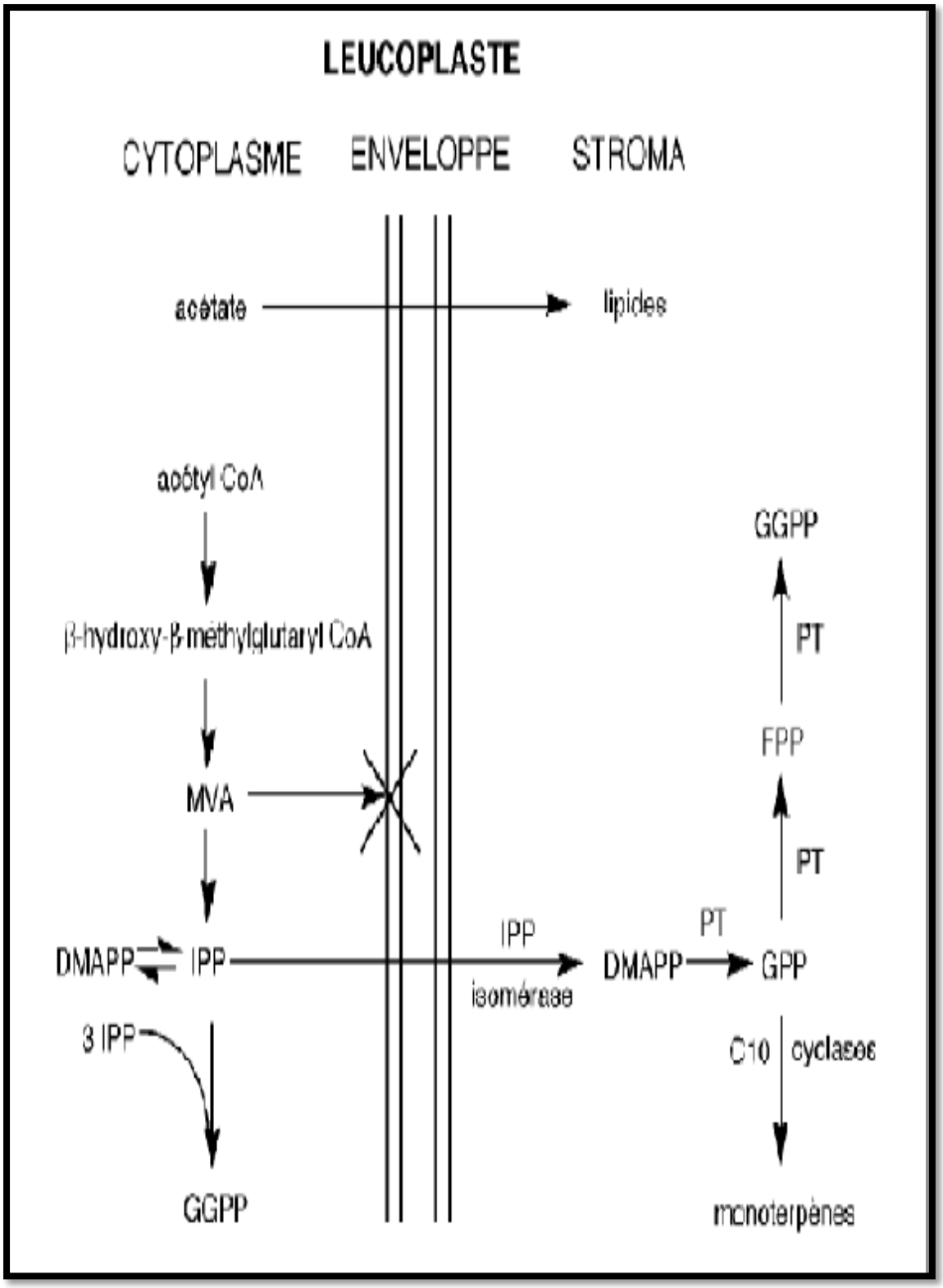


Figure 03 : Compartimentation de la biosynthèse des monoterpènes dans les cellules sécrétrices **(Dagan, 1988).**

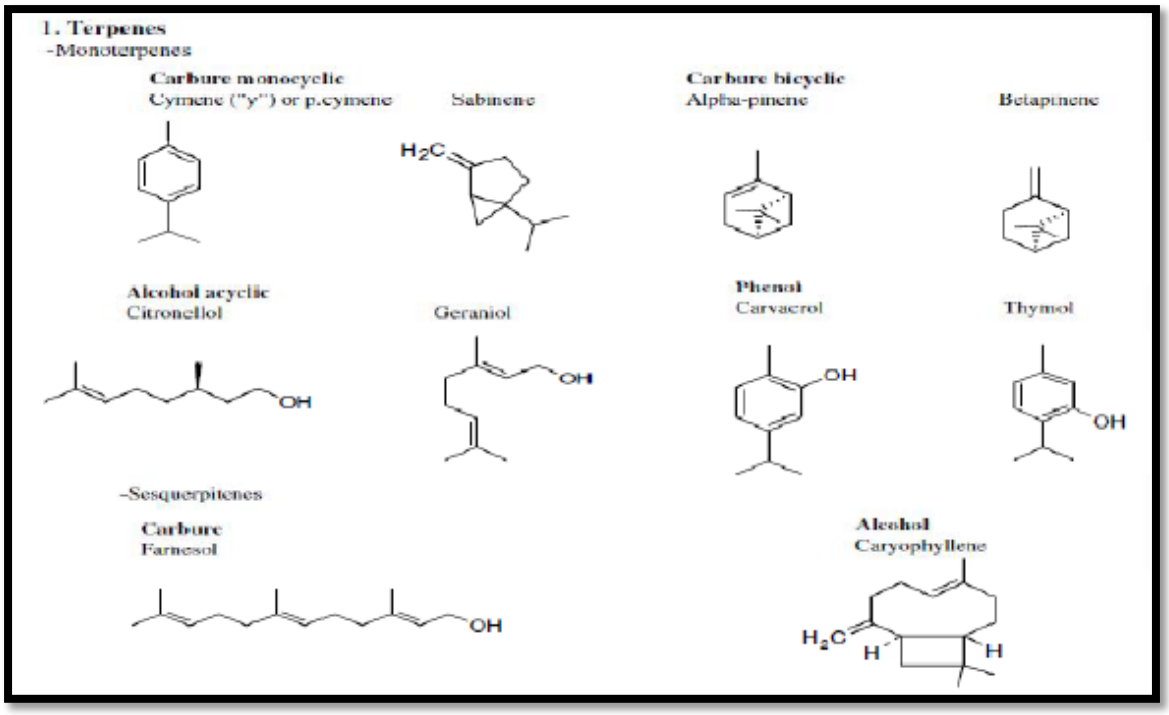


Figure 04 : Structure chimique des composés seléctionés (les tèrpènes) des huiles essentielles. **(Bakkali *et al.*, 2008) (Calsamiglia *et al.*, 2007)**

(Khenaka , 2011).

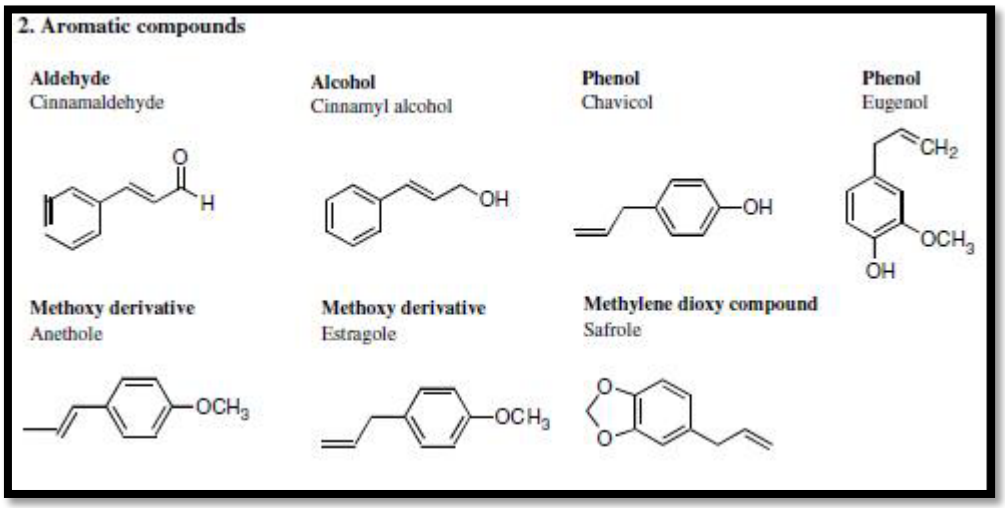


Figure 05 : Structure chimique des composés seléctionnés (les composés aromatiques) des huiles essentielles **(Bakkali *et al.*, 2008) (Calsamiglia *et al.*, 2007)**

(Kaloustian, 2008)

2.4. Méthodes d'extraction des HE

2.4.1. Hydrodistillation simple

La plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurssont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité **(Benayad, 2008).**

2.4.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter.

De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ».

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile **(Lucchesi, 2005).**

2.4.3. Extraction par les solvants

L'extraction par les solvants est précédée d'une division de la plante. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économique .les solvants les plus utilisés, sous, réserve de législation restrictives particulières, sont les hydrocarbures aliphatiques : éther de pétrole, hexane mais aussi propane ou butane liquides. On a également recoures aux solvants hologènés et l'éthanol.

Après l'extraction, le solvant est distillé .en fin d'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci **(Bruneton, 1999).**

2.5. Pouvoir antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont un spectre d'action biocide très large puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries **(De Billerbeck *et al.*, 2002).**

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets: une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides. Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans les cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'huile essentielle d'arbre à thé (tea tree). Cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides **(Zhiri, 2006).**

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques **(Zhiri, 2006).**

2.6. Propriétés et mode d'action des huiles essentielles

D'après **Willem (2002),** les molécules aromatiques se manifestent à différents niveaux ; en schématisant, on peut dire que les huiles essentielles ont une action directe et indirecte.

2.6.1. Une action directe

• sur un métabolisme (foie, reins…),

• sur les micro-organismes pathogènes,

• sur une fonction physiologique particulière (thyroïde, pancréas…),

• sur la régulation hormonale (plantes cortisone-like et folliculine-like),

• sur la stimulation des catalyses enzymatiques,

• sur la fonction émonctorielle de certains organes.

Cette action directe s'exerce dans trois domaines spécifiques :

-Pouvoir antiseptique *:* les huiles essentielles sont antibactériennes, antivirales, antiparasitaires:

a- Antibactérienne

Selon Benayad (2008), les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficientantibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc. **(Guinoiseau, 2010)**

b- Antivirale

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques **(Benayad, 2008).**

c- Antifongique

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain **(Benayad, 2008) (Erturk, 2006).**

d- Antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites **(Benayad, 2008).**

e- Antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes **(Benayad, 2008).**

-Pouvoir désintoxicant *:* un organisme malade est un organisme encrassé et affaibli, qui n'a pas pu résister à une agression extérieure.

Toutes les thérapeutiques naturelles favorisent la dissolution et l'élimination des déchets du métabolisme qui s'accumulent dans le corps. Cette élimination s'effectue par l'un des grands « émonctoires » – circuits d'élimination – du corps :les poumons, les reins, les intestins, la peau, le carrefour ORL.

-Action sur les différents métabolismes : foie, pancréas, thyroïde, génital**…**etc**. (Guinoiseau, 2010).**

2.6.2. Une action indirecte

Par une approche scientifique du terrain biologique. Elles agissent en intervenant sur les processus biologiques et par modification du terrain local et général grâce à leur activité énergétique. Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires **(Burt, 2004 et Guinoiseau, 2010).**

Les huiles essentielles comprennent un grand nombre de composants et il est probable que leur mode d'action implique plusieurs cibles dans la cellule bactérienne. L'hydrophobie des huiles essentielles leur permet de partition dans les lipides de la membrane cellulaire et les mitochondries, les rendant perméable et conduisant à des fuites du contenu des cellules. Les conditions physiques qui améliorent l'action des huiles essentielles sont à faible pH, basse température et faible teneur en oxygène. La synergie a été observée entre le carvacrol et de son précurseur le p-cymène et entre cinnamaldéhyde et l'eugénol. Effets indésirables organoleptiques peuvent être limités par une sélection rigoureuse des huiles essentielles en fonction du type de nourriture (Figure 06) **(Burt, 2004).**

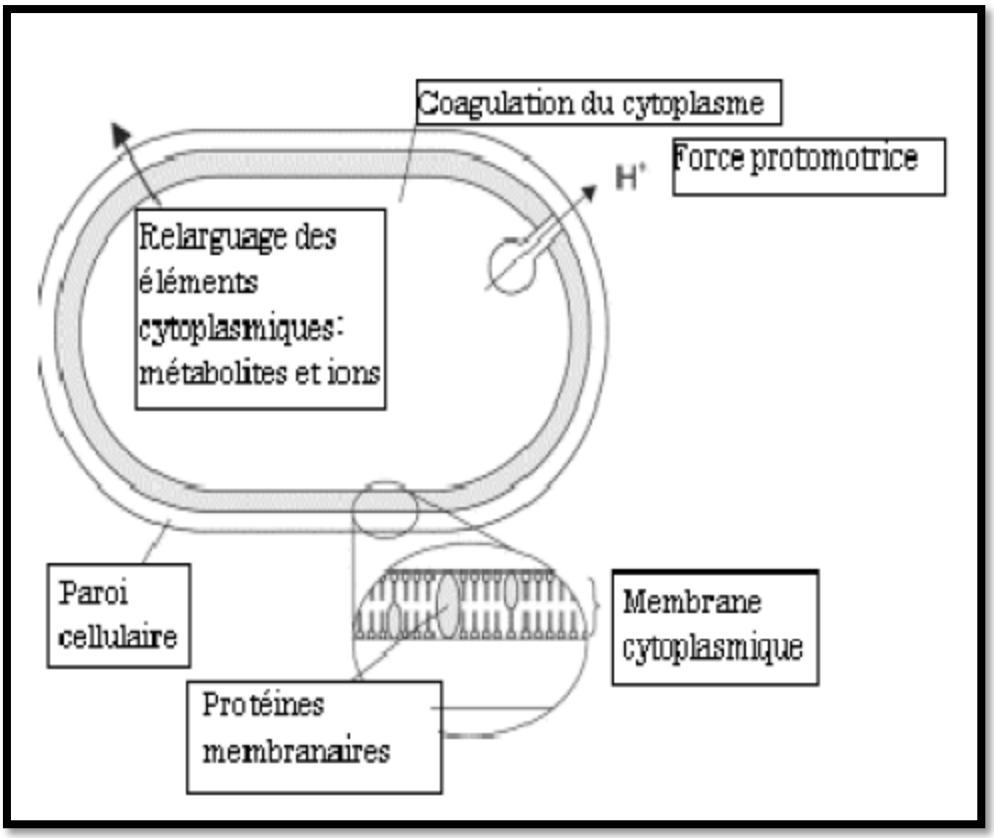


Figure 06 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne **(Burt, 2004)**

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action 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 **(Caillet et Lacroix, 2007).**

2.7. Toxicité des huiles essentielles

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise. Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées **(Degryse *et al.,* 2008).**

Selon **Englebin** (2011), les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, c'est la puissance concentrée de la plante aromatique, il ne faux donc jamais exagérer les doses, quelque soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée. Paracelse à dit : « Rien n'est poison, tout est poison, tout dépend de la dose » Il faut également savoir qu'une période trop prolongée provoque l'inversion des effets et/ou l'apparition d'effets secondaires indésirables **(Degryse *et al.,* 2008).**

2.8. Applications des huiles essentielles

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues **(Amarti *et al.,* 2010).** Leurs champs d'application s'articulent sur trois secteurs (Tableau 02) à savoir :

2.8.1. En industrie agro-alimentaire

Les études faites à travers le monde, montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments. Ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts…); les huiles essentielles à base de cavarcrol ou de citral pour les poissons; les huiles essentielles de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz); et les huiles essentielles à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde, pour les fruits. Toutefois, quelques limites existent à l'utilisation des huiles essentielles comme agents de conservation dans les aliments,

notamment le pouvoir aromatisant de certaines d'entre elles. Cependant des techniques de désaromatisation existent et sont de plus en plus efficaces **(Caillet et Lacroix, 2007).**

Tableau 02 : Exemples de la diversité des applications des huiles essentielles **(Grysole, 2005).**

Huiles essentielles	**Parfumerie**		**Alimentation**	**Médecine**
	Cosmétiques	Technique		
Basilic	Parfum		Arôme pour sauces et condiments	Antispasmodique régulateur du système
Citronnelle		Arôme pour savons, désinfectant, éloigne les insectes	Arôme pour boissons et sucreries	
Eucalyptus			Arôme pour boissons, sucreries, crèmes glacées	anti-inflammatoire
Géranium	Parfum		Arôme pour sucreries, chewing-gum	Anti-spasmodique, relaxant
Lemongrass				Vasodilatateur, sédatif
menthe poivrée		Saveur pour dentifrice	Saveur pour liqueurs, glaces, chewing-gum, chocolat	Antalgique, anesthésique, tonique, stimulant du système nerveux
menthe verte			Saveur pour boissons, sucreries, crèmes glacées	Saveur pour les sirops par exemple

D'autre part, les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les concentrations d'huiles utilisées

sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment. Un autre aspect à prendre en compte, c'est de vérifier que l'huile essentielle sélectionnée n'a pas d'effet antimicrobien contre les bactéries utiles, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation et d'affinage, indispensables à la fabrication des produits. Moyennant ces précautions d'usage, l'emploi des huiles essentielles lors de la transformation des aliments peut présenter un triple intérêt: aromatisant, antioxydant et antimicrobien **(Caillet et Lacroix, 2007).**

Certaines huiles essentielles sont également actives sur des champignons responsables de mycoses et sur des levures (candida). Les substances actives sont en générale faibles et celle qui sont déterminées par une expérimentations in vitro sont directement transposables pour une utilisation par voie externe ou, a fortiori, comme conservateur. Sarriette, cannelle, thym, girofle, lavande, eucalyptus sont au nombre des huiles essentielles les plus antiseptiques. Des composés comme le citral, géraniol, le linalol ou le thymol sont respectivement 5, 2, 7,1, 5 et 20 fois plus antiseptiques que le phénol **(Bruneton, 1999).**

2.8.2. En parfumerie et cosmétique

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. Toujours d'actualité, cet usage a cours particulièrement en Europe et aux États-Unis. Ces régions ont d'ailleurs développé des industries importantes qui se démarquent par leur haut niveau d'exportations dans ce domaine **(Grysole, 2005).**

2.8.3. En pharmacie

Dans leur grande majorité, elles sont utilisées en nature, en particulier pour la préparation d'infusions (menthe, mélisse, verveine, fleurs d'orange, etc.) et sous la forme de préparations galéniques simples. Elles sont également utilisées pour l'obtention d'huiles essentielles dont un petit nombre peut avoir un intérêt médicamenteux (en particulier dans le domaine des antiseptiques externes) mais qui, majoritairement, sont surtout destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale. Les huiles essentielles constituent également le support d'une thérapeutique particulière : l'aromathérapie **(Bruneton, 1999).**

2.9. L'aromathérapie

L'aromathérapie, qui signifie littéralement « soin par les odeurs » est le terme que l'on utilise pour désigner la thérapie basée sur l'utilisation des huiles essentielles. Il s'agit donc de la capacité et de l'art de soigner avec les huiles essentielles **(Buronzo, 2008).** L'aromathérapie est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques. C'est une "biochimio-thérapie" naturelle sophistiquée qui repose sur la relation existant entre les composants chimiques des huiles essentielles et les activités thérapeutiques qui en découlent. Elle recourt à une méthodologie rigoureuse qui s'inspire de données scientifiques solides confirmées tant par la clinique que par le laboratoire. C'est une thérapeutique naturelle de qualité supérieure **(Baudoux, 2008).**

2.10. Contrôle de qualité des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants. La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés **(Pibiri, 2006).**

Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement« végétale », contrairement aux essences synthétiques ou « identiques naturelles »intégralement reconstituées à partir de composés chimiques de synthèse **(Pibiri, 2006).**

2.11. Activité antioxydante des huiles essentielles

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation **(Bouhdid *et al.*, 2006).**

Des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire. Les huiles essentielles et leurs composants sont connus pour posséder des activités antioxydantes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire, ou approuvés comme additifs alimentaires **(Caillet et Lacroix, 2007).**

Chapitre II : La plante étudiée

1. Généralités sur les Lamiacées

La famille des Lamiaceae (labiées) du Latin (Labia) lèvre signifiant que les fleurs ont une forme caractéristique à deux lèvres **(Couplan, 2000),** comprend environs 6970 espèces réparties en 240 genres (**Meyer *et al.,* 2004)**. Cette famille est l'une des premières à être distinguées par les botanistes **(Pistrick, 2002)** et ceci par la particularité de ses caractères. Ce sont généralement des plantes herbacées odorantes, à tiges quadrangulaires, feuilles en général, opposées sans stipules. Le plus souvent hermaphrodites, les fleurs pentamères **(Meyer *et al.,* 2004)** sont généralement réunies en cymes axillaires plus ou moins contractées simulant souvent des verticilles, ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis fruit constitué par 4 akènes plus ou moins soudés par leur face interne **(Messaili, 1995).** Cette famille est donc caractérisée par :

- une corolle gamopétale irrégulière à deux lèvres, la supérieure formée de deux pétales, l'inferieure de trois.
- quatre étamines dont deux plus longues.
- ovaire de deux carpelles recoupés par une cloison et comprenant ainsi quatre loges à une graine chacun (tétrachaine).
- des feuilles opposées, souvent, une tige de section carrée.

Ces caractères varient selon les genres : corolle presque régulière (*Mentha*) ou unilabiée (*Teucrium*); deux étamines **(*Salvia*) (Quezel et Santa, 1963 ; Ozenda 1977)**. Elles sont surtout des plantes méditerranéennes **(Carrubba *et al.,* 2006**), qui ne se rencontrent guère que dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, sauf les trois espèces *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptiaca* et *Teucrium polium* qui sont plus largement répandues **(Ozenda, 1977)**. La famille des Lamiaceae est très importante dans la flore algérienne, mais certains genres sont de détermination délicate en raison de *la* variabilité extrême des espèces **(Quezel et Santa, 1963)**

1.1.Présentation du genre Mentha

Le genre Mentha appartient à la famille *Lamiaceae* (labiées) qui comporte environ 200 genres et **6000 espèces** distribuée dans les régions tempérées dans le monde entier **(Govaerts, 2012).**

Les plantes qui la composent se rencontrent abondamment dans les régions tropicales et subtropicales **(Quezel et Santa, 1962).**

Les Menthes, du nom latin Mentha, font partie des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des Lamiacées ou Labiacées, formée de prêt de 3500espèces réparties sur 8 sous-familles **(Baser *et al.,* 1997; Guido *et al.,* 1997).**

Près de la moitié (47 %) des Lamiaceaesont regroupées dans la sous-famille des Nepetoideae. Au sein de la sous-famille des Nepetoideae, le genre Mentha est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate **(Tucker, 2007).**

Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans les utilisations thérapeutiques. Elles fortifient tout le système des nerfs, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible **(Moussaoui *et al.,* 2016).** On en connaît environ 20 espèces, dont les plus répandu sont la *menthe aquatique*, qui a pour nom scientifique *Menthaaquatica*, la *menthe poivrée*, *Mentha piperita*, et la *menthe verte*, *Mentha spicata* **(Bouziane, 2017).**

1.2. Classification de *Mentha aquatica*

La classification de genre *Mentha aquatica L* est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Classification classique de l'espèce *Mentha aquatica L*. **(Bouziane, 2017)**

Rang taxonomique	**Nomenclature**
Règne	**Plantae**
Division	**Magnoliophyta**
Classe	**Magnoliopsida**
Ordre	**Lamiales**
Famille	**Lamiaceae**
Genre	**Mentha**
Espèce	***Mentha aquatica***

1.2.1. Description botanique de la menthe

Mentha aquatica L., plus connue sous le nom *menthe aquatique* est une Plante vivace de 30-80 cm, verte ou rougeâtre, velue-hérissée ou presque glabre, à odeur forte mais agréable ; tiges dressées ou ascendantes **(Tucker, 2007).**

Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un trèsbeau vert et se teignent de nuances rougeâtres au

soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sontrecouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes **(Benayad, 2008 ; Bouziane, 2017)**

Les fleurs, violacées, forment des épines très courtes, à l'extrémité des rameaux. Lefruit, divise en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquant et rafraichissante **(Bouziane, 2017 ; Bray, 2005).**

Figure 07 : Espèce *Mentha aquatica* **(Mozaffariane, 1996)**

1.3. Composition biochimique

L'huile essentielle de la menthe riche surtout en -L-carvon (teneur entre 40 à 80%), L'acétate de dihydrocuminyle (10 à 12%, ces deux constituants majeurs étant responsables de l'odeur de la plante) et le limonène (5 à 15%) ; ils sont accompagnés de dihydrocarvone, dédihydrocavol d'acétate de carvyle et de a-caryophyllée. Dans d'autres races chimiques, la carvone est accompagnée de 1,8 cineol (jusqu'à 2%) depulégone (jusqu'à 50%) ou de terpineol-4 (jusqu'a18%). **(Mozaffariane, 1996), (Deschamps *et al.,* 2008 ; McKay et Blumberg, 2006).**

1.4. Répartition géographique

La plupart des menthes sont originaires de l'Europe, de l'Asie et de l'Afrique du Nord. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents **(Tucker, 2007).**

Figure 08 : Répartition géographique M. aquatica **(Tucker, 2007).**

1.4.1. Utilisation médicale Espèce *Mentha aquatica*

La menthe est l'une des plantes médicinales les plus célèbres. Elle aurait des vertus digestives, spasmolytiques, carminatives, antiseptiques, toniques et stimulantes. Elle participerait à l'équilibre digestif et améliorerait le tonus général.La menthe poivrée est la plus utilisée en phytothérapie, pour ses propriétés, connues de la tradition et étudiées scientifiquement.*M. aquatica L.* : Au sud d'Afrique, les feuilles séchées de *M. aquatica* avec Tagetes minuta sont brulées, la fumées inhalée prescrit pour le traitements des maladies mentales par le peuple de Venda **(Arnold *et al.,* 1984).** Cette plante est utilisée aussi en médecine traditionnelle au sud d'Afrique pour le traitement des rhumes, des problèmes respiratoires ainsi que pour la protection contre les mauvais esprits **(Pooley, 2005).**

Deuxième partie : partie expérimentale

Chapitre I : Méthodologie de travail

I. Matériels et méthode

I.1. Cadre d'étude

L'intérêt porté aux plantes spontanées à caractère médicinales comme source naturelle de nombreux principes actifs ¸ a sensiblement augmenté au cours des 20 dernières années**.**

Ce travail s'oriente sur les caractéristiques biochimiques des huiles essentielles d'espèce *Mentha aquatica* dans la région d'El-oued.

L'étude porte sur l'extraction des huiles essentielles de cette plante médicinale et étude de leurs activités biologiques : antioxydante en utilisant le réactif de DPPH et l'activité antibactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur disque.

En parallèle une caractérisation physicochimiques se fait en étudier leur densité, PH, indice d'acide (Ia), indice de réfraction et en calculant le rendement d'extraction de ces huiles essentielles a partir de taxon étudié (Figure 09).

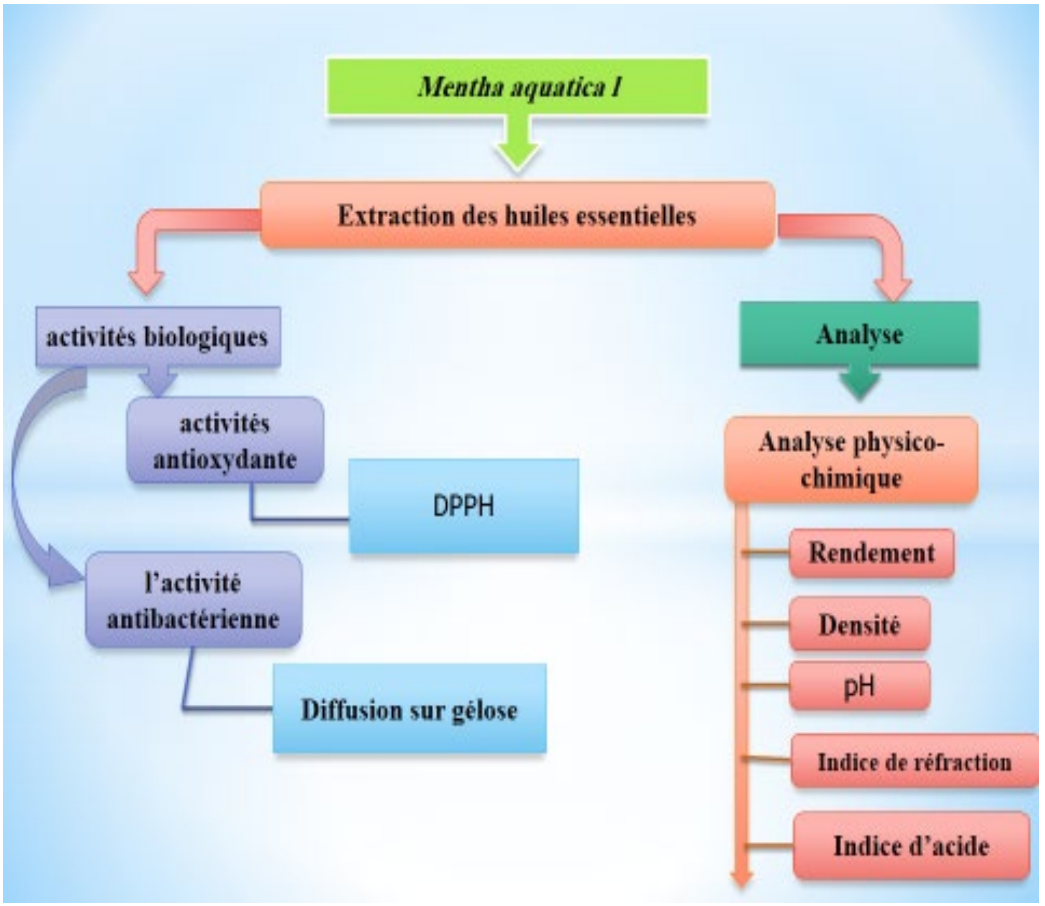


Figure 09: Plan générale de la partie experimentale.

I. 2. Matériel d'étude

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences de la Nature et de Vie Université Echahid Hamma Lakhdar d'El-Oued.

I.3. Matériel végétal

1.3.1. Provenance du matériel végétal

L'échantillon utilisé est d'origine commerciale (herboriste) ; qui provient d'El-Oued.

1.3.2. Parties utilisées

La partie utilisée est la partie aérienne de la plante séchée puis broyée.

I.4. Matériels de laboratoire

- **Appareillage etmatériels**

  - UVspectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU) ;
  - Cuves de plastique et deQuartz;
  - Étuve (Mommert, Beschickung-Loadig Model 100-800);
  - Clivenger Qol 220602;
  - Autoclave;
  - Balance analytique;
  - Verrerie : béchers, pipettes, ballons, éprouvettes graduées, tubes à essais, la pipette et micro pipette, entonnoir, erlenmeyers.

- **Les logiciels**

• Logiciel Microsoft office Excel 2007, pour le calcul des concentrations à partir des courbes d'étalonnage et pour la présentation des résultats ;

• Logiciel de minitape, pour la comparison entre les souches bactériennes.

- **Réactifs et produitschimiques**

Solvants et réactifs	Ethanol à 96 % ; Phénolphtaléine $C_2OH_{14}O_4$; Hydroxyde de potassium (KOH) ; Acidechlorhydrique (HCl) ;

	Tétrachlorure de carbone (CCl_4) ; Thiosulfate de sodium (NaS_2O_3) ;

- **Solutions standards utilisées**
  - Acide ascorbique $C_6H_8O_6$ (99%) Production par (ALFA AESAR) ;
  - 1,1-diphényl-di-picrylhydrazyl (DDPH) $C_{18}H_{12}N_5O_6$;

I.5. Méthodes

I.5.1. Extraction

I.5.1.1. Procédés d'extraction et conservation des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger **(Clevenger, 1928).** Cinq repetitions de distillation de 250g chacune de materiel vegetal séché (partie aérienne) avec 750 ml d'eau dans un ballon de 02 litres surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant ; la distillation a été réalisée par ébullition, pendant 03 heures après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent dans une burette graduée (photo 07).

Photo 1 : Montage pour l'hydrodistillation.

Après décantation, l'huile essentielle est récupérée par aspiration à l'aide d'une pipette-pasteur et est conservée dans des tubes en verre fermé hermétiquement à l'abri de la lumière et à une température entre 4 et 6°C. **(Avril, 1992)**

I.6. Détermination des indices physico -chimiques des H.Es extraites

I.6.1. Propriétés physiques

1 - Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétal à traiter (**Carré, 1953. In : Bekhchi, 2002).**

Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$Rd = m/m\,0 \times 100$$

Ou

$$Rd = m/\,m0 \times 100$$

Avec :

Rd (%) : Rendement en H.E exprimée en pourcentage ;

m : Masse en gramme de l'H.E ;

m_0 : Masse en gramme de la matière végétale sèche. **(Talbi¸ 2015)**

2- Détermination de pH

Le pH ou « potentiel hydrogène » mesure l' activité chimique des ions hydrogènes H + en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Cette méthode décrit l'acidité ionique du produit à analyser, son principe consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans le produit après le réglage de la température d'étalonnage. La lecture se fait directement sur le pH-mètre.Ainsi, les H.E extraites ont été caractérisées par leur pH. **(Talbi¸ 2015)**

3- Densité relative

La densité de l'H.E est déterminée par le rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température

Protocole expérimental:

La détermination de la densité des essences des plantes étudiées est réalisée à l'aide d'une seringue hamiltonienne d'une capacité de 1mL au lieu du pycnomètre. Le volume prélevé est de 0,20 ml pour chaque huile, ainsi que pour l'eau. La densité de chaque essence a été calculée à partir de la relation suivante:

$$\boldsymbol{d_{20} = m1 - m0 \div m - m0}$$

Dans laquelle:

m 1: Masse en g de la seringue contenant 0,20 ml d'essence.

m 0: Masse en g de la seringue vide.

m : Masse en g de la seringue contenant 0,20 ml d'eau. **(Takao et al., 1994 ; Licina et al., 2013).**

4- Indice de réfraction

L'indice de réfractionn_{λ}^{t}se définit comme étant le rapport entre le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré.Cet indice est mesuré à 20°C et rapporté à la raie D du sodium (λ = 589nm).Protocole expérimental : La mesure de l'indice de réfraction de nos HEs a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque Atagopolystat 5A.

Nous avons opéré comme suit:

- Etalonner l'appareil à l'aide d'une substance d'indice de réfraction connu à la température fixée à 20°C;
- Nettoyer les prismes et déposer quelques gouttes d'H.E entre les deux faces des prismes;
- Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule;
- Noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture. **(Talbi¸ 2015)**

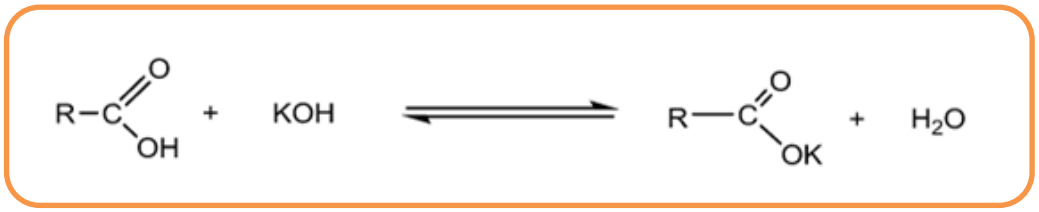
5- Miscibilité à l'éthanol

La miscibilité à l'éthanol est déterminée par le volume (V) d'alcool nécessaire pour former avec 0,5ml d'H.E un mélange homogène. V ml d'éthanol par fractions de 0,5 ml ont été ajoutés, à l'aide d'une burette, à 0,5ml d'H.E. Après chaque ajout, le mélange est agité. Quand la solution devient limpide, on note le volume d'éthanol additionné. Nous avons employé de l'éthanol absolu pour nos essences. **(Avril, 1992)**

I.6.2. Propriétés chimiques

1- Indice d'acide (Ia)

L'indice d'acide exprime le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g d'H.E. L'hydroxyde de potassium réagit avec l'acide selon la réaction suivante :



➢ *Protocole expérimental :*

1g d'H.E, 5ml d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine) sont mis dans un erlenmeyer. Ensuite, on titre par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,1N jusqu'à ce que la solution vire au rose. L'indice d'acide Ia est déterminé par la formule suivante :

$$I_{a=V \times C \times \frac{56.11}{M}}$$

V: Volume en mL de la solution de KOH utilisé pour le titrage.

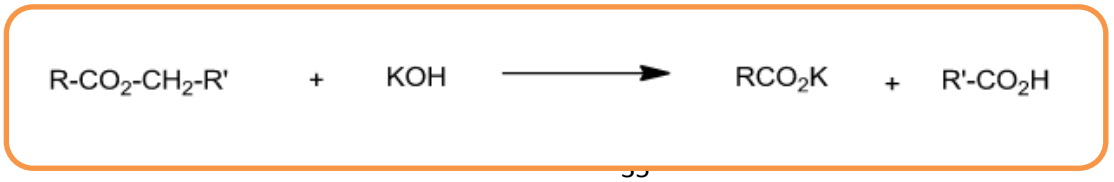
c : Concentration en mol. /L de la solution de KOH.

56,1 : (g/mol) masse molaire de KOH ;

m : Masse en g de la prise d'essai. **(Talbi¸ 2015)**

2- Indice d'ester(Ie)

L'indice d'ester est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique des esters contenus dans 1g d'H.E:



➢ *Protocole expérimental:*

On introduit dans un ballon de 100 ml, 1g d'H.E et 25ml d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques pierres ponce.

- L'ensemble est porté au reflux pendant 1h. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénolphtaléine.
- L'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,5N jusqu'à la disparition de la couleur rose.
- Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.
- L'indice d'ester (Ie) est calculé à l'aide de la relation suivante:

$$\text{Ie} = \frac{28.5}{m}(V0 - V1) - Ia$$

V0: Volume en ml de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour l'essai à blanc.

V1: Volume en ml de la solution d'HCl (0,1N) mesuré pour le calcul de Ie.

m : Masse en g de la prise d'essai.

Ia : Valeur d'indice d'acide. **(Takao et al., 1994 ; Licina et al., 2013).**

3- Indice d'iode(Ii)

L'indice d'iode est la quantité d'iode susceptible d'être fixée par 100g de substance, par la rupture de la double liaison. Les deux atomes d'iode se fixent sur les deux carbones voisins.

Protocole expérimental:

1g d'HE, 20ml de tétrachlorure de carbone (CCl_4) et 25ml d'une solution d'iode (1N) sont mis dans un erlenmeyer. Ensuite, le mélange est laissé à l'abri de la lumière pendant 2h. Au terme de cette durée, 20 ml d'une solution d'iodure de potassium (KI) à 50% et 20ml d'eau distillée sont ajoutés.

L'excès d'iode est titré par une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) 0,1 N, en présence d'empois d'amidon. **(Takao et al , 1994 ; Licina et al , 2013).**

I.7. Activités biologiques

I.7.1. Activité antioxydante

-Piégeage du radical libre DPPH

Pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits, nous avons retenu la method qui utilize le DPPH$^{\bullet}$ (diphénylpicryl-hydrazyl) comme un radical libre, selon le protocol décrit par (**Takao *et al.*, 1994 et Licina *et al.*, 2013).**

Pour cette évaluation, deux approaches sont appliqués : d'une part, la determination du pourcentage d'inhibition et d'une autre part la determination de la reduction relative du radical DPPH à un temps de reference ou la determination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH. **(Talbi¸ 2015)**

-Principe

Cette method est basée sur la réduction d'un radical libretrès stable : le2,2′-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) $^{\bullet}$en présence d'un antioxidant donneur. Ce dernier est réduit à la formed'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

La reduction du radical libre (DPPH) par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 515 nm provoquée par la presence d'un donneur d'hydrogène **(Buritet Bucar, 2000).**

Le DPPH est initialement violet, il se décolore lorsquel 'électron célibataire s' apparie (Figure10).

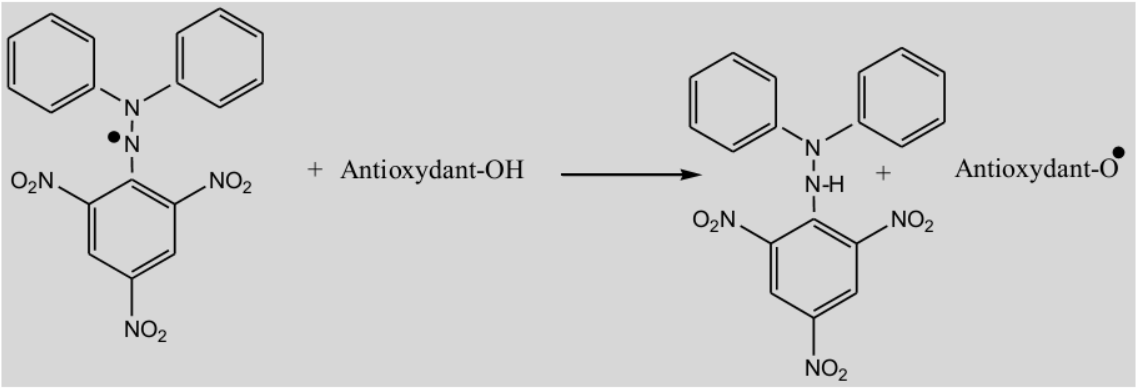


Figure10: Réduction du radical libre DPPH **(Talbi¸ 2015)**

La solution mere de l'extrait est prepare dans le methanol à une concentration de 200 mg/10ml. Des dilutions sont réalisées de façon à avoir des concentrations quivariententre1et 14mg/ml. 1ml de l'extrait en solution sont ajoutés à 2ml de DPPH. **(Talbi¸ 2015)**

Figure 11: Spectred'absorption du radical DPPH**(Lagunez, 2006)**

La lecture de l'absorbance est faite à 515 nm après 15mn d'incubation dans l'obscurité. Un blan cconstitué de 1ml de methanol et 2 ml de la solution de DPPH. La vitamine C (acide ascorbique) est utilisée comme control positif. La solution radicalaire de DPPH est prepare fraîchement.

L'activité est définie par l'indice de la reduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage ou l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) suivant cette relation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs Control} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Abs control : Absorbance du blanc (contenant tous les réactif sexceptéle compose d'essai). Abs échantillon : Absorbance du compose d'essai. Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les resultants sont souvent portés par rapport à un antioxidant de référence dans notre expérience c'est l'acide ascorbique (Vitamine C). **(Takao et al , 1994 ; Licina et al , 2013).**

I.7.1.1. Calcul des IC_{50}

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective EC_{50} ou IC_{50}. Ce parameter IC_{50} est define comme étant la concentration d'extrait nécessaire qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. L'IC_{50} est calculée graphiquement par la regression linéaire de graphe tracé; pourcentage d'inhibition en function de différentes concentrations des fractions testées **(Molyneux, 2004).**

I.7.2. Activité antibactérienne

A. Support bactérien

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles *Mentha aquatica* été évaluée sur 2 souches bactériennes. Ces souches sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Bacillus S* réalisée d'abord par la méthode du contact direct (méthode des disques), Les souches bactériennes apportée à institué de pasteur .

A.1. Principales caractéristiques des souches testées

- **Souches bactériennes**

-Bactéries à Gram – negative

-*Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli est l'espèce bactérienne la plus connue de la famille des Enterobacteriaceae. Ce bacilli à Gram– negative ,à mobilitépéritriche, se développe en aéro-anaérobie et sur gélose ordinaire en 24 heures à 37°C,en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, non pigmentées **(Hart, T et al¸ 1997).** Cette Espèce est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. *E. coli* est l'espèce la plus fréquemment responsible d'infection surinaires. Cette bactérie est aussi à l'origine desepticémies, de méningites chez le nourrisson ainsi que de manifestations intestinales tells que les diarrhées. Elle est également responsible d'infections communautaires et nosocomiales **(Avril, 1992 ; Avril, *et al.,* 2002) .**

-Bactéries à Gram – positif

-*Bacillus subtilis* ATCC 6633

Bacillus subtilis est une espèce de bactéries du genre Bacillus et de la famille des Bacillaceae. C'est Un bacille à Gram–Positifgroupé en chaînette, mobile, aérobie strict. L'habitat naturel de *B. subtilis* est le sol, mais il est répandu aussi dans de l'eau fraîche, les eaux côtières et les océans. Il se développe à des températures allant de 10 à 55 °C, avec des taux de croissance plus rapide d'environ 42°C.B. subtilis n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme (seulement *B. anthracis* et *B. cereus* sont connues pour être pathogènes pour les humains), mais il peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer des intoxications alimentaires. Il est appliqué dans diverses infections Clinique's comme la méningite, l'otite, l'infection urinaire, la pneumonie, l'endocardite, l'abcès de l'orbite, la panophtalmie **(Hart *et al.¸* 1997; Devine, 2004).**

.

I.8.3.1.Technique par contact direct

1- La méthode de diffusion sur gélose

L'antibiogramme est une méthode qui sert à déterminer l'effet des antibiotiques sur les bactéries testées, mais lorsqu'on substitue les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par les huiles essentielles, on l'appelle l'aromatogramme. La méthode d'aromatogramme est la technique choisie pour déterminer l'activité antimicrobienne des HE à tester, elle se base sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous permet de mettre en évidence l'effetantimicrobien des HE sur les bactéries et déterminer leur résistance ou sensibilité vis-à-vis ces HE **(Fig. 13).**

2- Préparation des milieux de culture

La gélose de Mueller Hinton et Sabouraud **(Annexe 04)**stérilesprêtent à l'usage ontété coulées dans des boites de Pétristériles de 90mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 4mm répartieuniformément dans les boites. Ces dernières ontété séchées pendant30 min à la température du laboratoire et laissées 24h/37°C. **(Hart *et al.*¸ 1997; Devine, 2004).**

3- Préparation des dilutions des HE

Après l'extraction des HE par hydrodistillation, on prépare 04 dilutions: 25%, 50%, 57%¸ 100% (v/v) dans le DMSO (diméthylsulfoxide).

Ce choix a été fait parceque le DMSO est le solvent préférable pour la majorité des auteurs, notamment, Gachkar et al. (2007) qui ont prouvéque le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien.

4- Préparation de l'inoculum

Chaque souche bactérienne a étéensemencée en striessur des boites de Pétricontenant la gélose nutritive (GN) et incubée pendant 18 heures, afind'obtenirune culture jeune des bactéries et des colonies bien isolées. Après les 18 heures et à partir de ces boites, on a prélevéquelquecolonies bien isolées et parfaitement identiques avec une anse de platineou pipette Pasteur et les transférer dans un tube contenant 9 ml d'une solution de l'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl) afin d'avoir une densité cellulaire initiale voisine à celle de 0,5McFarland(106 UFC/ml). Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitometer. **(Hart *et al.*¸ 1997; Devine, 2004).**

L'inoculum bactérien est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible soit de l'eau physiologique stériles il est trop fort. L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

5- L'ensemencement et dépôt des disques

Dans les 15 minutes qui suiventl'ajustement de la densité de la suspension bactérienne (l'inoculum), on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé toute la surface de la gélose (Mueller Hinton Agar pour les bactéries) à troisrépétitions en tournant la boite à chaque fois avec 60°, et enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose. Le but de chaque application est d'avoirune distribution uniforme de l'inoculum.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pincestérile, des disques de six millimètres de diamètre de papier 3MM stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage) sont déposéssur la gélose précédemment inoculée avec le microorganism choisi, puis les imbibés par des HE.

Chaque disque contient 10 µl d'unehuile essentielle, d'autresdisques imprégnés chacun de 10 µl de DMSO sont utilisés comme témoins négatifs. La céfixime (CF=10mg) est utilisée comme témoins positifs pour les souches bactériennes. Le test est effectué en triple et les antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. **(Hart *et al.*¸ 1997; Devine, 2004).**

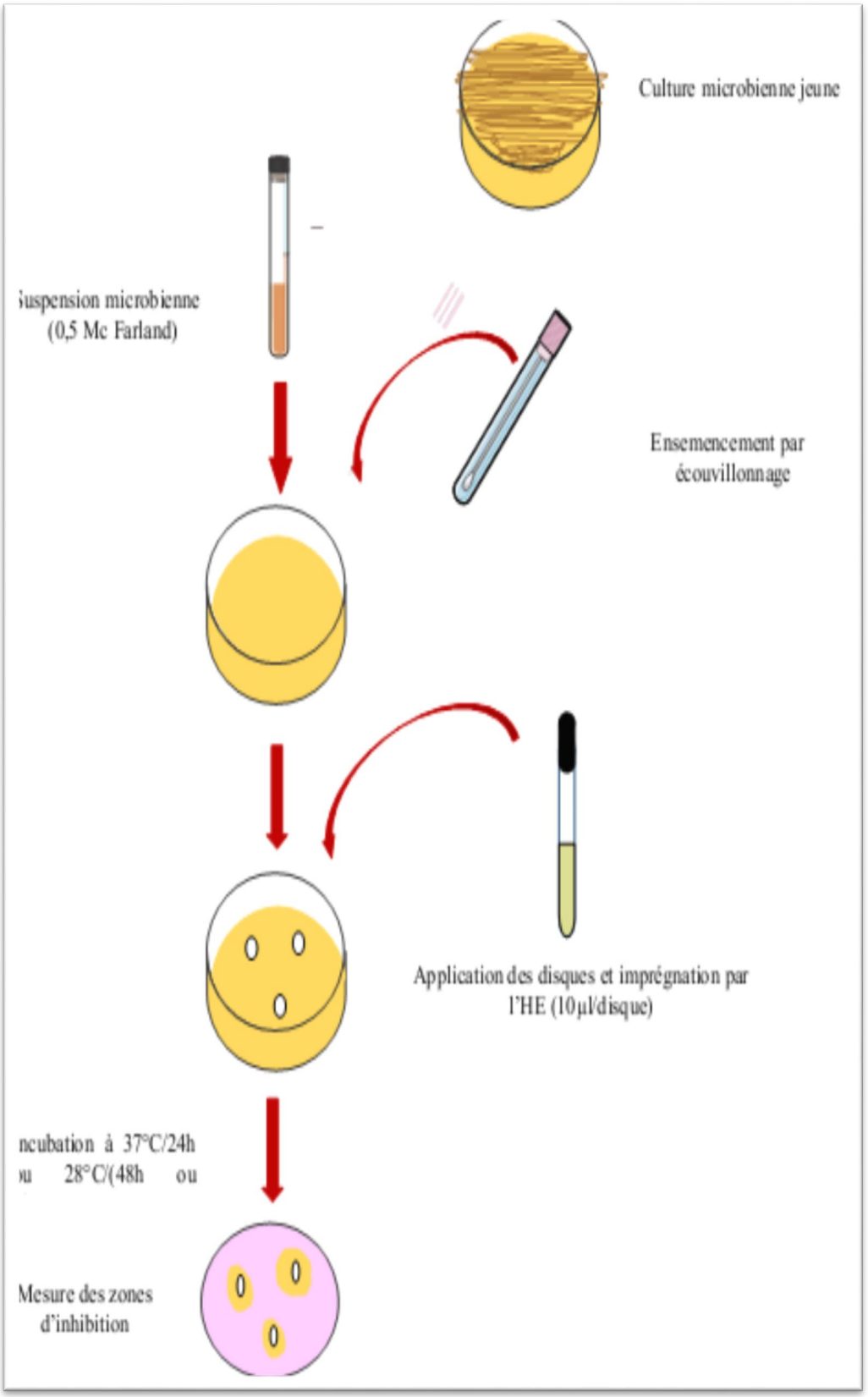


Figure 13: Technique de diffusion sur gélose par disques **(Hart, *et al.*¸ 1997)**

6- Incubation et expression des résultats

Les boites de Pétri sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries, à 30°C pendant 48 heures pour la levure et de trois à sept jours pour les moisissures. Suspension microbienne (0,5 McFarland) Application des disques et imprégnation par l'HE (10µl/disque) Culture microbienne jeune Ensemencement par écouvillonnage Incubation à 37°C/24h ou 28°C/(48h ou 7jours) Mesure des zones d'inhibition .

Lecture

L'activité antibactérienne lorsqu'elle existe est évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques chargés de l'huile essentielle, à l'aide d'un pied à coulisse. D'après **Celikel et Kavas., 2008**, la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

-Résistante (-) : diamètre ≤ 8mm

-Modérément sensible (+) : diamètre compris entre 8 et 14mm.

-Sensible (++) : diamètre compris entre 14 et 20mm.

-Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm **(Euzeby, 2000).**

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1.Rendement d'extraction

Selon AFNOR (2000), les huiles essentielles sont habituellement liquides à la température ambiante et volatiles. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Les résultats de rendement de l'extraction sont illustrés dans le (tableau 4).

Tableau 04 : Rendement des HEs *Mentha aquatica* L obtenus par hydrodistillation

Plante	Rendement d'extraction%
Mentha aquatica L.	**5.136 %**

Le rendement de huile essentielle a été calculé par rapport le poids de la plante séchée utlisée (*Mentha aquatica* L.) et leur valeur est d'environ 5.136 %.

Akrout *et al.,* (2010), ont expliqué que le rendement varie selon le type, et dans le même type varie considérablement et dépond de l'emplacement et la séparation géographique et la saison de récolte. Ceci montre que certains facteurs tels que : la nature du sol, le climat, la qualité de la matière végétale utilisée peuvent influencer la sécrétion des huiles essentielles chez une plante.

II.2. Caractéristiques organoleptiques

Les paramètres organoleptiques

Les paramètres organoleptiques de notre HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques des essences étudiées.

Les propriétés organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
AFNOR	Liquide mobile, limpide	Jaune ambré à jaune verdâtre	Rosé, menthée
***Mentha aquatica* L.**	Liquide	Blanche transparente	menthée

II.3. Détermination des indices physico-chimiques des HEs extraites

II.3.1. Propriétés physiques

Les méthodes physiques d'examen pour l'analyse des huiles essentielles s'attachent surtout à la détermination de la densité, l'indice de réfraction et la miscibilité à l'éthanol **(AFNOR, 2000).** Les résultats de ces paramètres sont consignés dans le tableau 6.

Tableau 06 : Caractéristiques physiques des H.Es *Mentha aquatica* L puisées dans littérature.

Propriétés Physiques	pH	d_{20}	n^{20}	Miscibilié à l'éthanol
HEs	7.55	0.980	1.339	1v/6.4 v d'Et OH

Les résultats obtenus des analyses physicochimiques indiquent que l'échantillon analysé se trouve dans les fourchettes de référence établies par les normes AFNOR. Selon **Gildo (2006),** ces paramètres physicochimiques sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes ; cela fait partie aussi de la complexité de la notion de chémotype. D'après les résultats mentionnés dans le tableau 7, on constate que :

Les huiles essentielles de *Mentha aquatica* L. est basique (pH>7). Il convient de souligner que le pH joue un rôle déterminant au cours des réactions chimiques et biochimiques et peut influencer les propriétés stabilisatrices d'une huile essentielle (effets antioxydant et antimicrobien). Par conséquent, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes ; ce qui permettra à ces HEs de jouer le rôle insecticide. Sachant que la densité est parmi les caractéristiques physiques généralement utilisées dans la classification des huiles essentielles. Mais elle ne peut pas être utilisée seule pour l'identification des huiles. Selon AFNOR NFT 75.11 Si on désire obtenir la masse volumique des huiles essentielles, il faut multipler la densité relative par la masse volumique de l'eau m (eaux) =0.99823 g/ml.**(AFNOR, 2000)**

Les résultats de notre huile essentielle sont inférieur à celle de l'eau, est conformes à les normes proposés par AFNOR. L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'instauration et de la température.

Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. L'indice de réfraction obtenu est de l'ordre 1.339.

Il appartient à l'intervalle mentionné par les normes françaises des huiles essentielles.

Pour certains auteurs, le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques **(Chouitah, 2012).**

La miscibilité à l'éthanol 90% est d'un volume d'huile essentielle pour six volumes d'éthanol. Ces valeurs sont indiquées par les normes françaises (AFNOR, 2000), qui veut dire que l'H.E est plus soluble.

II.3.2. Propriétés chimiques

Pour obtenir des données sur la composition et le degré de pureté des huiles essentielles, il est nécessaire d'étudier plusieurs paramètres chimiques **(AFNOR, 2000).**

Nous avons de même regroupé les propriétés chimiques de HE également dans le (tableau 8).

Tableau 07: Propriétés chimiques d'essence étudiée.

Propriétés chimiques	I_a	I_e	I_I	I_S
Valeur	2.204	10.019	0.158	12.21

*L'indice de saponification a été calculé à partir de la relation suivante: Is= Ie+Ia

D'après ces résultats, on remarque que :

1. Indice d'acide

D'après nos résultats, l'huile essentielle présente un indice d'acide (=2,204) cette dernier est preuve de bonne conservation de l'huile **(Frenot Vierling, 2001).**

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre huile. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation. D'après nos résultats, l'huile essentielle de Mentha aquatica L. présente un indice d'acide élevé.

Un indice d'acide élevé pour les HEs peut être bénéfique si ces essences ont été ajoutées à un produit alimentaire possédant des matières grasses et des acides gras libres oxydables. **(AFNOR, 2000)**

Cet effet stabilisateur se manifeste dans la mesure où l'oxydation affecte plutôt les acides libres de l'essence utilisée comme conservateur et protège ou limite donc l'oxydation des acides gras libres insaturés des produits alimentaires ce qui améliore à la fois la qualité nutritionnelle et organoleptique de ces produits.**(AFNOR, 2000)**

2. Indice d'ester

L'indice d'ester de l'H.E possède un indice plus faible, Ce qui préconise une relation proportionnelle entre la qualité et la valeur d'indice d'ester.

L'indice d'ester peut étre influence par d'autre facteur, tels que les conditions dans les quelles s'effectuent l'hydrolyse (c'est a` dire dans quel type d'alambic, les constituants de l'eau utilises pour le chauffage).De manière générale, les huile de tres bonnes qualités ont un indice ester tes élèves **(Frenot Vierling, 2001).**

3. indice d'iode

Indice d'iode est une bonne méthode générale pour exprime la dureté d'une huile. (FAO, 1990). L'indice d'iode est utilise comme guide pour le contrôle de qualité dans l'achat des matières première et comme contrôle de l'avancement de l'hydrogénation . Selon Kanji, (2001) Le rapport est étroit entre l'indice de réfraction et l'indice d'iode. **(Frenot Vierling, 2001).**

L'indice d'iode est lié à l'état d'insaturation des chaînes carbonées dans nos H.Es de Mentha aquatica L. Les valeurs d'indice d'iode sont dans la fourchette (74-94g d'I2/100g) Norme C.O.I, accuse l'indice le plus bas à la norme ce qui implique qu'elle est facilement altérable. **(AFNOR, 2000)**

4. indice de saponification

Permet de caractériser le poids moléculaire et la longueur moyenne des chaines grasses auxquelles il est inversement proportionnel (Harper, 1997).

Bruni et al,(1994) L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaine hydrocarbonées des acide gras ; plus le poids moléculaires est élève plus l'indice de saponification est faible .Lorsqu'une huile n'est pas soumise a` de bonnes conditions de conservation ,sa détériorer de diverses manières mais le plus souvent par hydrolyse ou par oxydation .Dans ce cas , elle devient impropre a` la consommation .**(AFNOR, 2000)**

Selon norme C.O.I. l'intervalle de l'indice de saponification est (184-196), les résultats d'huile *Mentha aquatica* L. est exclue de l'intervalle donné par la norme de conseil oléicole international. Ce qui permet de dire qu'elle a un poids moléculaire de la longueur d'acide gras élevé.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'acide, indice de réfraction et indice d'ester …) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques : GC/SM, ces dernières, sont souvent utilisées comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles, elles ont été employées pour identifier qualitativement les huiles essentielles de *Mentha aquatica* L.

II.4. Activités biologiques

II.4.1. Activité antioxydante

La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH + (1,1-Diphenyl-2 picryhydrazyl et apparence la couleur jaune.

Après avoir mesuré la densité optique d'huile essentielle et de l'acide ascorbique et l'acide gallique en utilisant le spectrophotométrie UV-visible, les résultats obtenus sont organisés en courbes standards et après calcul du taux d'inhibition I%, de l'échantillon (Figure 12) et de témoin (Figure 13-14) ; nous avons trouvé qu'ils étaient équivalents :

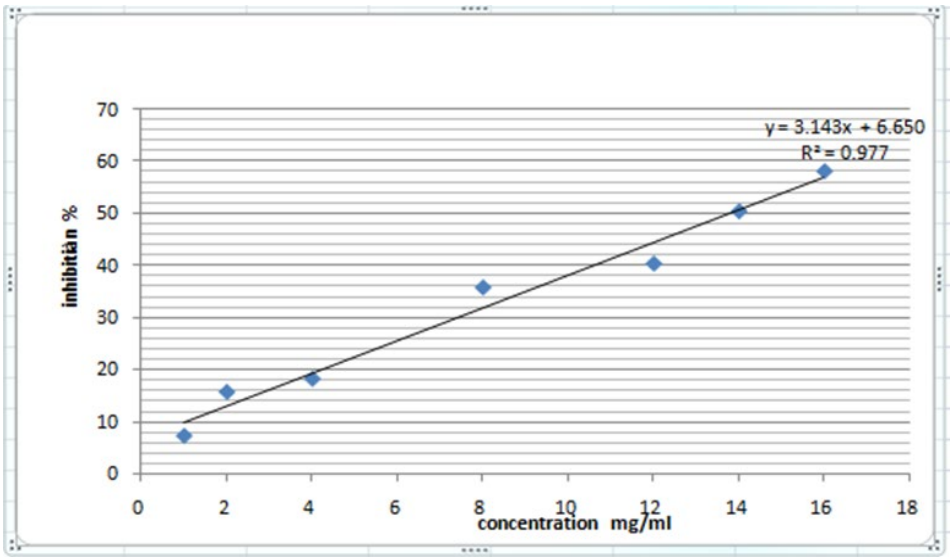


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de HE.

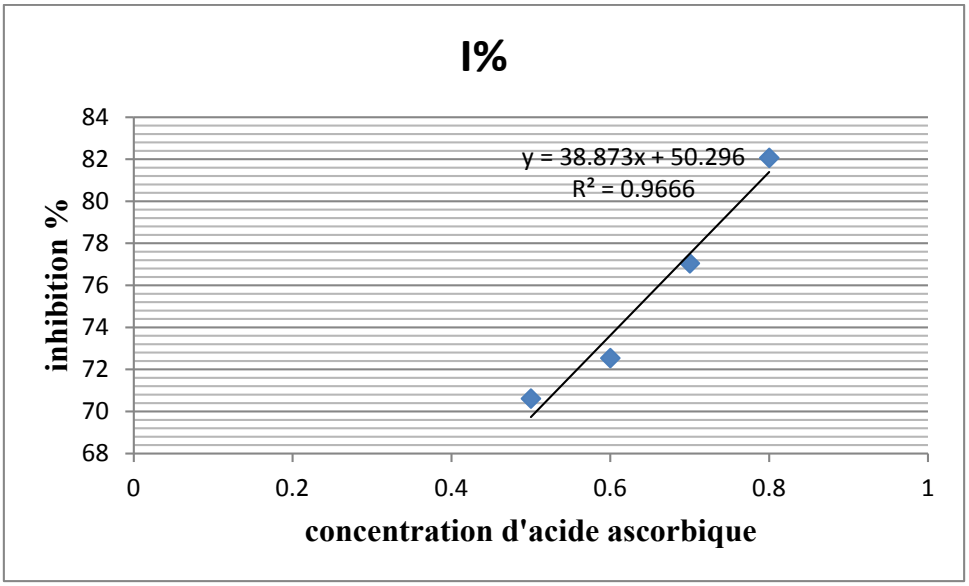


Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

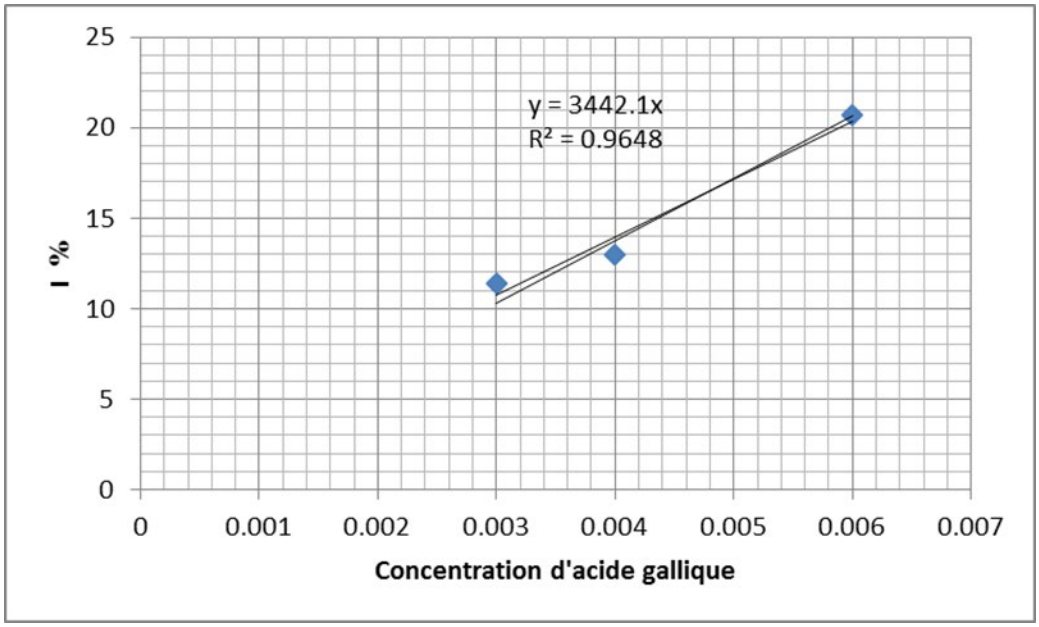


Figure 14 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique**.**

Les résultats semblent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou l'acide gallique ou pour l'huile essentielle de *Mentha aquatica* L. ; où sa concentration 0.012 mg/ml qui donne la meilleure activité ontioxydante comparé à d'autres concentration, quand à la concentration 0.096 mg/ ml l'activité antioxydante était aussi faible que 14.26 %.

L'IC_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (tableau 8) et figure 14.

Tableau 08 : Valeur d'IC_{50} de DDPH et acide ascorbique et l'acide gallique.

	HE s	**Acide ascorbique**	**Acide gallique**
$IC_{50} mg/ml$	0.976	0.007	0.028

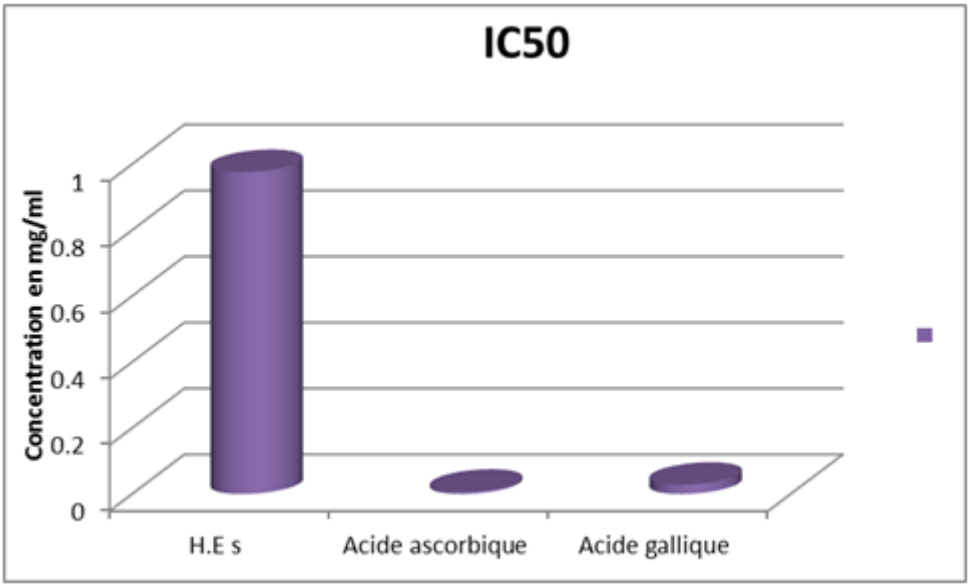


Figure 15 : Histogramme représentant les valeurs des IC_{50} des huiles essentielles de *Mentha aquatica* L., acide ascorbique et acide gallique.

Benknatha, (2014), montre que plus la valeur de IC_{50} est forte, plus l'efficacité antioxydante est faible.

En comparant IC_{50} de HEs, qui est égal à 0.976 avec la valeur de IC_{50} de l'acide ascorbique qui est égale 0.007 et la valeur acide gallique est égale 0.028, on trouve que l'efficacité antioxydante de HEs est plus inférieure à celle de l'acide ascorbique, cela indique que le pouvoir antioxydant de HEs de *Mentha aquatica* L. est faible.

La différence d'activité antioxydante entre les échantillons s'explique par le comportement du proton et de l'électron **(Miliauskas *et al.*, 2004).**

De nombreux chercheurs ont montré que la capacité inhibitrice des composés végétaux sur la radicaux de DDPH a une relation significative avec la structure chimique, et l'efficacité antioxydante de ces extraits peut être liée à leur composition en composés, l'efficacité de ces composés dépend du nombre de groupes hydroxyles associés à l'anneau aromatique **(Debouba *et al.*, 2012).**

II.4.2. Activité antibactérienne

En utilisant la méthode de diffusion sur disque dans le milieu de gélose ; Afin de détecter l'effet de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* L. et des antibiotiques en

parallèle sur 2 souches bactériennes appartient également au Gram + et Gram -. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux 8 et 9 (Sachant que le diamètre de zone d'inhibition compris le diamètre de disques utilisés égale 6mm).

Tableau 9 : Zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes gram (-) et Gram testés en fonction des déférents concentrations d'HEs.

	Zones d'inhibition (mm)			
[c]	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
Microorganisme				
***Escherichia coli* ATCC 25922**	6	6	6	6
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**	6	7	7.8	8

Le tableau 9 indique que les résultats montrent clairement l'effet significatif du *Mentha aquatica* L. sur certaines souches étudiées, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, on observe que l'activité antibactérienne elle est totalement nulle contre *Escherichia coli*, limite pour *Bacillus subtilis* on remarque que cette diamètre d'inhibition augmente avec les concentration de l'huile.

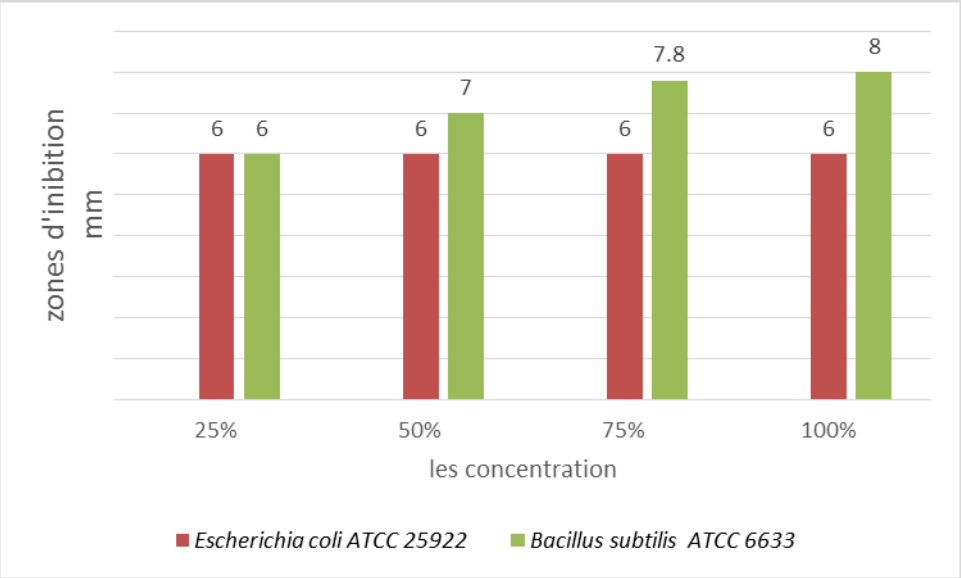


Figure16 : Zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes testées en fonction de déférentes concentrations d'huile essentielle.

D'après tous les résultats, nous pouvons dire que l'huile essentielle de *Mentha aquatica* L. possède une capacité antimicrobienne faible contre les souches bactériennes testées. Ce résultat est équivaut à ceux trouvée par **Koba *et al.*, (2004).** Ils ont prouvé la faiblesse de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* L. où cette faible efficacité est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle durant le stockage et/ou l'extraction.

Hussein (1990), a montré que les bactéries à Gram positifs résistent mieux aux huiles essentielles, que les bactéries à Gram négatifs, ce qui est contraire aux résultats trouvés par **Inouye *et al,* (2001)** cité par **Bousbia (2011),** et montrent que les bactéries à Gram positifs sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles que celles à Gram négatifs. De plus, parmi les bactéries Gram positifs une plus grande résistance a été décelée pour celles qui produisent de l'acide lactique. **Inouye *et al,* (2001)**

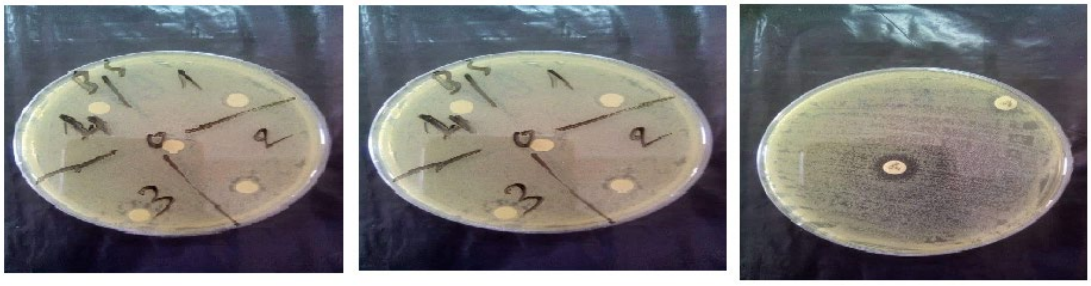
Bari *et al,* (2010) cité par Bouguerra (2012) ont confirmé la grande résistante des bactéries Gram-négatifs par rapport aux ce Gram-positifs constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l'huile essentielle étudiée d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries Gram-négatifs qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrant d'autre part .

Chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques et acides teichoïques) **(Labio, 2016)**. La membrane externe des bactéries gram négatif est très chargée, elle agit comme une barrière aux huiles essentielles **(Chouitah, 2012).**

Concernant les antibiotiques utilisés, on constate que toutes les souches se sont révélées sensible à la céfixime avec des diamètres de zone d'inhibitions variés, dont la plus grande enregistrée sur *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition d'environ de 19 mm, et la plus petite est de 12 mm enregistré sur *Bacillus subtilis.*

Par ailleurs, le témoin négatif utilisé (DMSO) n'a pas marqué des zones d'inhibition avec toutes les souches bactériennes (tableau 10).

Escherichia. Coli



Bacillus subtilis

Photo 02 : Zones d'inhibition de différents concentrations de HEs sur les souches bactériennes et les ATB et DMSO (4 : 25%3: 50% 2: 75% 1: 100%)

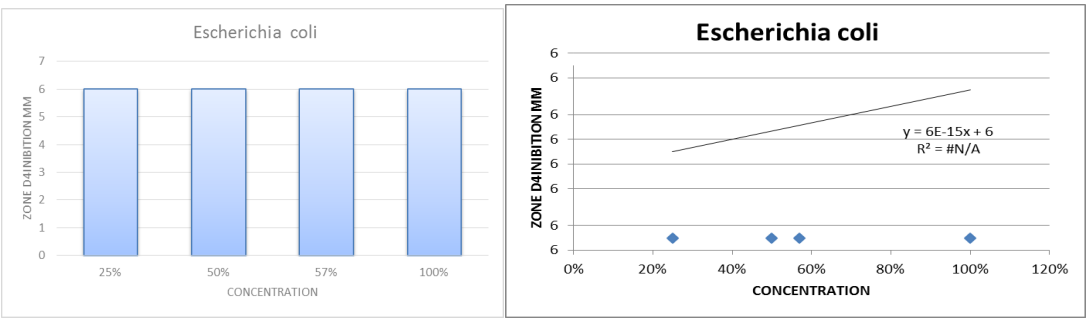


Figure 17 : Test de corrélation de H.E de *Mentha aquatica L.* vis-à-vis la souche *Escherchia coli.*

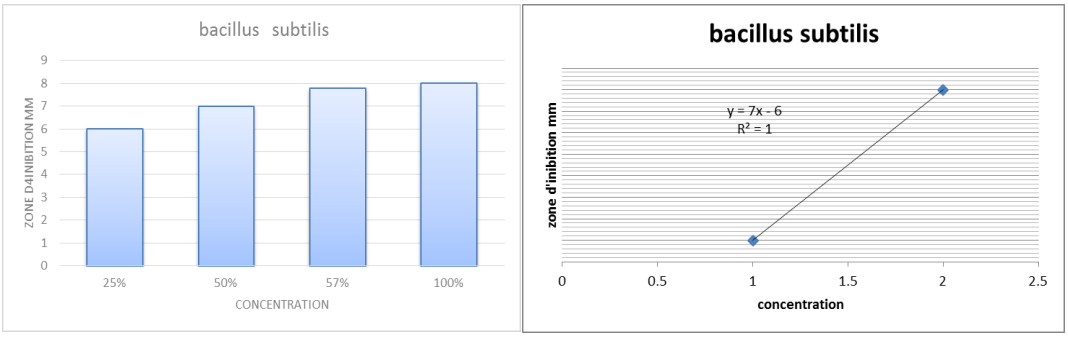


Figure 18 : Test de corrélation de H.E de *Mentha aquatica* L. vis-à-vis la souche *Bacillus subtilis*.

D'après les courbes illustrées dans les figures 17, et selon coefficient de corrélation linéaire de Bravais Pearson **(Zarrouk, 2012).**

Toutes les valeurs R^2 des courbes proches de +1 donc montre une forte liaison entre les deux caractères (les concentrations utilisés et les zones d'inhibition obtenus). La relation linéaire est ici croissante (c'est-à-dire que les variables varient dans le même sens).

Conclusion

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude chimique et biologique d'huile essentielle de *Mentha aquatica* L., plante appartenant à la famille des Lamiaceae (labiées) dans la flore de l'Algérie, issue de la région d'El OUED.

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobienne et antioxydante très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires.

Tout d'abord, l'obtention de l'huile essentielle par hydrodistillation reste une méthode simple et efficace, et donne un rendement intéressant. Le calcule de rendement moyen en huile essentielle de notre plante nous a révèle une valeur importante de 5.136 %.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide,...) des essences recueillies nous a conduit à des valeurs conformes aux normes de commercialisation des HEs établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

Par ailleurs, les résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle végétale en utilisant le test DDPH et fait la comparaison avec l'acide ascorbique et l'acide gallique comme standard, montrent que IC_{50} pour l'huile essentielle était égale 0.976 mg/ml tandis que pour l'acide ascorbique était égale 0.007 mg/ml et l'acide gallique 0.028 mg/ml .

Par conséquent, nous avons constaté que l'efficacité antioxydante d'huile essentielle était significativement inférieure à celle de l'acide ascorbique et l'acide gallique, ceci qui confirme que l'efficacité antioxydante de la plante est faible par rapport à l'acide ascorbique et l'acide gallique.

Tous ces résultats indiquent clairement que HE de *Mentha aquatica* L. ayant une faible activité antioxydant .Cette activité est liée en grande partie à la composition des extrait et leur richesse en composes phénoliques et en flavonoïdes. Ces propriétés sont citées pour ces composes dans de nombreuses publications et rapport scientifiques.

Concernant l'activité antimicrobienne : les résultats révèlent clairement un effet faible d'HEs de partie aérienne de *Mentha aquatica* L. sur les deux souches étudiées (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*).Ont notes aussi, que l'activité antibactérienne elle est totalement nulle contre *Escherichia coli*, limite pour *Bacillus subtilis*, on remarque que cette diamètre d'inhibition augmente avec concentration de l'huile (Relation de corrélation directe).

Références bibiliographiques

Référence bibliographique

- **AFNOR.(2000) .** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663.
- **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. et Chaouch A. (2010)** . Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. Et Thymus ciliatus (Desf.) Benth.Du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 14(1) : 141-148.
- **Arnold H.J., Gulumian M., (1984).** Pharmacoepia of traditional medicine in Venda. J. Ethnopharmacol., 12, 35–74.
- **Avril, J.L.(1992).** Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H. « Bactériologie Clinique », 2 ème Ed. Ellipses, Paris 1992 , p. 512.
- **Avril, J.L.; Fauchère, J.L.(2002).** «Bactériologie générale et médicale», Ed. Ellipses, Paris 2002 , p. 368.
- **Baser K.H.C., Nuriddinov K.R., Nigmatullaev A.M., Aripov K.N., 1997.** Essential oil of Mentha asiatica from Uzbekistan. J. Essent.Oil. Res. 9, 453-454.
- **Billerbeck V. G., (2007)** . Huile essentielle et bactéries résistantes aux ATB. Phytothérapie. 5, pp : 249-25.
- **Billerbeck V-G, Roques C, Vanière P. et Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles .Rev, hygienes, Vol X - N°3, pp248.
- **Bouhdid S., Idomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S & Abrini J. (2006)** . Thymus essential oils : chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities, Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc.
- **Bruneton J., (1999)** : Pharmacognosie – phytochimie, plantes médicinales, 2e edition.Ed. Tec et Doc Lavoisier.
- **Burt S ., (2004)**. Essential oils : their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International journal of food microbiology, 94, 223-253.
- **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, Faculté des Sciences de Rabat.
- **Bray L., (2005).** Phylogénie des Angiospermes. http:www. Botanique.org. consulté le 21/10/05. Buil P., Gamero J., Joulain D., 1981. Higher terpenoids from the jasmine flowers oil absolute, RivistaItaliana EPPOS, 63, 282-285.

- **Caillet S., Lacroix M., (2007)** . les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs application potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier.8p.
- **Calamiglia S., Busquet M ., Cardozo P.W., (2007)** . invited review : Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation . journal of dairy science .90: 2580-2595.
- **Carde J.P., (1979)** . le fonctionnement des cellules sécrétrices des canaux chez le Pinmaritime : donnés du microscope électronique.-104 e Congr. Natl. Soc .savantes, Bordeaux, Sciences, Fasc. II., 275-286.
- **Celikel N., Kavas G.¸ (2008)** . Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech J. Food Sci., 26: 174–181.
- **Chouitah O., (2012).** Composition chimique et activité anti bactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhiza glabra. Université d'Oran. p: 94.
- **Clevenger J.F., (1928).** Apparatus for the determination of volatile oil. J. Pharm. Assoc., 17, 336-341.
- **Dagan B., (1988)** . Les substances de réserve du Pin maritime : rol éventuel des métabolites secondaires. –Actual. Bot., 1,25-40.
- **Degryse A., Delpla I., Voinier M. (2008)** . Risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ingénieure du Génie Sanitaire, Atelier santé environnement.
- **Devine, K. (2004) .** « Bacillus subtilis , genetics », In Schaechter, M. (Ed.), Desk Encyclopedia of Microbiology , Elsevier, San Diego, CA, USA , pp. 126–134.
- **Dubey V.S., Bhalla R. Luthra R., (2003)** . An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. J. Biosci. 28 (5), 637-646.
- **Dudariva A., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W et Gerchenzon J., (2005).** The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. Ed. Rodney B. croteau, Washington state University, Pullman, WA. PNAS. 102 (3), 933-938.
- **Deschamps C., Zanatta J.L., Bizzo H.R., Oliveira M.C., Roswalka L.C., 2008.** Seasonal evaluation of essential oil yield of mint species. Ciênc. Agrotec., 32, 725-730.

- **Erturk O., (2006).** Antibactirial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven space plants. Biologia, Bratislava, 61(3): 275-278.
- **Euzeby J., (2000).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
- **Fouché J.G., Marquet A., Hambuckers A., (2000).** les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observatiore du Monde des Plantes Exposition du 19 -09-2000.
- **Fraga B.M., Diaz C.E., Guadano A., Gonzalez-Coloma A., (2005).** Diterpenes from Salviabrous sonettiroots and their insecticidal activity. J.Agric. Food Chem.,53, 5200-5206
- **Faye O .¸ LO M .¸Gaye o . (1997).** Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale sénégalaise . médecine tropicale ;57:161-164.
- **Hatanaka A., Kajiwara T., Sekiya J., (1987)** . Biosynthesis pathway for C6-aldéhydes formation from linolenic acid in green leaves. Chem phys Lipids. 44, 341-361.
- **Haddouchi F., Benmansour A., (2008)** . Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire -N°8.
- **Hart, T.; Shears, P ¸ (1997).** «Atlas de poche de microbiologie », Ed. Médecine-Sciences, Paris , p. 240.
- **Hazzit M.,Baalioumer A ., Verissimo A. R., Faleiro M. L., Miguel M., G ., (2009)** . Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food chemistry.116,741-721.
- **Heide L., (1991)**. Traditionelle Arzneipflanzen in der Gesundheit sversorgung der drittenwelt Moglichkeit enundgrenzen. Zeitschrift fur Phytoterapie, 12, 1-8.
- **Hostettmann K., Marston A., Hostettmann M., (1998)**. Preparativechromatography techniques :Applications in naturalproducts isolation, 2nded. Springer Vergla. Berlin Heidelberg.
- **Iserin .P., (2001) .** Encyclopédie des plantes médicinales .2eme Ed .pp 18-54.
- **Gleizes M., Pauly G., Carde J.P., Marpeau A., Bernard-Dagan C., (1983).** Monoterpene hydrocarbon biosynthesis by isolated leucoplasts of Citroffortunella mitis. –Planta, 159, 373-381. 77.
- **Guido S., Alessandra B., Guido F., Luigi C.P., Emilio T.P.,(1997)**. Variability of essential oil composition of Mentha aquatica collected in tow different habitats of

North Tuscany, Italy. Gülçin İ., 2012. Antioxydant activity of food constituents : an overview. Arch. Toxicol., 86,345-391.

- **Guignard J.-L ., Cosson L., Henry M., (1985)** . Abrégé de phytochimie. Ed. Masson. ISBN : 2-225-80436-2.
- **Guinoiseau E ., (2010) .** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. Thèse Doctorat, Université De Corse-Pasquale Paoli.
- **Govaerts R., (2012)**. World checklist of Stachys L. facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet http://apps.kew.org/wcsp/.
- **Grysole J., (2005)** . Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique. 140-162.
- **Kaloustian J., Chevalier J., Martino C., Abou L., Vergnes M.F., (2008).** Etude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. phytothérapie, 6, 160–164.
- **Kanji E., (2001**). . Etude de l'extraction de métabolites secondaires composition chimique , de la plante au médicament, Observatiore du Monde des Plantes Exposition du 19 -09- 2000.
-
- **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Carde J.P., (1994)** . Biogénèse des monoterpènes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux., 133,Pp: 69-78.
- **L. Lagunez Rivera., (2006)** . Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse,15-35.
- **Lucchesi M. E., (2005) .** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences, Faculté des Sciences et Technologies.
- **Lucienne A.D., (2010) .** les plantes médicinales d'Algérie .Ed. Berti. 239 p.
- **Mozaffarian V., (1996).** A dictionary if Iranian plant names. Farhang Moaser Publishers, Tehran.
- **Naouel UISE .,(2015).** Etude chimique et biologique de Les huiles essentielles de coriandre de fenouil et de fercil. Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences, Faculté des Sciences exactes et appliquées .

- **NS. Kim, DS. Lee.¸ (2002).** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from Lavandula species by gas chromatographymass spectrometry. Journal of Chromatography , 98, 31-47.
- **Pibiri M.C ., (2006)** . Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse doctorat, Ecole polytechnique fédérale de lausanne. 161p.
- **Pooley E., (2005).** A Field Guide to Wild Flowers KwaZulu-Natal and the EasternRegion, First edition. Natal Flora Publications Trust, second impression.
- **Quezel P., Santa S., 1962**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S. 786.
- **Sakina MOUSSAOUI et Nadia TALIT ., 2016** . Assosiation des composés phénoliques de quelque plantes médicinales . Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de master en sciences, Faculté des Sciences Bioprocédé , technologie , Alimentaire .
- **Talbi.H, A. Boumaza, K. El-mostafa, J. Talbi, A. Hilali¸(2015)** . Evaluation de l'activité antioxydante et composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la Nigella sativa L.Environ. Sci. 6 (4) (2015) 1111-1117.
- **Topçu G., Kusman T., (2014)**.Lamiaceaefamily plants as a potentialanticholinesterase source in the treatment of Alzheimer'sdisease. BezmialemSci., 1, 1–25.
- **Tucker, Naczi. (2007).**Mentha: Un Aperçu De La Classification Et Les Relations. En 16-17: Laurent, BM, Ed, Monnaie. Du GenreMentha. 16-17.
- **Valnet J., (2001),** la phytothérapie-traitement des maladies par les plantes –Se siogner par les plantes. Ed. Vigot . ISBN :2-253-03790-7.**In : Haddouchi F., (2007).**Contribution à l'étude des huiles essentielles de Thymus Fontanesii (Zaâteur) de la région de Mostaganem et de laurus nobilis(Rend) de la région de Tlemcen (Nedroma).Activités antibactériennes et antifongiques en fonction de leur de leur conservation .Thèse magister, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen .PP 12-23.
- **Veuillot M., (2001) .** Etude sur les plantes, usages et statuts juridiques. Le courrier de l'environnement no 44, Ed. I.N.R.A . Pp:24-25.
- **Vierling ., (2001) .** la phytothérapie-traitement des maladies par les plantes . Natal Flora Publications Trust, second impression.
-

- **Zhiri A ., (2006).** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. Art., Nutra News. 16p.
- **Zahira BOUZIANE .,(2017)** . Contrubition a l'etude ethnobotanique des plantes médicinales De la région d'AZIL(Tlemcen- Algérie). Thèse Présentée en vue de l'obtention du déplome master en sciences, Faculté des Sciences écologie et environemment .

Annexes

Annexe 01 : Montage d'extraction des huiles essentielles

Photo 01 : Extraction des huiles essentielle par Hydrodistillation (moyen de Clevenger)

Photo 02 :conservation les huil essentielle dans des tubes en verre fermé hermétiquement à l'abri de la lumière et à une température entre 4 et 6°C

Annexe 02 : Matériels d'analyse physico-chimique

Photo 03:Réfractomètre **Photo 04: PH mètre**

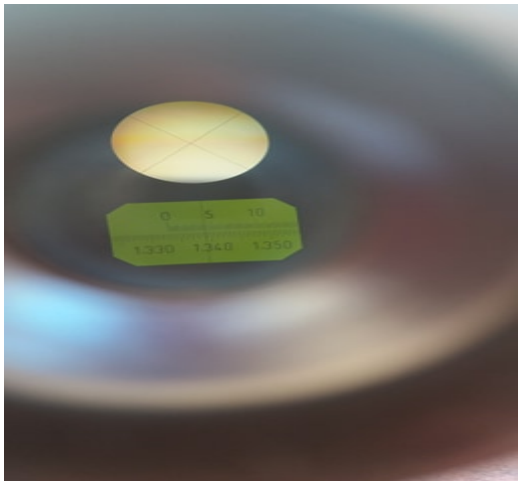


Photo 05: lecture l' indice de réfraction

Photo 06 : Test de miscibilité à l'éthanol

Photo 07: Matériels utilisés pour la mesure d'indice d'acide

Photo 08 : Appareille régitâteur

Annexe 03 : Activité Antibactérienne

Tableau 01 : Gélose Nutritif¸Gélose MH (Mueller-Hinton) et Eau physiologique

Gélose Nutritif	Gélose MH (Mueller-Hinton)	Eau physiologique
Peptone …… 5g Extrait de viande ……..……1g Extrait de levure …… 2g Chlorure de sodium ……..…… 5g Eau distillée …….. 11	Infusion de viande de bœuf déshydraté..300g Hydrolysat de caséine ……17.5g Amidon de mais……...…..1.5g Agar Agar……...….13g Eau distillée …….11	Eau distillée.…….. .1L Chlorure de sodium…9g

Photo 10 :Autoclave

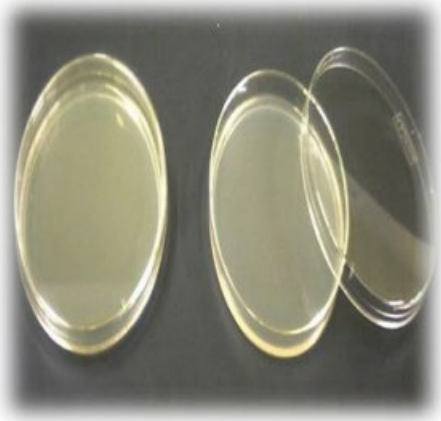


Photo 11: Coulage des Boites pétri en milieu de culture

Photo 12 : Préparation de l'inoculum

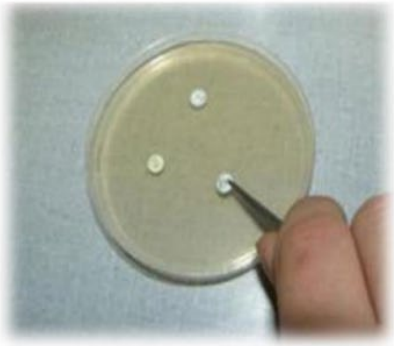


Photo 13 : Placement des disques

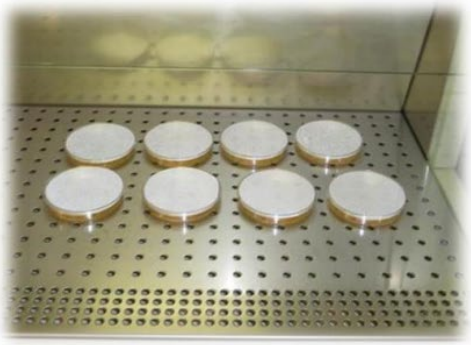


photo 14 Incubation 24H à 37°C

الملخـــــــــص

هذا العمل هو جزء من تثمين النباتات الطبية الجزائرية المعروفة بخصائصها العلاجية، ونحن مهتمون بدراسة نبات النعناع المائي Mentha aquaticaالمعروف بغناه بالمواد الفعالة المستخدمة من قبل السكان المحليين في مختلف العلاجات ويكرس هذا العمل من ناحيتين أولا ، إستخراج الزيوت العطرية، وتأثير التجفيف على مردود المستخرج وتحديد التركيب الكيميائي وذلك بهدف دراسة النشاطية البيولوجية بما في ذلك النشاطية المضاد للبكتيريا ، و النشاطية المضادة للأكسدة للزيوت الأساسية المستخرجة من النبات ، وثانيا لتسليط الضوء على هذه الأنشطة النباتية . (*Mentha aquatica*) تم استخراج الزيت الأساسي من الجزء الهوائي للنبات بواسطة تقنية التقطير بالبخار . hydrodistilation مردود الاستخراج الناتج 5.136 % ودراسة خصائصها الفيزيائية والكيميائية ، بما في ذلك الخصائص الحسية نجد أن هذا الزيت الأساسي يملك مظهرسائل و لون ابيض شفاف و رائحة عطرية و نجد ان نسبة الحموضة تساوي 7.55 ، و مؤشر الانكسار 1.339،والقدرة على الامتزاج بالايثانول (v/6.4 v d' EtOH) و منه فان هذا الزيت قاعدي و قابل للذوبان . و فيما يتعلق بالتحليل الكيميائي وجدنا ان مؤشر الحمض قدر ب 2.204 ومؤشر الاسترة 10.019ومؤشر اليود 0.158 ،و مؤشر التصبن 12.21 . اما بخصوص النشاطية البيولوجية فتمحورت حول ،دراسة النشاطية المضادة للاكسدة باستخدام •DPPH تؤكد ان قيمة IC_{50} للزيت الأساسي قدرت ب 0.976 مع /مل و بالنسبة لحمض الاسكوربيك قدرت ب 0.007مغ / مل والنشاطية المضادة للبكتيريا من أجل معرفة مدى فعالية الزيت الأساسي على بعض السلالات البكتيرية الممرضة مثل *Bacillus subtilis* ,*Escherichia coli* و من خلال تحليل هذا الزيت الأساسي وجدنا ان لديه نشاطية ضعيفة وحدودة ضد البكتيريا المدروسه

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية , hydrodistilation , *Mentha aquatica* l , الخصائص الفيزيائية والكيميائية , DPPH ,. .

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales algériennes réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous sommes intéressés à l'étude de la plante Mentha aquatica L connue par sa richesse en matière active utilisée par la population locale dans différents thérapies Le présent travail est consacré d'une part, à L'extraction des huiles essentielles, l'influence du séchage à l'ombre sur le rendement d'extraction et l'identification de la composition chimique dont l'objectif visé est d'étudier les activités biologiques dont l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites, et de l'autre part de mettre en évidence ces activités(Mentha aquatica)..Nous avons procédé l'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante par la technique d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction obtenu est de 5.136 %.et ses propriétés physiques et chimiques, y compris ses propriétés sensorielles, sont étudiées.Cette huile essentielle a l'apparence d'une odeur aromatique liquide et blanche. . Par ailleurs, les propriétés physique, on trouve le pH égale 7.55, indice de réfraction est 1.339, et la miscibilité à l'éthanol estimée à (v1 / 6.4) v d 'EtOH). C'est-à-dire nos H.E est basique, et soluble. Concernant, les analyses chimiques on trouve que l'indice d'acide estimée est 2.204, indice d'ester est égale 10.019, indice d'iode estimée à 0.158 et indice de saponification est égale 12.21. En termes d'activité biologique, l'étude s'est concentrée sur l'étude de l'activité antioxydante à l'aide de DPPH •, confirment que la valeur de IC_{50} d'huile essentielle de Mentha aquatica L estimée égale 0.976 mg/ml et 0.007 mg/ml pour l''acide ascorbique et de l'activité antibactérienne afin de connaître l'efficacité de l'huile essentielle sur certaines souches bactériennes pathogènes telles que Escherichia coli , Bacillus subtilis En analysant cette huile essentielle, nous avons constaté qu'elle avait une activité faible et limitée contre la bactérie étudiée.

Mots clés: huiles essentielles, *Mentha aquatica* L hydrodistilation, propriétés physiques et chimiques DPPH ,.