

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche scientifique

Université Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie



Département de Biotechnologies

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : science agronomique

Spécialité : système de production agro écologique

Thème :

Extraction et caractérisation des composés secondaires de la plante
(*Mentha longifolia*) de la région de Tamanrasset

Présenté par :

Ferdous MOULOUD et Fella DJELLAOUI

Devant le membre de jury :

M.ABBAD	MCA, U. Blida 1	Président
F.BOUCHENAK	Maitre de conférence A , U. Blida 1	Examineur
F.Z. BENREBIHA	Professeur, U. Blida 1	Promotrice
S. LAKEHAL	Attaché de recherche	Co-promotrice

Blida, Septembre 2019 /2020

RESUMÉ

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une source importante de molécules bioactives notamment dans leurs extraits volatils. Dans ce cadre et afin d'isoler de nouvelles molécules dotées de propriétés biologiques puissantes nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. L., récoltées dans la région de Hoggar (Tamanrasset) le mois de Mars 2019. Le rendement moyen en huile essentielle obtenu par hydro-distillation (type Clevenger) est de l'ordre de 1.2 ± 0.21 % (mg/100g). La composition chimique de l'huile essentielle étudiée a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), dont les composés majoritaires sont : Pulegone (47.15%), menthone (10.70%) et 1,8 cineole (11.54%). L'activité antimicrobienne a été étudiée vis-à-vis de cinq souches bactériennes : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* qui se sont révélées sensibles à l'huile essentielle étudiée. Une bonne activité fongicide de l'huile essentielle testée s'est évaluée vis-à-vis de deux champignons à savoir : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* et une levure : *Candida albicans*. L'activité antioxydante a été mesurée en utilisant le test de piégeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH). Les résultats montrent que l'huile essentielle testée a une activité antioxydante modérée, relativement faible comparée à l'antioxydant standard (Vitamine C).

Mots clés : *Mentha longifolia* L. L., hydro distillation, huile essentielle, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

ABSTRACT

Aromatic and medicinal plants are an important source of bioactive molecules, especially in volatile extracts. In this context and in order to isolate new compounds with potent biological properties we were interested in the extraction of essential oil of *Mentha longifolia L.*, harvested in Hoggar region (Tamanrasset) the month of march 2019. The yield of essential oil obtained by hydrodistillation (type Cleavenger) is about 1.2 ± 0.21 (mg/100g). The chemical composition of essential oils studied was identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The majority compounds are: Pulegone (47.15%), menthone (10.70%) et 1, 8 cineole (11.54%). The antimicrobial activity was studied towards five bacterial strains: *Klebsiella Pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, they are revealed sensitive to essential oil studied. A good Fungicide activity of essential oil tested was evaluated towards two fungi: *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* and yeast: *Candida albicans*. The antioxidant activity was measured using the trapping test diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH). The results show that essential oils tested have moderate antioxidant activity, relatively low compared with antioxidant standard (Vitamin C).

Keywords: *Mentha longifolia L. L.*, hydrodistillation, essentialoil, antimicrobial activity, antioxidant activity.

الملخص

تعتبر النباتات العطرية و الطبية مصدرا هاما للمركبات الحيوية خاصة تلك التي تكمن في مستخلصاتها الطيارة. على هذا الاساس و من اجل عزل مركبات جديدة ذات خصائص بيولوجية فعالة وقع اهتمامنا على استخراج الزيت الأساسية لـ *Mentha longifolia L. L.* . تم الحصول عليها من منطقة الهقار) تمناست(، شهرمارس 2019. متوسط العائد من الزيت الأساسية المتحصل عليها بتقنية التقطير بالبخار (نوع Clevenger (حوالي 0.12 ± 2.1 (ml / 100g). تم التعرف على التركيب الكيميائي للزيت الأساسية بواسطة جهاز CG/MS، حيث العناصر الغالبة في زيت نبتة *Mentha longifolia L. L.* والتي تتكون أغليبتها من: menthone (11.54%), 1,8cineole (47.15%)، pulegone (10.70%). تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات على خمسة بيكتيريا مجهرية وهي: حيث *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus*، تبينت كلها حساسة للزيت الأساسية المدروسة. أظهرت الزيت الأساسية المختبرة نشاطا جيدا كمبيدات على الفطريات: *Aspergillus niger* و *Fusarium oxysporum* و الخميرة: *Candida albicans*. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق اختبار محاصرة الراديكال (DPPH) و أظهرت النتائج ان الزيت الأساسية لها نشاط مضاد للأكسدة متوسط، نسبيا ضعيف مقارنة بمضاد الاكسدة المرجعية فيتامين C).

الكلمات المفتاحية: *Mentha longifolia L. L.* ، التقطير بالبخار، زيت اساسي، تأثير مضاد للميكروبات، تأثير مضاد الأكسدة.

REMERCIEMENT

Avant tout je remercie Dieu « ALLAH » le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail. Je tiens à faire part de ma reconnaissance particulière et de mon respect profond aux membres composant le jury :

Ma promotrice Madame BENREBIHA F.Z. Professeur à U. Blida 1 pour tout son aide, ses orientations et ses conseils judicieux qui m'en éclairé.

Ma Co-promotrice Madame LAKEHAL S. Attaché de recherche à U. Blida 1 pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi.

Monsieur ABBAD M. Maître assistant A à U. Blida 1 qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury.

Madame BOUCHENAK F. Maître de conférences A à U. Blida 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur FLITA K. Ingénieur du laboratoire d'amélioration des plantes U.Blida1.

Mes remerciements sont adressés, à tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science.

Ma gratitude est exprimée en particulier envers Madame MELIANI A.

DÉDICACE

Je Dédie ce modeste travail à :

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse,
leur soutien , leurs prières et leur encouragements tout au long de mes
études,*

A ma chère grand-mère

A mon cher frère Abdrraouf

A ma petite adorable sœur Ikram

A ma chère binôme c'est un plaisir de travailler avec vous,

A mes proches amis que j'aime trop

A tout les amis et les voisins

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours
universitaire*

Ferdous

DÉDICACE

Je dédie ce travail

*A ma chère mère qui m'encourage durant mes longues «études qui a tout fait
pour me voir réussir dans ce modeste travail une mère très adorable,
un soutien infaillible*

*A mon chère père qui est sacrifié pour nous voir grandir et baigner dans la
réussite. Ses conseils ses encouragements.*

A mes frères walid et mohamed

A mes sœurs wissem et amina et alaà

A mes adorables iyed adem et yanis

A mes oncles a mes tantes mes cousins et cousines

*A toute la famille djellaoui chacun et chacune a apporté sa touche
d'encouragement et de soutien*

A ma binôme Mouloud ferdous je te souhaite le bon courage

A mes chères amies meriem , yasmine , selma

A tout notre promotion de système de production agro-écologique

Fella

TABLE DES MATIERES

I. Chapitre 1 : <i>Mentha longifolia</i> L.	
1.1.1. Etymologie	13
1.1.2. Noms vernaculaires	13
1.1.4. Description et écologie	13
1.1.5. Distribution	13
1.1.6. Propriétés et utilisation	14
II. Chapitre 2 : LES HUILES ESSENTIELLES	15
1.2.1. Répartition et Localisation	15
1.2.2. Fonctions dans la plante	16
1.2.3. Extraction	18
1.2.4. Caractéristiques physico-chimiques.	23
1.2.5. Conservation.	24
1.2.6. Biosynthèse et composition chimique des huiles essentielles.	24
1.2.7. Toxicité	28
1.2.8. Domaines d'application des huiles essentielles.	28
1.3. Stress oxydant.	31
1.3.1. Les espèces oxygénées réactives.	31
1.3.2. Les antioxydants.	32
III. CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES.	
2.1. ETUDE DE LA REGION.	
2.1.1. Localisation géographique.	36
2.1.2. Exigences édaphiques	37

2.2.3. Exigences climatique	37
2.2. MATERIEL UTILISÉ.	
2.2.1. Matériel biologique.	38
2.2.2. Matériel non-biologique.	39
2.3. METHODES D'ETUDE.	
2.3.1. Taux d'humidité.	39
2.3.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.	40
2.3.3. Rendement en huiles essentielles.	40
2.3.4. Contrôle physico-chimique.	41
2.3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS.	
2.3.6. Activité antimicrobienne.	43
2.3.7. Activité antioxydante.	44
2.3.8. Analyses statistiques.	45
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	
3.1. Taux d'humidité de la matière végétale.	48
3.2. Rendement en huiles essentielles.	49
3.3. Caractéristiques organoleptiques.	52
3.4. Caractéristiques physico- chimique des huiles essentielles.	53
3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS.	53
3.6. Etude de l'activité antimicrobienne.	59
3.7. Etude de l'activité antioxydante.	66
CONCLUSION	
APPENDICE	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

- Figure 1.1 : Aspect général, feuilles et inflorescences de *Mentha longifolia L.*
- Figure 1.2: Interactions des plantes avec leur environnement.
- Figure 1.3 : Dispositif expérimental de l'hydrodistillation (type Clevenger).
- Figure 1.4 : Biosynthèse des terpenoïdes et phenylpropanoïdes.
- Figure 1.5: Mécanisme réactionnel de système enzymatique.
- Figure 2.1 : Localisation géographique de la zone d'étude (wilaya de Tamanrasset).
- Figure 2.2 : Vue générale des touffes de *Mentha longifolia L.* Tamanrasset.
- Figure 2.3 : Montage de l'hydrodistillation (type Clevenger).
- Figure 2.4 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant.
- Figure 3.1 : Taux d'humidité des feuilles séchées de *Mentha longifolia L.*
- Figure 3.2 : Huile essentielle de *Mentha longifolia L.*
- Figure 3.3: Variation de pourcentage d'inhibition pour l'huile essentielle de *Mentha longifolia L.*
- Figure 3.4: Variation de pourcentage d'inhibition pour le standard (Vitamine C).
- Figure 3.5 : Détermination graphique d'EC50 de l'huile essentielle.
- Tableau 1.1 : Les principales espèces oxygénées réactives.
- Tableau 2.1: Données météorologiques de la région de Tamanrasset.
- Tableau 2.2: Micro-organismes testés.
- Tableau 3.1: Rendement en huile essentielle de *Mentha longifolia L.*
- Tableau 3.2 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia L.* Analysée.
- Tableau 3.3: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia L.*
- Tableau 3.4: Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle *Mentha longifolia L.* analysés par CPG/MS.
- Tableau 3.5 : Résultats de l'activité antibactérienne.
- Tableau 3.6 : Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle.
- Tableau 3.7: Quelques travaux antérieurs sur l'efficacité antioxydante.

INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (**AMARTI et al., 2011**).

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant d'une part, l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, en raison des effets secondaires des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluènebutylé (BHT), qui peuvent être responsables des dommages du foie et de la carcinogénèse et de la résistance que les micro-organismes pathogènes établissent contre les antibiotiques (**DJERIDANE et al., 2010 ; YAKHLEF et al., 2011**). Le développement de nouvelles voies de recherche pour aboutir à des alternatives apparaît donc indispensable. Par ailleurs, les substances naturelles douées d'activité antimicrobienne et antioxydante présentent un intérêt socio-économique très important dans le domaine de la recherche bio-pharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers la recherche des substances bioactives et leur valorisation (**AMARTI et al., 2011 ; AOUNI et al., 2013**).

La flore du Sahara central est restée jusqu'en 1928 seulement connue par des récoltes d'explorateurs et de militaires et par des Touaregs. L'étude de la flore et de la végétation montre l'existence d'espèces propres au Sahara (tamaris, palmier), auxquelles s'ajoutent des éléments méditerranéens (olivier, myrte, lavande) et tropicaux (acacias, balanites) (**CHENOUNE, 2005**).

Aussi, en raison de son altitude élevée, le Hoggar, moins chaud et moins aride que la plaine désertique, a servi de refuge à des plantes qui sont exclues de celle-ci, et notamment à des reliques de souches méditerranéennes ou tropicales qui, autrefois, ont atteint ces massifs à la faveur des périodes plus humides. On y observe un taux d'endémisme élevé, qui croît avec l'altitude (**OZENDA, 1983**).

Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années (**LAIB, 2012**).

Ce travail a pour objet l'investigation de ces plantes qui représentent une source potentielle pour la découverte de nouvelles molécules naturelles bioactives (TEUSCHER *et al.*, 2005). La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (AMARTI *et al.*, 2011). Ces dernières, sont d'intérêt croissant pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires et la recherche scientifique en raison de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (DUNG *et al.*, 2008).

Dans ce contexte et afin de valoriser notre richesse, nous nous sommes intéressés à l'étude de *Mentha longifolia* L. de la famille des Lamiaceae., poussant à l'état spontané dans les lits pierreux des oueds et dans les roches au Hoggar.

En se servant de données ethno-pharmacologiques, le choix de cette espèce végétale s'est basé sur, d'une part, son endémisme (est une sous-espèce endémique de la région de Tamanrasset), et d'autre part, son application importante dans nos traditions locales, par les touaregs comme moyen incontournable de médication.

Cette étude est organisée en trois chapitres :

Le premier chapitre est un aperçu bibliographique sur la plante étudiée à savoir : la germandrée tomenteuse (*Mentha longifolia* L.) et des généralités sur les huiles essentielles.

Le matériel et les méthodes utilisées à savoir : les techniques d'extraction, la caractérisation de l'huile essentielle et aussi les protocoles utilisés au cours des tests biologiques concernant les activités antimicrobienne et antioxydante, sont présentés dans le second chapitre.

Le troisième chapitre aborde les résultats et la discussion.

Le manuscrit est achevé par une conclusion générale sur l'ensemble des résultats obtenus ainsi que des perspectives ont été dégagées.

Ce travail a été réalisé avec Djillali meriem et kerakar selma

CHAPITRE 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. MENTHE A FEUILLES LONGUES : *Mentha longifolia L.*

1.1.1. Origine et étymologie :

Menthe est la francisation du latin *Mentha*, on le retrouve également chez les Romains « *Mentha* » et les Grecs « *Mentha* ou *Minthê* ». Ce nom provient de celui d'une nymphe que Proserpine métamorphosa en plante (FRANÇOIS., 2012). Le nom grec de la plante signifie « dont l'odeur est douce » (DECLACHAUX et NIESTLES., 2013).

La Menthe fait partie de ce grand cortège de substances, ce sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiaceae* (JAHANDIEZ et MAIRE, 1932).

1.1.2. Noms vernaculaires :

- Tamâhaq : *Taihart, Tinhari*
- Arabe : Naanân
- Français : *Menthe sylvestre* - Famille : *lamiacées (labiées)*

1.1.3. Distribution:

Dans l'Ahaggar, on retrouve la Menthe à longues feuilles dans les lieux humides des montagnes. C'est une espèce cosmopolite, fréquente au bord des eaux (SAHKI et SAHKI.,2004) .

1.1.4. Description et écologie :

Plante vivace très odorante de 20 à 50 cm de haut, d'un vert grisâtre, entièrement couverte de poils soyeux. Feuilles lancéolées, dentées et sessiles. Inflorescences en épis, courts et denses, de couleur mauve. (SAHKI et SAHKI., 2004)

C'est une plante vivace sauvage ou cultivée, elle est souvent sub-spontanée .Les feuilles sont sessiles, opposées, à limbes gaufré muni de dents pointus, elles sont lancéolées de couleurs vert vif sur les deux faces (ABIDJAN, 2010).Les fleurs ,comportent un calice en forme de clochette , glabre ou ciliés ,divisé en 5 dents linéaires ;une corole violet pâle ,4 étamines saillantes de taille identique .La floraison a lieu de juillet à septembre (TEUSCHER et al., 2005).



Figure 1.1 : Aspect général, feuilles et inflorescences de *Mentha longifolia* L.

1.1.5. Propriété et utilisation :

La menthe fait partie de la culture méditerranéenne depuis des millénaires. Facilement reconnaissable grâce à son parfum particulier, la menthe verte sert généralement à la préparation du thé. Mais on trouve aussi son utilisation en photothérapie, en aromathérapie, en parfumerie et en cosmétologie (**BABA AISSA, 1999**)

Les Iraniennes utilisent généralement la plante contre les maladies infectieuses et trouve à être efficace contre ces problèmes sans aucune base scientifique pour expliquer cette action. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des agents pathogènes associés à des maladies infectieuses ainsi que des effets indésirables des antibiotiques a suggéré l'utilisation d'huile de la plante comme l'antibiotique ou de remplacement.

Une autre utilisation de cette plante est bien considérée comme un insectifuge, tant pour l'homme et des animaux domestiques. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les valeurs pratiques de l'application thérapeutique. (**LORENZI et al., 2002**).

De plus la menthe a de nombreuses vertus médicinales. Elle est préconisée comme antispasmodique, aphrodisiaque, analgésique elles permettent de calmer et d'apaiser les douleurs et aromatisant. Des études pharmacologiques ont démontré que cette huile essentielle est utilisée surtout pour les troubles digestifs, les spasmes, les inflammations, les colites, les états nauséux, et contre certains parasites. Elle présente un effet expectorant en cas de bronchite ou de grippe. Il est à mentionner qu'elle est à la fois rafraîchissant et analgésique (**LEUNG, 1996**).

La menthe entre dans l'aromatisation de certains produits, dont les dentifrices, les chewing-gums, les confiseries en générale et les boissons rafraîchissantes. Néanmoins, la menthe présente dans certains cas des effets indésirables. Aussi elle est généralement déconseillée aux femmes enceintes. Mais elle est par contre recommandée en cas de retard menstruel (**CRETI, 1981**).

1.2. Huiles essentielles :

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse HOHENHEIM pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**BURT, 2004**).

Plusieurs définitions de L'huile essentielle existent mais celle retenu par l'Association Française de Normalisation (**AFNOR, 2000**), la norme ISO (2013) et adopté par la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE (2008), est la suivante : « *Les huiles essentielles sont des produits odorantes et volatils généralement de composition complexe obtenus à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition* » (**NICOLAS, 2013 ; ZUZARTE et LIGIA, 2015**).

Cette définition est cependant restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé. Nous retenons alors que les huiles essentielles sont des mélanges de complexes aromatiques de plantes, extraits par distillation à la vapeur d'eau ou aux solvants (**LAHLOU, 2004 ; ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2013**).

Les plantes qui synthétisent les huiles essentielles sont connues sous le nom de « plantes aromatiques » (**POURMORTAZAVI et HAJIMIRSADEGHI, 2007**).

1.2.1. Répartition et localisation :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs (**BRUNETON, 2009**). Les familles botaniques les plus courants produisant les huiles essentielles sont : Abiétacées (pins, sapins, cèdres), Apiacées (anis, fenouil) Astéracées (absinthe, armoise blanche, camomille), Cupressacées (genévrier), Lamiacées (romarin, lavande, thym, origan), Lauracées (cannelle, laurier), Myrtacées (eucalyptus, giroflier, myrte), Poacées (citronnelle), Rutacées (citron, mandarine, pamplemousse) (**KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2013 ; MAFFEI, 2010**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Ces cellules sont le plus souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante recouvertes d'une cuticule (**BRUNETON, 2009 ; MAFFEL, 2010 ; ANTON et LOBSTEIN, 2005**).

Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches sécrétrices (*Myrtacées, Rutacées*), dans des canaux sécréteurs (*Apiacées, Astéracées*) ou dans des poils sécréteurs (*Lamiacées*) (**HAMMER et al., 2008 ; AHMADI et al., 2002 ; MORONE-FORTUNATO et al., 2010**).

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (**ANTON et LOBSTEIN, 2005**).

Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce et dans un même organe (**KARRAY-BOURAOUI et al., 2009 ; OUSSALAH et al., 2006**).

Les huiles essentielles sont issues de la sécrétion naturelle élaborée dans divers organes végétaux: les sommités fleuries (menthe, lavande), les feuilles (eucalyptus, laurier) et moins habituellement dans les rhizomes (gingembre), les fruits (anis), les écorces (agrumes, cannelle) et les graines (muscades) (**CAVA et al., 2007 ; WANNES et al., 2010**).

1.2.2. Fonction dans la plante :

La fonction biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure (**BRUNETON, 2009**). Il est toutefois vraisemblable qu'ils ont une fonction écologique (Figure 1.2) lors des interactions végétales, comme agent allélopathique, afin de réduire la compétition des autres espèces de plantes par l'inhibition de la germination des graines. En effet, le 1,8-cinéole et le camphre, libérés dans l'atmosphère sont absorbés par le sol sec, inhibant la germination des graines des espèces spontanées (**ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; THOMPSON et al., 2003 ; GUIGNARD et DUPONT**).

Elles interviennent aussi lors des interactions végétal- animal, comme agent de protection contre les prédateurs : insectes, champignons et bactéries par leurs propriétés antiseptiques, insecticides, fongicides et bactéricides (BAKKALI *et al.*, 2006 ; VIGAN, 2009 ; CARSON et HAMMER, 2011 ; UNSICKER *et al.*, 2009).

Elles sont aussi efficaces contre les herbivores par le gout et les effets défavorables sur le système nerveux (PORTER, 2001 ; GUIGNARD et DUPONT). Par leurs odeurs caractéristiques, les huiles essentielles interviennent également dans l'attraction des pollinisateurs (insectes et oiseaux) qui participent dans la dispersion du pollen ce qui favorise la pollinisation (BAKKALI *et al.*, 2006 ; CARSON et HAMMER, 2011 ; CSEKEA *et al.*, 2007). Les huiles essentielles protègent aussi, la plante contre le stress photo- oxydatif (PICHERSKY et GERSHENZON, 2002). Les constituants des huiles essentielles sont considérés comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire, protégeant la plante contre les facteurs atmosphériques (YAN et CHEN, 2007).

Certains auteurs considèrent que l'huile essentielle est une source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques. D'autre part, elle conserve l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (BEKHECHI *et al.*, 2010).

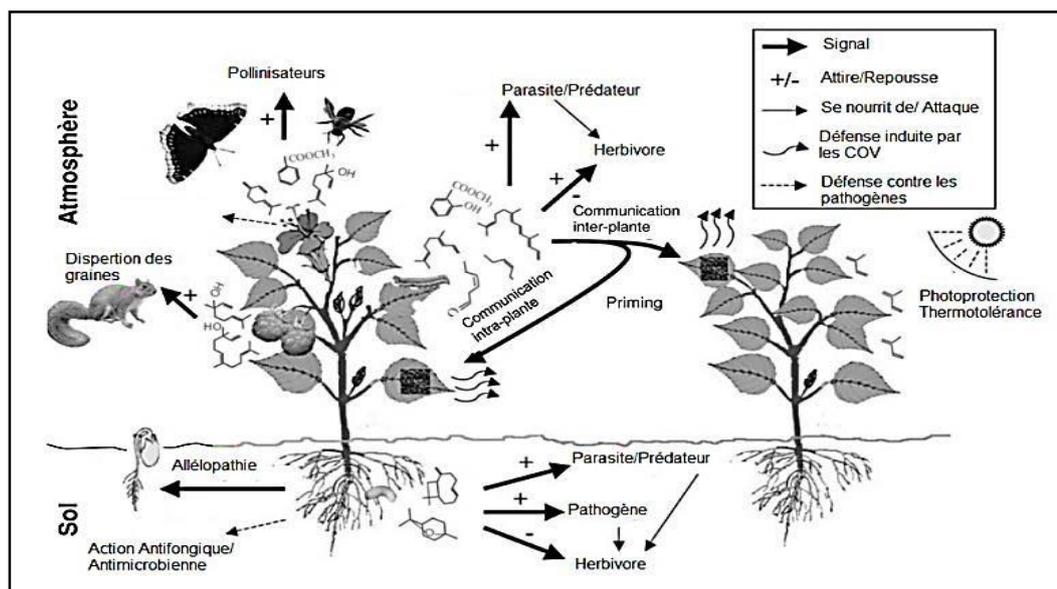


Figure 1.2: Interactions des plantes avec leur environnement (DUDAREVA *et al.*, 2006).

BRUNETON (2009) et BALDWIN (2006) signalent que l'huile essentielle peut constituer des supports à une « communication » plante - plante ou plante- environnement. La variété structurale de ses composés autorise le transfert de « messages biologiques » sélectifs.

1.2.3. Extraction :

L'extraction des huiles essentielles est une opération capitale qui doit permettre d'obtenir des produits volatils, particulièrement fragiles, sans altérer la qualité (**ROUX et al., 2008**). Le choix de la méthode d'extraction des huiles essentielles dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, rameaux), le rendement et les caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire aux températures élevées.

Les principales méthodes d'extraction des huiles essentielles peuvent être résumées en :

❖ Extraction par hydrodistillation :

C'est la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée, elle demeure la technique la plus employée pour extraire les huiles essentielles (**FERHAT et al., 2010**).

Elle consiste à immerger le matériel végétal directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant (Figure 1.3). L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité (**FERHAT et al., 2010 ; BASER et BUCHBAUER, 2010**).

FERHAT et al. (2010), CASSEL et al. (2009), ZHANG et al. (2012) & MONCADA et al. (2015) soulignent que les avantages de cette technique sont importants. Ils enregistrent des rendements élevés avec des extraits de haute pureté et Ils notent également que l'inconvénient principal est l'intensité de l'énergie et la température élevée affectant la qualité des huiles essentielles extraites.

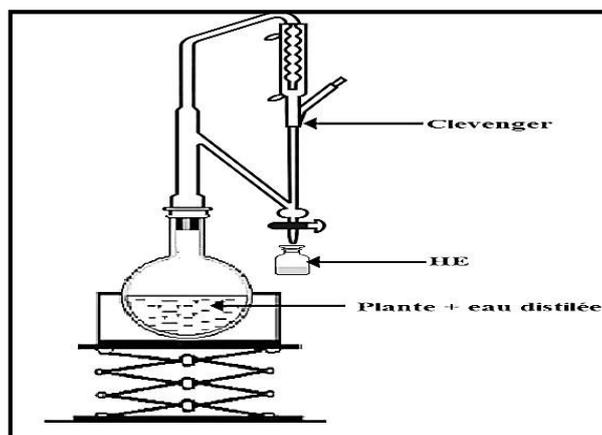


Figure 1.3 : Dispositif expérimental de l'hydrodistillation (type Clevenger)
(BRUNETON, 2009).

BOUKHATEM et al.(2010) confirment que le chauffage prolongé et puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations et/ou des oxydations.

❖ Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit au contact avec l'eau (**LAHLOU, 2004 ; FERHAT et al., 2010**).

La vapeur d'eau qui s'est volatilisée et entraînée l'huile essentielle, se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité (**ROUX et al., 2008**).

Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts (**FERHAT et al., 2010**).

❖ Hydrodiffusion :

Cette technique consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant (**BRUNETON, 2009 ; ROUX et al., 2008**).

L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps et d'énergie (**BRUNETON, 2009 ; ROUX et al., 2008**).

Ces procédés présentent des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition. En effet, certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydro-distillation.

❖ **Extraction par enfleurage :**

L'industrie des parfums a utilisé l'enfleurage pour les organes fragiles comme les fleurs. Ce procédé permet d'obtenir des essences dites absolues. Il consiste à extraire les principes aromatiques des plantes par des corps gras qui se saturent d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous vide (**BOUKHOBZA et GOETZ, 2014 ; ABOUGHE ANGONE et al., 2015**).

❖ **Expression à froid :**

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Elle consiste à exercer sur les fruits une pression pour extraire les huiles essentielles présentes dans leur écorce (**BRUNETON, 2009 ; ROUX et al., 2008 ; ABOUGHE ANGONE et al., 2015 ; MARROUF et TREMBLIN, 2009**). L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (**ROUX et al., 2008 ; FERHAT et al., 2010**).

Cette technique uniquement mécanique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenus dans la fraction non volatile de l'essence, le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique (**ROUX et al., 2008 ; FERHAT et al., 2010**).

Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes (**ROUX et al., 2008 ; FERHAT et al., 2010**).

❖ **Extraction par solvants :**

Ce procédé d'extraction ne permet pas d'obtenir des huiles essentielles, mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Les solvants généralement utilisés sont des hydrocarbures aliphatiques : hexane, éther de pétrole, cyclohexane, propane et butane liquide (**BRUNETON, 2009**).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également des composés non volatils tels que les cires, les pigments, les acides gras et bien d'autres composés (**ROBERT, 2000**). Purifié par l'alcool absolu, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle (**PROUST, 2006 ; DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002**).

BRUNETON (2009) signale que l'inconvénient majeur de l'extraction par les solvants est leur manque de sélectivité. En effet, de nombreuses substances lipophiles peuvent se retrouver dans les concrètes et impose une purification ultérieure. Un autre inconvénient réside dans la toxicité des solvants (problème des résidus dans le produit final).

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (**FERHAT et al., 2010**).

Pour raccourcir le temps de traitement, limiter l'altération des constituants de l'huile essentielle et économiser l'énergie, il est possible de travailler en surpression modérée (**QUATTROCCHI, 2012**).

Parmi ces techniques innovantes, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons, l'extraction par les fluides supercritiques (**FERHAT et al., 2010 ; HEMWIMON et al., 2007**).

❖ **Extraction par micro-ondes :**

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques.

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement microondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles

sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (MARROUF et TREMBLIN, 2009 ; BRUNETON, 2009 ; HATTAB et *al.*, 2007).

L'évaporation de l'eau contenue dans les cellules, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (DURAFFOURD et LAPRAZ, 2002).

Un système de refroidissement à l'extérieur permet la condensation de distillat composé d'eau et d'huile essentielle facilement séparable par simple décantation (BRUNETON, 2009 ; HATTAB et *al.*, 2007).

Cette technique présente des avantages notamment : la rapidité, économie de temps et d'énergie. Le procédé utilisé donne un produit qui, le plus souvent, est de qualité supérieure à celle de produit d'hydrodistillation traditionnelle (dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées), extrait dépourvu de solvant résiduel (CHIASSON et *al.*, 2001 ; PREEMA DEVI et *al.*, 2015).

❖ **Extraction assistée par ultra-sons :**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute Pression) et de raréfaction (basse pression) (WANG et WELLER, 2006). Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression. La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité de matière (PETRIER et *al.*, 2008). ❖

Extraction au CO₂ supercritique :

C'est un procédé d'extraction, par fluide supercritique, utilise le CO₂ sous très haute pression et à basse température pour extraire les huiles essentielles. Il s'agit d'une énergie efficace, processus respectueux de l'environnement (méthode verte). Les organes de la plante sont placés dans une cuve en acier inoxydable et le CO₂ est injecté dans le réservoir. Sous haute pression, il se transforme en CO₂ liquide et agit comme un solvant pour extraire l'huile

essentielle de la plante. Lorsque la pression est diminuée, CO₂ retourne à l'état gazeux ne laissant que l'huile volatile et aucun autre résidu n'est accumulé (**FERHAT et al., 2010**).

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité, de composition très proche de celle des arômes végétaux naturels (**BRUNETON, 2009 ; WENQIANG et al., 2007**).

Les extractions au CO₂ supercritique, à des températures plus basses, sont plus douces sur les échantillons de plantes par rapport à distillation à la vapeur (absence de réarrangements et d'hydrolyse). En outre, elle produit des rendements plus élevés. De nombreuses molécules qui ne peuvent pas être extraites par distillation à la vapeur sont obtenues avec extraction du CO₂ (**BRUNETON, 2009**).

Le CO₂ est relativement non toxique, non- inflammable, disponible en haute pureté, de faible coût et peut être facilement retiré de l'extrait. Le principal inconvénient de CO₂ est son manque de polarité pour l'extraction des analytes polaires (**POURMORTAZAVI et HAJIMIRSADEGHI, 2007 ; PREEMA DEVI et al., 2015**).

1.2.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation. Généralement incolores ou jaune pâle, les essences sont liquides à température ambiante. la nature huileuse la rend liposolubles ainsi elles sont peu solubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses et dans les alcools (**BRUNETON, 2009 ; GUPTA et al., 2010 ; MARTIN et al., 2010**).

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran (*Sassafras albidum*), de girofle (*Eugenia caryophyllata*) ou de cannelle (*Cinnamomumzeylanicum*) constituent des exceptions (**BRUNETON, 2009 ; GUPTA et al., 2010 ; MARTIN et al., 2010**).

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. En raison de la structure de leurs molécules (présence de doubles liaisons et des groupes fonctionnels tels que un groupe hydroxyle, aldéhyde, ester). Elles sont facilement oxydées par la lumière, la chaleur et l'air (**Skold et al., 2010 ; Skold et al., 2008**).

Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit à la perte de ses propriétés. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (**BASER et BUCHBAUER, 2010**).

2.5. Conservation :

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables si l'on veut éviter leur oxydation et leur dépolymérisation. Aussi convient-il d'utiliser des flacons de verre colorés ou opaques, munis de bouchons bien adaptés pour les préserver de l'air et de la lumière, principaux agents de la dégradation (**BARDEAU, 2009 ; PREEMA DEVI et al., 2015**).

Bien stockées, les huiles essentielles se conservent environ trois ans. Seules les essences d'agrumes, d'une conservation plus fragile, se renouvellent tous les ans (**ROUX et al., 2008**).

2.6. Biosynthèse et composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés volatils, beaucoup contiennent environ 20 à 60 composés, même si certains peuvent contenir plus de 100 différents composants (**MIGUEL, 2010 ; SELL, 2006**).

Ces composés peuvent être classés en deux catégories principales : le groupe des terpénoïdes et le groupe des phénylpropanoïdes (**ANDRADE et al., 2011 ; REGNAULT-ROGER et al., 2008**).

➤ Terpénoïdes :

Les composés terpéniques constituent une famille de composés largement répandue dans le règne végétal et les principaux constituants des huiles essentielles. Ils sont synthétisés (figure 1.4) à partir d'un précurseur unique appelé l'isopentenyl pyrophosphate (IPP = C_5H_8) (**ZUZARTE et LIGIA, 2015**).

Cette unité isoprénique à 5 atomes de carbone peut être synthétisée dans le cytoplasme via la voie du mévalonate et conduit à la formation de la plupart des sesquiterpènes ou dans les plastides via la voie non mévalonique (la voie de déoxy xylulose phosphate) produisant principalement des monoterpènes et diterpènes (**ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; EISENREICH et al., 2000 ; DUBEY et al., 2003**).

La voie du mévalonate (Figure 1.5) consiste en la condensation de trois molécules d'acetylCoA pour former l'acetoacetylCoA qui se transforme après une chaîne des réactions enzymatiques et consommatrices d'énergie en mévalonate 5-diphosphate, puis une réaction de décarboxylation permet de transformer ce dernier en IPP (**BASER et DEMIRCI, 2007 ; ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; DUBEY et al., 2003**).

Alors que pour la voie non mévalonique (Figure 1.4), la condensation tête à tête de glyceraldehyde3-phosphate avec le pyruvate conduit à la formation de 1-deoxy-Dxylulose-5-phosphate (DOXP) qui subit par la suite une chaîne des réactions enzymatiques, aboutissent à la formation du 1-hydroxy-2-méthyl-2(E) butenyl-4PP (HMBPP), qui sous l'action de HMBPP réductase se transforme en IPP (**BASER et DEMIRCI, 2007 ; ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; EISENREICH et al., 2000 ; DUBEY et al., 2003**). Après la synthèse de l'unité isoprénique, des réactions de condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isopréniques aboutissent à formation des différentes classes terpéniques : des monoterpènes C₁₀ (issus de la condensation de 2 unités isopréniques), des sesquiterpènes C₁₅ (3 unités isopréniques), des diterpènes C₂₀ (4 unités isopréniques) et des triterpènes C₃₀ (6 unités isopréniques) (**ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; DUBEY et al., 2003**).

Pour chaque classe de terpène, des différentes réactions chimiques, cyclisation fonctionnalisation, réarrangement, permettent de former diverses structures terpéniques à partir d'un précurseur unique (**BRUNETON, 2009**).

➤ **Phénylpropanoïdes :**

Ces composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C₆ - C₃) sont beaucoup moins fréquents que les terpénoïdes (**BRIGITTE-MILPIED, 2009**).

Beaucoup des Phénylpropanoïdes trouvés dans les huiles essentielles sont des phénols (allylphénols et propénylphénols) ou des éthers de phénols, parfois des aldéhydes (**BRUNETON, 2009 ; ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; KALOUSTIAN et HADJIMINAGLOU, 2013**). Ils sont constitués d'une chaîne de trois carbones liée à un noyau aromatique à six carbones (C₆ - C₃) où la C₆ étant un cycle benzénique (**BRIGITTE-MILPIED, 2009**).

Les phénylpropanoïdes sont synthétisés (Figure 1.4) par la voie de l'acide shikimique, leurs principaux précurseurs étant l'acide cinnamique provenant de l'acide aminé aromatique phénylalanine (**ZUZARTE et LIGIA, 2015**).

L'acide shikimique est synthétisé à partir du phosphoénolpyruvate. L'élimination de l'un des alcools cycliques de l'acide shikimique et la réaction avec du pyruvate de phosphoénol donne l'acide chorismique. Ce composé forme le squelette de l'acide phénylpropionique. L'amination et la réduction de la fonction cétone de l'acide chorismique produit l'acide aminé phénylalanine. En outre, l'aromatisation de l'acide shikimique donne des dérivés de l'acide benzoïque, présents dans plusieurs huiles essentielles (**ZUZARTE et LIGIA, 2015 ; SELL, 2006**).

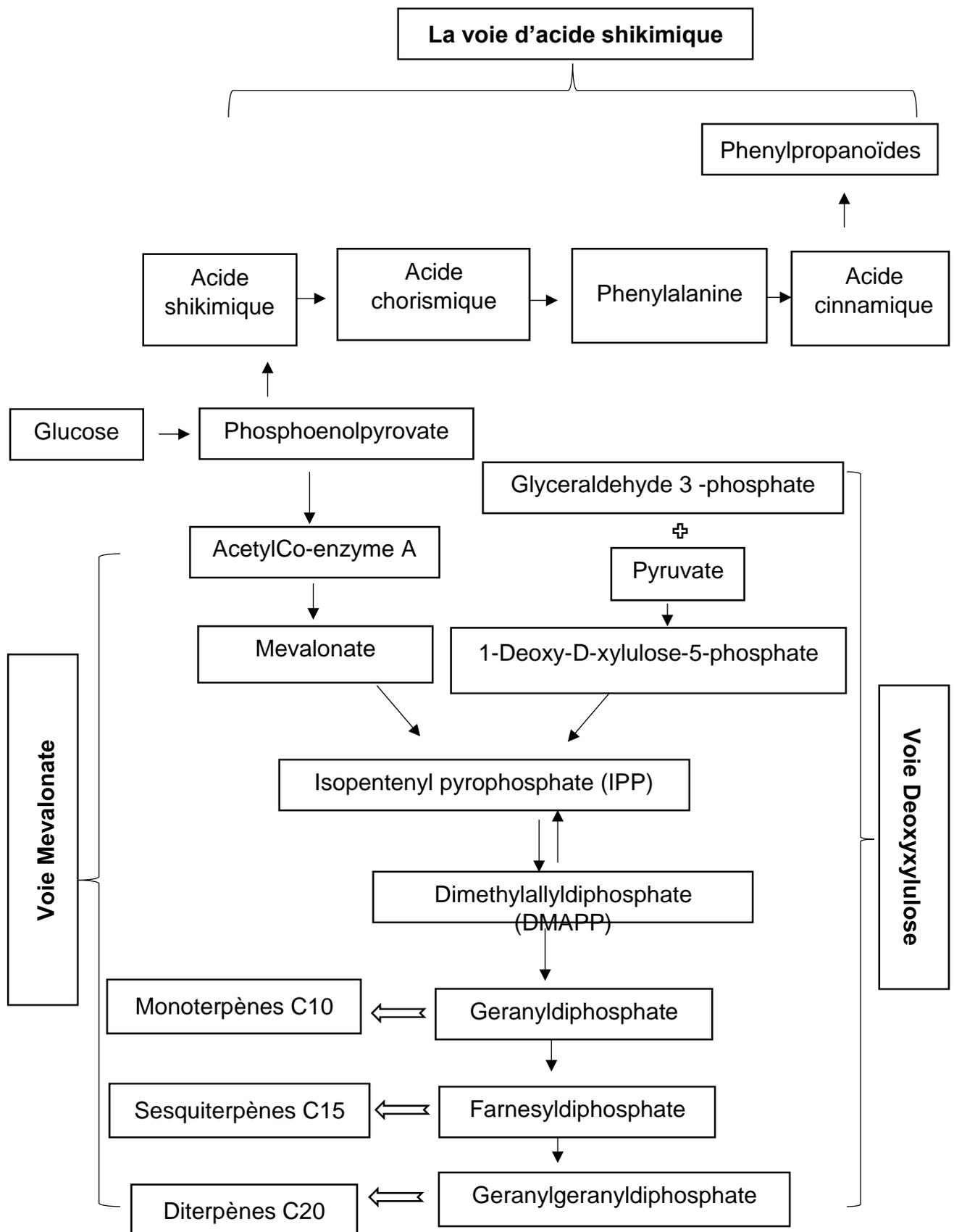


Figure 1.4 : Biosynthèse des terpenoïdes et phenylpropanoïdes (ZUZARTE et LIGIA, 2015).

1.2.7. Toxicité :

En dépit de leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être nontoxiques. La majorité des huiles essentielles, causent des effets toxiques (**CARSON et HAMMER, 2011**). La toxicité des huiles essentielles est très variable en fonction de leur composition il est très intéressant de connaître que :

- Les huiles essentielles à cétones sont neurotoxiques.
- Les huiles essentielles à terpènes sont irritantes et néphrotoxiques.
- Les huiles essentielles à phénols ont une action caustique sur la peau et sont hépatotoxique.

Les huiles essentielles doivent toujours être utilisées diluées. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise (**ROUX et al., 2008**).

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires qui ont une toxicité par voie orale faible ou très faible. La majorité de celles qui sont couramment utilisées ont une DL₅₀ comprise entre 2 et 5 g/kg (anis, l'eucalyptus et girofle) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieures à 5 g/kg (camomille lavande). Les mêmes observations peuvent être faites pour les constituants des huiles essentielles. En effet, rares ceux sont qui ont une DL₅₀ < 2 g/kg (camphre : 1,47 g/kg et thujone : 0,2 g/kg). Ces données, testées chez l'animal, ne fournissent que des indications relatives. Les observations cliniques chez l'homme montrent que des intoxications aiguës sont possibles, même lorsque la DL₅₀ est élevée (**BRUNETON, 2009**). La toxicité hépatique de *Mentha longifolia* L.. Provenant de la Turquie a été attribué au néoclérodane diterpénoïdes (**CAKIR et al., 1998**)

1.2.8. Domaines d'application des huiles essentielles :

Actuellement, près de 3000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans l'industrie pharmaceutique et thérapeutique (préparation de matière première), l'industrie cosmétique (savons, parfums, dentifrices, eaux de toilettes) ainsi que l'industrie agro-alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons) (**KHIA et al., 2014 ; DJILANI et DICKO, 2012**). En raison d'une part, de leurs activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques (**DUNG et al., 2008 ; ALITONOU et al., 2013**) et d'autre part, de ce que la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que

conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**EYELE MVE MBA et al., 1994 ; RASOOLI et al., 2008**).

Ces activités spécifiques sont liées aux différents composants qu'elles contiennent. Leur composition chimique est d'une grande complexité, ce qui les rend inimitables car chaque huile essentielle regroupe en réalité plusieurs substances aromatiques très élaborées et très différentes (**ABOUGHE ANGONE et al., 2015**).

□ **En industrie pharmaceutique et thérapeutique :**

L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique.

Leurs applications dans ce domaine sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain (**SOTOMENDIVIL et al., 2006**). Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (**OURAINI et al., 2007**).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique.

Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**DE BILLERBECK, 2007**).

Elles sont connues pour leur activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances qui pourraient être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (**GACHKAR et al., 2007 ; RASOOLI et al., 2008**).

HAJLAOUI et al. (2008) ont prouvé que l'huile essentielle de la menthe à feuilles longues a une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, deux champignons : *aspargillus niger* et *fusarium oxysporum* et la levure : *Candida albicans*

• **En industrie cosmétique :**

Les huiles essentielles ont été répandues, pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, en raison de leurs activités biologiques intéressantes.

L'huile essentielle de romarin est largement appliquée dans l'industrie cosmétique pour produire diverses eaux de Cologne, essences de bain, lotions capillaires et shampoings et comme une composante du désinfectant (**BOUSBIA et al., 2009 ; HOSNI et al., 2013**).

- **En industrie agro-alimentaire :**

En plus de la saveur contribué aux aliments, beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient empêcher la croissance des microorganismes pathogènes, en améliorant de ce fait la sécurité alimentaire (**PIYO et al., 2009 ; HADIZADEH et al., 2009**).

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques (**HUSSAIN et al., 2010**).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA), ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit et yaourts) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (**CAILLET et LACROIX, 2007**).

TSAI et al. (2010) & SLAMENOVÁ et al. (2010) ont décrit ces produits naturels en tant que protecteurs efficaces contre le cancer, les dommages oxydatifs et des agents pathogènes d'origine alimentaire.

- **En industrie des pesticides :**

Dans la recherche d'alternatives aux pesticides de synthèse, les huiles essentielles de plantes aromatiques ont été largement étudiées et certains d'entre eux sont commercialisés comme biopesticides (**CANTRELL et al., 2012**).

Contrairement aux pesticides de synthèse, généralement basée sur un seul ingrédient, les huiles essentielles ont un mélange complexe de composants qui les rendent aptes à éviter la résistance de site cible, puisque leurs composants peuvent interagir en synergie ou additive (**ISMAN et al., 2011**).

Les substances d'origine naturelle et plus particulièrement les huiles essentielles détiennent actuellement une place importante dans les systèmes de lutte, leur rôle

dans la recherche phytopharmaceutique dans certains pays du monde n'est plus à démontrer (LAHLOU, 2004).

1.3. Stress oxydant :

1.3.1. Les espèces oxygénées réactives:

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (Tableau 1.1) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (BARTOSZ, 2003 ; HALLIWELL et WHITEMAN, 2004).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes. Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (LEHUCHER-MICHEL et al., 2001).

L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne qui se caractérise par trois étapes ; (i) initiation, (ii) propagation et (iii) terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante (KOECHLINRAMONATXO, 2006).

Tableau 1.1 : Les principales espèces oxygénées réactives (BARTOSZ, 2003).

Nom	Symbol
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxydinitrite	$ONOO^-$

1.3.2. Les Antioxydants :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (BERGER, 2006).

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques

❖ Systèmes enzymatiques :

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) la superoxydedismutase (SOD), (ii) la catalase (CAT) et (iii) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**LEHUCHER-MICHEL et al., 2001**). Le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

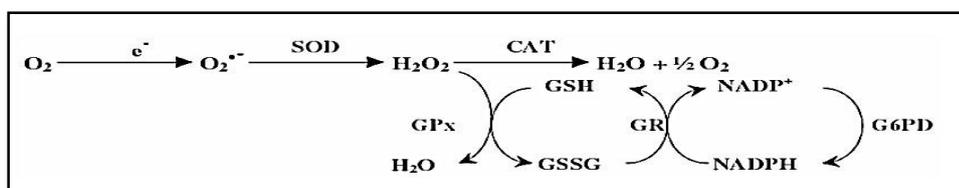


Figure 1.6: Mécanisme réactionnel de système enzymatique.

- La superoxydedismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (**ZELKO et al., 2002**).
- La catalase agit en synergie avec la SOD, son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**SORG, 2004**).
- La glutathion peroxydase (GPx) joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène
- La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (**SORG, 2004**).

❖ Systèmes non enzymatiques :

Ce groupe de systèmes anti-oxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque (**FAVIER, 2003**). De tous ces composés endogènes synthétisés

par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (FAVIER, 2003).

La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (NEUZIL et STOCKER, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents prooxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (MARTINEZ-CAYUELA, 1985).

Les oligoéléments Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (GARAÏT, 2006).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (KOECHLIN-RAMONATXO, 2006 ; PINCEMAIL *et al.*, 2002).

La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (PINCEMAIL *et al.*, 2002).

Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et huiles essentielles apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres (KOECHLIN-RAMONATXO, 2006).

❖ Les antioxydants synthétiques :

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels (LISU *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation

d'antioxydants de synthèse est remise en question du fait d'effets négatifs sur la santé du consommateur (effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes) (**BOURKHISS et *al.*, 2010**).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. Etude de la région :

2.1.1. Localisation géographique :

L'étude a été menée dans la région du Hoggar, la wilaya de Tamanrasset qui se situe dans le grand sud Algérien, à plus de 2000 km d'Alger, avec une superficie de 558 310 Km²,

limitée au Nord par les wilayas de Ghardaia et Ouargla, à l'Ouest par la wilaya d'Adrar, à l'Est par la wilaya d'Iliziet au Sud par les républiques du Niger et Mali (Figure 2.1).

Du point de vue géographique, elle est comprise entre 22° et 29° de latitude Nord et entre 5° et 53° de longitude Est. Elle est caractérisée par une altitude de 1450 m (**RAMDANE et al., 2015**).

Le Hoggar, dont le centre est constitué par un énorme appareil volcanique, l'Atakor, qui culmine à 3 003 m, au Tahat (plus haut sommet d'Algérie). Il est situé entre les 12^{ème} et 25^{ème} parallèles de l'hémisphère Nord, à cheval sur le tropique du Cancer, et les 3^{ème} et 6^{ème} méridiens Est de Greenwich.

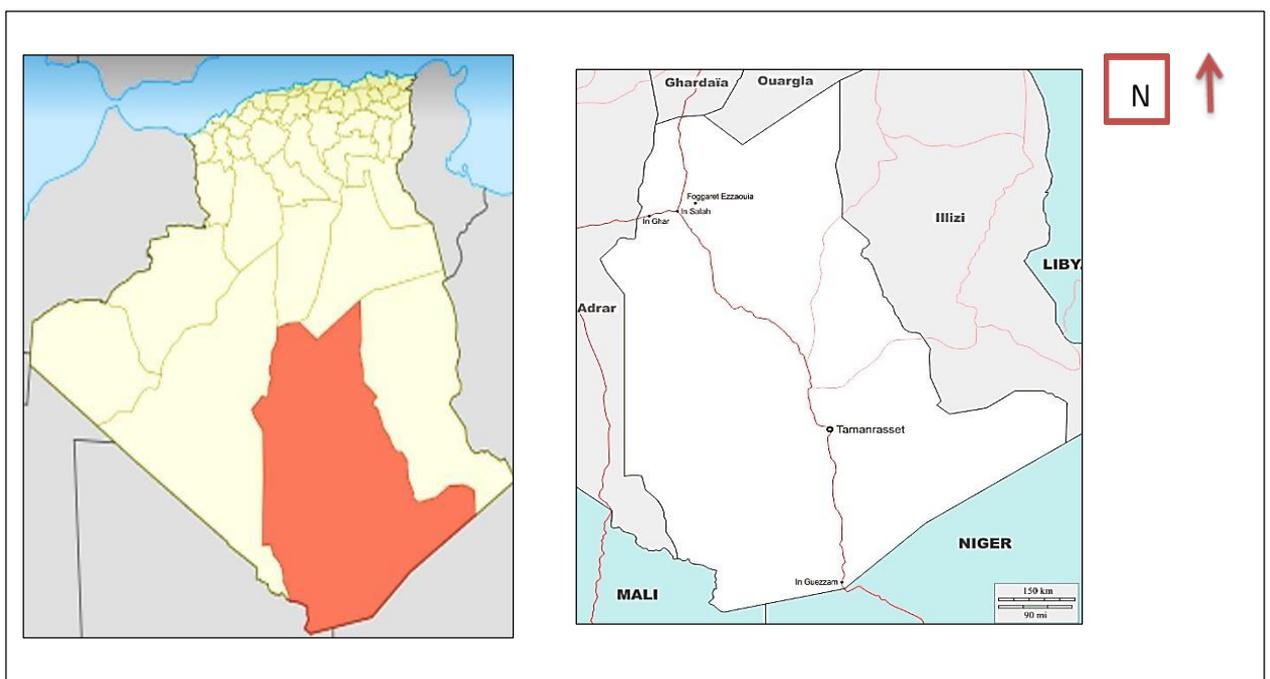


Figure 2.1 : Localisation géographique de la zone d'étude (wilaya de Tamanrasset).

2.1.2. Sol :

En général, les sols rencontrés dans cette région se révèlent peu ou très peu évolués, suite à une humidité insuffisante. Ce sont des sols azonaux, bruts (**OZENDA, 1983**), avec des profils peu différenciés voire inexistantes (**CHENOUNE, 2005**).

2.1.3. Climat :

Le climat du Hoggar, de type « tropical peu méditerranéen », est désertique plus par la faiblesse des précipitations que par leur rareté. Quant au régime thermique, il est très contrasté, influencé par l'altitude et la latitude.

En effet, les valeurs de la moyenne mensuelle des précipitations de la région de Tamanrasset (Tableau 2.1) données par National oceanic and atmospheric (NOAA), pour la décennie (2003- 2013), ont montré que les précipitations les plus importantes sont enregistrées au cours de la période allant de Juillet à Octobre dont le mois le plus pluvieux est Octobre avec une moyenne de 10.7mm. Alors que la période sèche apparaît à partir du mois de Novembre avec un minimum en Avril de 0.2 mm.

Au Hoggar, les précipitations se produisent généralement de mai à septembre, suite à la remontée du front intertropical sur la zone saharienne et l'extrême sud algérien. Dans ses conclusions générales sur les caractères principaux des pluies sahariennes, elles sont rares et généralement de faible importance quantitative (CHENOUNE, 2005).

Tableau 2.1: Données météorologiques de la région de Tamanrasset, pour la période 2003-2013, recueillies par National oceanic and atmospheric (NOAA).

Mois	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jui	Juit	Aou	Sep	Oct	Nov	Déc
Température (°C)	13.0	15.7	20.1	24.3	26.9	29.5	30.4	29.2	28.1	23.5	17.3	14.7
Précipitation (mm)	0.7	1.8	2.8	0.2	0.5	7.4	7.4	10.3	7.4	10.7	0.4	0.7

L'analyse des valeurs de la moyenne mensuelle de la température de la région de Tamanrasset (Tableau 2.1) données par National oceanic and atmospheric (NOAA), pour la décennie (2003- 2013), ont montré que les mois de Juin, Juillet et Aout sont les plus chauds de l'année avec 29.5 °C, 30.4°C et 29.2°C respectivement. Tandis que janvier le mois le plus froid, avec des minima absolus avoisinant des températures très basses (13 °C).

2.2. Matériel utilisé :

2.2.1. Matériel biologique :

❖ Matériel végétal :

L'étude a été réalisée sur des feuilles du *Mentha longifolia* L. (Figure 2.2).



Figure 2.2 : Vue générale des touffes de *Mentha longifolia* à Tamanrasset.

L'identification des plantes s'est faite par, les chercheurs de l'Institut National de Réserve Forestière (INRF) à Tamanrasset, en se référant à (**OZENDA ,1991**).

La récolte s'est effectuée au mois de Mars 2019 dans la station d'Illamen (HoggarTamanrasset). Les échantillons ont été séchés dans un endroit sec, à température ambiante pendant une semaine pour éviter le développement des microorganismes et à l'abri de la lumière afin de garder l'aspect biochimique des molécules.

Après la détermination du taux d'humidité, les feuilles de chaque plante ont été broyées, à l'aide d'un broyeur (type Medicaalex). Une poudre verdâtre est obtenue et conservée soigneusement dans des bocaux bruns et hermétiquement fermés où ils sont placés dans un endroit sec.

❖ **Micro- organismes**

L'activité antimicrobienne de L'huile essentielle étudiée a été réalisée, , sur huit microorganismes référenciées (Tableau 2.2).

Tableau 2.2: Micro-organismes testés.

Bactéries gram négatif	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	ATCC 27888
Bactéries gram positif	

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 65388
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 66333
Levure	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10235
Champignons	
<i>Aspergillusniger</i>	ATCC 10619
<i>Fusariumoxysporum</i>	ATCC 10328

❖ **Matériel non biologique :**

La verrerie, l'appareillage et les réactifs utilisés sont mentionnés dans l'Appendice A.

2.3. Méthodes d'étude :

2.3.1. Taux d'humidité :

Le taux d'humidité consiste à une perte de poids par dessiccation (**LAZOUNI et al., 2007**). La détermination de taux d'humidité a été effectuée selon la méthode décrite par BOUKSSAIM (2013) et AOAC (2000) : Pour cela, des capsules contenant une masse de $5 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de feuilles séchées des différents échantillons ont été mises dans une étuve de type Binder à $105 \pm 5^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. A la sortie de l'étuve, les capsules sont refroidies dans un dessiccateur. La pesée est réalisée chaque 3 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

La moyenne des pertes en poids est calculée et le taux d'humidité est déterminé par la formule suivante:

$$H = \frac{(P_i - P)}{P_i} \times 100$$

H : Taux d'humidité (%).

P_i : Masse de l'échantillon avant séchage en étuve (g).

P : Masse de l'échantillon après séchage en étuve (g).

2.3.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation :

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée au niveau du Laboratoire D'amélioration des plantes, Département des Biotechnologies, Université de Blida1.

L'obtention de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger (1928) (Figure 2.3). La méthode appliquée est celle décrite dans la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE (2005). Une masse de 100 g de matériel végétal sec est immergée dans 500 ml de l'eau distillée dans un ballon de 2 litres, avec ajout de quelques grains de pierre ponce. Le mélange est ensuite porté à ébullition. La durée d'extraction est de l'ordre de trois heures en moyenne, après la récupération de la première goutte de distillat.

L'huile essentielle obtenue, moins dense que l'eau, est récupérée dans un petit flacon opaque et conservée à 4 °C à l'obscurité en présence de sulfate de magnésium ($MgSO_4$) anhydre, pour éliminer les traces d'eau.



Figure 2.3 : Montage de l'hydrodistillation (type Clevenger).

2.3.3. Rendement en huiles essentielles :

Le rendement en huiles essentielles, est exprimé par le volume de l'huile essentielle obtenue en millilitre par rapport à 100 g de la matière sèche.

Le rendement en huile essentielle est donné par l'équation suivante (SAHRAOUI et *al.*, 2016):

$$RHE (\%) = (MHE / MS) * 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle (%)

M_{HE} : masse d'huile essentielle (g).

M_S : masse sèche de matière végétale (g).

2.3.4. Contrôle physico-chimique :

Selon les recommandations de l'AFSSAPS., les Pharmacopées Européenne et Française et la norme ISO, les contrôles physico-chimiques de l'huile essentielle sont nécessaires pour évaluer leur qualité à savoir : La densité relative, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire et l'indice d'acide.

❖ Mesure de la densité relative :

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et la masse d'un volume égal d'eau à la même température (**KALOUSTIAN et HADJI-MINAGLOU, 2013**).

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE (2005), le pycnomètre est rempli avec de l'eau distillée, puis sa masse est mesurée à l'aide d'une balance hydrostatique. Une pesée du même volume d'huile essentielle est effectuée. La densité relative est calculée selon la formule suivante :

$d_{HE} =$	m_1/m_2
------------	-----------

d_{HE} : Densité de l'huile essentielle.

m_1 : Masse en gramme d'un volume d'huile essentielle.

m_2 : Masse en gramme du même volume d'eau distillée.

❖ Mesure de l'indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'un milieu est le rapport de la vitesse de la lumière dans le vide et de la vitesse de la lumière dans ce milieu. Il détermine les propriétés optiques d'une substance et se mesure à l'aide d'un réfractomètre (**SEGUIN et al., 2010**).

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE (2005), l'indice de réfraction consiste à étalonner le réfractomètre avec de l'eau distillée. Ensuite, mettre quelques gouttes d'huile essentielle dans l'appareil. Le réfractomètre est réglé jusqu'à ce qu'il se stabilise et donne des lectures au minimum à la troisième décimale près.

❖ **Mesure du pouvoir rotatoire :**

Lorsqu'une solution aqueuse est traversée par un faisceau de lumière polarisé, le plan de polarisation de la lumière s'oriente vers un angle. La valeur de cet angle, ajustée à la concentration de la solution et à l'épaisseur de la couche liquide traversée, définit le pouvoir rotatoire spécifique ou l'activité optique de la substance.

La solution aqueuse, est positive lorsque le plan de polarisation de la lumière tourne vers la droite (dextrogyre), et négative (lévogyre) lorsqu'il tourne vers la gauche (**TEIXEIRA DA SILVA, 2004**).

Selon la norme de la PHARMACOPEE EUROPEENNE (2005), on détermine le zéro du polarimètre avec le tube fermé vide et on remplit ensuite le tube avec l'huile essentielle. Le calcul du pouvoir rotatoire s'effectue selon la formule suivante :

$$[\alpha]_{D20} = \alpha / l \times P_{20}$$

$[\alpha]^{D20}$: Pouvoir rotatoire de l'huile essentielle. α

: Angle de rotation en degré lu à $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

l : Longueur en décimètre du tube polarimétrique.

P_{20} : Densité relative de l'huile essentielle.

❖ **Mesure de l'indice d'acide :**

L'indice d'acide (IA) est la masse en mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de substance

(KALOUSTIAN ET HADJI-MINAGLOU, 2013).

Selon la norme de la PHARMACOPÉE EUROPÉENNE (2005), on met dans un bécher 1 gramme d'huile essentielle, auquel est ajouté 5 ml d'un mélange à volume égal d'éthanol et d'éther avec quelques gouttes de phénolphthaléine. Le mélange est neutralisé par l'hydroxyde de potassium 0.1 M contenu dans la burette.

La neutralisation est terminée lorsque la couleur rose persiste pendant 15 secondes au moins. L'indice d'acide est calculé selon la formule suivante :

$$I_A = 5,61 \times n/m$$

I_A : Indice d'acide.

n

: Volume de KOH 0.1 M consommé au cour de titrage.

m : Masse en gramme de l'huile essentielle

2.3.5. Identification des huiles essentielles par CG/MS :

La CPG/MS, permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse (MS) correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la chromatographie phase gazeuse (CPG) (CLEVENGER, 1928).

✓ Conditions opératoires :

La chromatographie phase gazeuse est un appareil de type Perkin Elmer GCMS modèle Clarus 500, équipé d'une colonne capillaire PE, Elite série 5% phenyldimethylpolysiloxanne, de longueur : 30 m et de diamètre interne de 0,25 mm, l'épaisseur du film de la phase stationnaire : 0,25 µm. couplé à un spectromètre de masse (MS) avec un détecteur Scan à impact d'électron.

Les conditions analytiques sont les suivantes :

Le gaz vecteur qui constitue la phase mobile est l'hélium réglé à un débit de 1 ml/mn. Programmation de la température : La température de l'injecteur est de 250°C, et l'injection se fait en mode Split avec un volume de 1 µl des huiles essentielles diluées dans du méthanol (1% v/v).

La température initiale de la colonne est maintenue à 80°C en isotherme pendant 3 mn, puis la température augmente graduellement à raison de 4°C/mn jusqu'à 150°C pendant 3 mn. Pour le spectromètre de masse la température de détection est de 250°C.

La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 ev, en mode : Balayage 80-600 µma. Analyseur : quadripôle L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse. Le temps d'analyse est de 40 mn.

La combinaison de ces deux techniques d'analyse CPG/MS permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant en comparant leurs temps de rétentions relatifs et leurs spectres de masse avec les bases de données standards (ADAMS 2007).

2.3.6. Activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne a été réalisée au niveau de Laboratoire de microbiologie, Département de Biotchnologies, Université de Blida1. La méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est : la méthode de diffusion dans l'agar

□ Méthode de diffusion dans l'agar ou Aromatogramme :

Cette méthode consiste en la réalisation d'un aromatogramme dans le but de déterminer la sensibilité des différentes souches microbiennes vis-à-vis des huiles essentielles (WILKINSON, 2006).

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles (DE BILLERBECK, 2007).

Le principe de l'aromatogramme repose sur la compétition entre la croissance d'une souche microbienne et la diffusion d'une huile essentielle dans un milieu gélosé à partir d'un support en papier pré-imprégné (DENIS *et al.*, 2007). Il consiste en la détermination des diamètres des zones d'inhibition (GUPTA *et al.*, 2010).

La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huileessentielle, est celle décrite par (IMELOUANE *et al.*2010) . Une suspension

microbienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^6 UFC/ml) est préparée dans une solution saline (0,9% NaCl). Les boîtes de Pétri contenant le milieu de culture gélosé (Mueller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure et PDA pour les champignons) sontensemencées en strie avec 100µl de l'inoculum.

A la surface de chaque boîte, un disque de papier filtre (Wattman n°4) stérile de 6 mm de diamètre imbibé avec 15 µl des huiles essentielles pures est déposé.

Les boîtes sont laissées une heure à température ambiante pour permettre la diffusion de l'huile essentielle, puis elles sont incubées à $37 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures pour les bactéries, 48 h pour la levure et 5 jours pour les champignons à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus.

2.3.7. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. . a été effectuée au niveau du laboratoire de recherche de Biotechnologie des productions végétales, département de Biotechnologies, Université Blida 1.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence à savoir : l'acide ascorbique (vitamine C) (MOLYNEUX, 2004 ; POPOVICI et al., 2009).

❖ Méthode de piégeage du radical libre DPPH :

Le test de piégeage du DPPH est l'un des méthodes les plus utilisées pour déterminer l'activité anti radicalaire des extraits de plantes (LAGUERRE et al., 2007).

Cette méthode est basée sur la réduction du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1picrylhydrazyle) qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 2.4). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violette foncée, caractérisée par une absorbance dans une solution d'éthanol centrée à environ 517 nm (SZABO et al., 2007 ; ASGHAR et MASOOD, 2008).

Quand une solution de DPPH (DPPH•) est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite

DPPH-H (DPPH), avec perte de cette couleur violette en une adoption d'une couleur jaune pâle (Figure 2.4) (**MARTYSIAK-ŻUROWSKA et WENTA, 2012 ; LI et al., 2009**). Le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (**ROLLAND, 2004**).

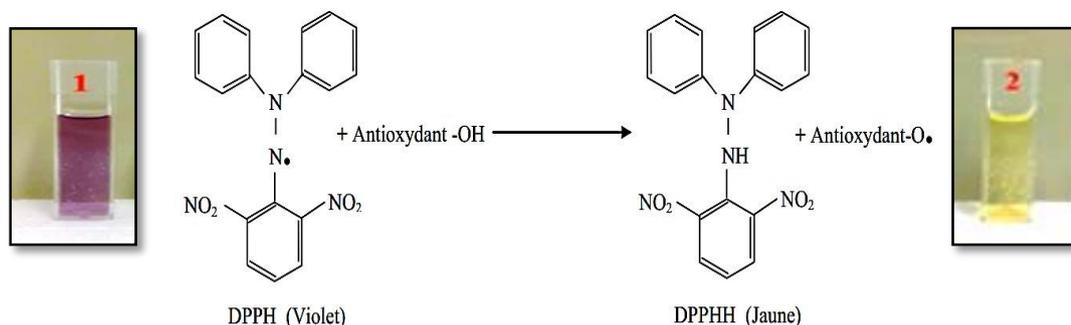


Figure 2.4 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant (**MOLYNEUX, 2004 ; TALBI et al., 2015**).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle est celle proposée par (**SUBRAMANION et al. (2011) et SHARMA et al. 2013**) avec quelques modifications :

La solution de DPPH (2,2-diphényl-di-picrylhydrazyl) est obtenue en dissolvant 4 mg de la poudre dans 100 ml de l'éthanol (EtOH). Un échantillon de l'huile essentielle a été préparé par dissolution dans l'éthanol absolu (EtOH) à raison de 80mg/ml. Cette solution, dite solutions mère, a subi ensuite des dilutions pour arriver à des concentrations allant de 0.04 à 32 mg/ml. Le test s'effectue en mélangeant 1 ml de la solution précédente de DPPH (0.04%) avec 1ml de l'huile à tester à différentes concentrations.

L'antioxydant de référence ou le contrôle positif (Vit C) a été aussi préparé selon la même méthode à raison de 0,2 mg/ml. Le contrôle négatif est constitué de 1 ml de la solution DPPH et 1 ml de l'éthanol absolu (EtOH).

Après une période d'incubation de 30 minutes, à une température du laboratoire ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et à l'abri de la lumière et de l' O_2 atmosphérique, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 517 nm (**SHARMA et BHAT, 2009 ; SANTOS et al., 2014**).

Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante (**KAMKAR et al., 2010 ; MEDDOUR et al., 2013**):

$$I\% = 100 \times \left[\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \right]$$

I% : Activité antioxydant.

A_{blanc} : Absorbance du contrôle négatif.

A_{échantillon} : Absorbance du composé à tester.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle permet de déterminer la EC₅₀ (autrement appelée IC₅₀), exprimée en mg de substrat/ml de DPPH.

C'est la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initial de 50% (**SCHERER et GODOY, 2009 ; TIRZITIS et BARTOSZ, 2010**). Il peut être aussi défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur) (**SHARIFIFAR et al., 2007**).

L'activité antioxydante de l'huile essentielle est déduite graphiquement par la régression linéaire (**SHARIFIFAR F et al, 2007 ; BOUGANDOURA N et al, 2013**). Cette valeur est comparée à celle trouvée par l'antioxydant standard (vitamine C).

2.3.9. Analyses statistiques :

Toutes les mesures expérimentales ont été répétées trois fois et sont exprimées en tant que moyenne ± SD (écart-type de trois mesures) en utilisant le logiciel Excel 2013. La détermination graphique des EC₅₀ des différents standards et des huiles essentielles est effectuée par le logiciel (Origin 8).

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Taux d'humidité de la matière végétale :

La détermination de taux d'humidité des feuilles séchées à l'ombre durant une semaine de *Mentha longifolia* L. a révélé un taux de 8.66%. Ce qui signifie que 91.34% représente le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction de l'huile essentielle (Figures 3.1).

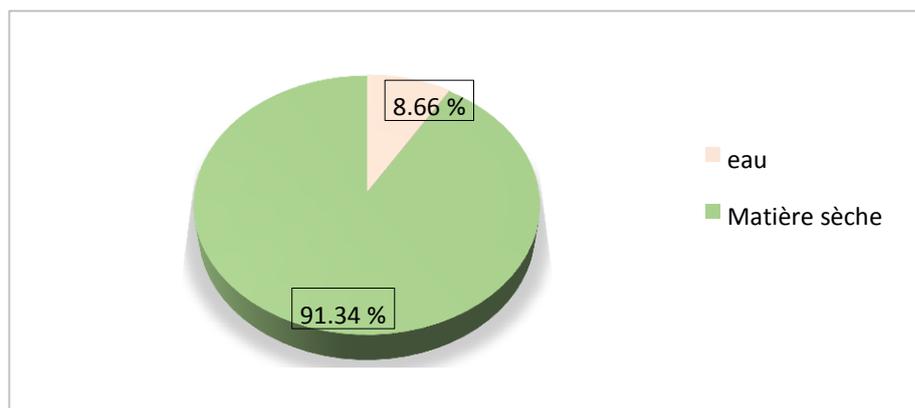


Figure 3.1 : Taux d'humidité des feuilles séchées de *Mentha longifolia* L.

Selon la norme ISO 662 (ISO 662., 1998), ce taux est inférieur à 12%, cela montre que la matière végétale analysée a été séchée et conservée dans de bonnes conditions, ce qui rend, par conséquent, les résultats de nos analyses phytochimiques plus fiables.

Plusieurs recherches bibliographiques ont montré qu'un bon séchage de plantes aromatiques est fondamental pour l'extraction des huiles essentielles (KHORSHIDI et al., 2009), en raison de son influence significative sur le rendement et la composition des huiles essentielles (OKOH et al., 2008 ; DIANA et al., 2008).

(KHORSHIDI et al., 2009 ; SINGH., 2009) ont prouvé que le séchage réduit l'humidité à un niveau qui empêche leur détérioration, permettant ainsi un stockage dans un état stable pour une utilisation ultérieure.

Or, une plante si elle n'est pas séchée dans de bonnes conditions, risque de se dégrader et perdre la totalité de ses huiles essentielles (AGHFIR et al., 2007)

Selon les travaux de (DABIRÉ et al., 2009), le temps de séchage influence énormément le rendement en huiles essentielles.

En effet, au bout de 7 jours de séchage à l'ombre le rendement est optimum (KHORSHIDI et al., 2009 ; DABIRÉ et al., 2010 ; SZUMNY et al., 2010) et au-delà du 14^{ème} jour le rendement en huile essentielle est très faible et devient insignifiant (DABIRÉ et al., 2009).

Dans ce sens BENJILALI et al. (2005) ont trouvé que la teneur en huiles essentielles des feuilles séchées à l'ombre pendant une semaine est quatre fois plus importante que celle d'une plante fraîche.

L'augmentation de la teneur en huiles essentielles avec le séchage s'expliquerait par une activité physiologique (réactions enzymatiques) importante. La biosynthèse des huiles essentielles continue et s'accélère après la récolte du matériel végétal en réponse au stress hydrique (BOURKHISS *et al.*, 2009). Toutefois, lors du séchage, une plante aromatique pourrait perdre une partie de son huile essentielle par volatilisation. Ces pertes sont d'autant plus importantes que la durée de séchage est longue (BOURKHISS *et al.*, 2009 ; BENJILALI *et al.*, 2005).

Le procédé de séchage a également eu un effet significatif sur la proportion des différents composants des huiles essentielles (KHORSHIDI *et al.*, 2009).

Le terme « perte au séchage » est une signification similaire à la teneur en humidité. Néanmoins, puisque les produits à base de plantes sont un mélange complexe de substances chimiques, de nombreuses autres substances volatiles en dehors de l'eau peuvent être présents dans le produit séché. Ainsi, la perte lors de séchage comprend les pertes d'eau et d'autres composés volatils dans les échantillons (SOUZA *et al.*, 2008).

3.2. Rendement en huile essentielle :

Le rendement moyen en huile essentielle de *Mentha longifolia* L., exprimé en (g) par rapport à 100 g de matière végétale sèche et obtenu par hydro-distillation (type Cleavenger), est de l'ordre de 1.2 ± 0.21 % (p/p). Il est dans les plages décrites dans la littérature [0.93–3.3% (p/p)] (Tableau 3.1).

Tableau 3.1: Rendement en huile essentielle de *Mentha longifolia* L.

Origine	Méthode d'extraction	Partie utilisée	Date de récolte	Rendement	Références
Croatie (Dalmatie centrale)	Hydrodistillation (Clevenger)	Partie aérienne	Aout 2001	0.93% (p/p)	MASTELIC et JERKOVIC (2002)
Inde	Hydrodistillation (Clevenger)	Feuilles	Stade de floraison	0.51% (v/p)	PAL SINGH et al. (2008)
Sud de Tunisie (Gabes)	Hydrodistillation (Clevenger)	Feuilles Tiges	Mai 2006 Stade de floraison	1.6% 0.1% (p/p)	HAJLAOUI et al. (2008)

Centre de Tunisie (Sidi bouzid)	Hydrodistillation (Clevenger)	Feuilles Tiges	Mai 2006 Stade de floraison	3.3% 0.2% (p/p)	HAJLAOUI et al. (2008)
---------------------------------	-------------------------------	----------------	--------------------------------	-----------------------	-------------------------------

Les variabilités de rendement en huiles essentielles est attribuée à plusieurs facteurs à savoir : l'origine, les conditions pédoclimatiques et édaphiques de la zone de croissance (GHANMI et al., 2010 ; JAMSHIDI et al., 2009 ; MOGHTADER et AFZALI, 2009).

En effet, Des études antérieures menées par JORDÁN et al. (2013a) et JORDÁN et al. (2013b) ont décrit l'effet de la zone bioclimatique sur le rendement en huiles essentielles.

Aussi, le rendement est tributaire de la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques superficielles (ROBERT, 2000).

Les fluctuations et variations constatées dans le rendement peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à la plante elle-même (le stade phénologique, la période de la récolte et la partie utilisée) (GHANMI et al., 2010 ; CELIKTAS et al., 2007 ; ZAOUALI et al., 2010).

En effet, le rendement total de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* de la région Sidi Bouzid, obtenue à partir des feuilles et des tiges, était respectivement 1,6% (p/p) et 0,1% (p/p). Concernant la deuxième province (Gabès), le rendement était de 3,3% (p/p) dans les feuilles et de 0,2% (p/p) dans les tiges (HAJLAOUI et al. 2008).

L'extraction que nous avons effectuée a été faite au mois de Mars caractérisé par une photopériode optimale propice à la biosynthèse des huiles essentielles.

La méthode d'extraction utilisée (VAN VUUREN et al., 2009 ; FELLAH et ABDERRABA, 2006), la méthode et la durée de séchage (ROBERT, 2000) et les pratiques culturelles (le désherbage et les amendements) (ROBERT, 2000 ; SILANO et DELBO, 2008 ; MARZOUKIA et al., 2009) peuvent aussi influencer le rendement en huiles essentielles.

Le séchage a augmenté le rendement en huile essentielle de *Mentha longifolia* L. de 94,0 à 98,4%, avec augmentation du pourcentage du composant principal : l'oxyde de pipéritinone de 79,9% à 88,5% (SINGH, 2020).

MOUMNI et al. (2014) & DUTTA et al. (2005) ont attribué la différence en rendement à un déterminisme génétique au niveau de la plante.

3.3. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle :

A l'issue des distillations, les différentes caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. sont regroupées dans le tableau (3.2) et la figure (3.2).

Tableau 3.2 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L.

Caractéristiques	Huile essentielle analysée	HAJLAOUI et al. (2008)
Aspect	Liquide Limpide	Liquide à la température de la chambre
Couleur	Jaune clair	Jaune clair
Odeur	Odeur agréable, très forte et persistante de menthe	odeur agréable

Les paramètres organoleptiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. obtenue sont en accord avec les travaux donnés par HAJLAOUI et al. (2008).

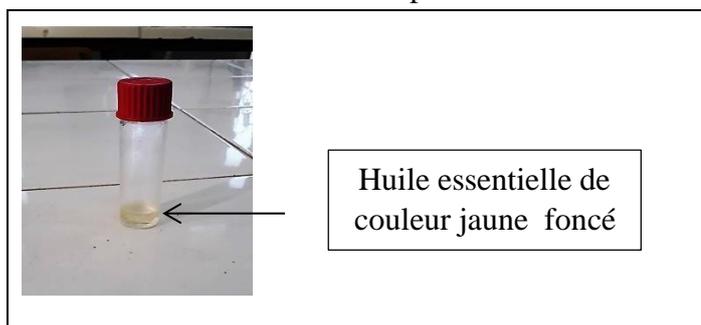


Figure 3.2 : Huile essentielle de *Mentha longifolia* L.

3.4. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :

Les spécificités physico-chimiques de l'huile essentielle *Mentha longifolia* L. sont consignées dans le tableaux (3.3).

Tableau 3.3: Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L.

Caractéristiques	Huile essentielle analysée	Pharmacopée Européenne	Les valeurs d'ONIPPAM	AFNOR

Pouvoir rotatoire	-3°	-5° à + 8°	-3° à + 25°	-
Indice de réfraction	1.4710	1.464 - 1.473	1.466 - 1.475	1.3356-1.3500
Densité relative	0.920	0.895 - 0.920	0.894 - 0.920	0.9050-0.9210
Indice d'acide	0.998	Au max 1	Au max 1	0.5-2

Malgré les différentes variations, nous remarquons que les paramètres physicochimiques des huiles essentielles sont en accord avec ceux mentionnés par les normes : **Pharmacopée Européenne, ONIPPAM, AFNOR (2000)**.

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide renseigne sur le taux d'acides libres. En effet, un indice d'acide élevé (supérieure à deux) trouve une explication dans la dégradation de l'huile essentielle (hydrolyse des esters) durant la conservation. Inversement, un indice d'acide inférieur à deux est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) (**ROBERT, 2000 ; SALIDO et al., 2004**).

Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**ROBERT, 2000 ; SALIDO et al., 2004**).

Le faible indice de réfraction de l'huile essentielles indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (**ROBERT, 2000 ; SALIDO et al., 2004**).

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'huile essentielle. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

3.5. Identification des huiles essentielles par CPG/MS :

Les résultats de l'identification par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (CG/MS) des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de la menthe à longue feuilles, en fonction des temps de rétention par ordre croissant, ont permis d'identifier 41 composés (Tableau 3.4) qui représentent un total de 96,66 %.

Les monoterpènes oxygénés (80.5%) sont les composants prédominants suivis par les monoterpènes hydrocarbonés (7.51%), les sesquiterpènes oxygénés (5.25%) et enfin les sesquiterpènes hydrocarbonés (0.87%).

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **HAJLAOUI et al., (2009)** ; **HAJLAOUI et al., (2008)** ; **SALIHILA et al. (2018)** qui ont rapporté que l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. de la Tunisie contient principalement des monoterpènes oxygénés et les monoterpènes hydrocarbonés suivis par les et les sesquiterpènes oxygénés et les sesquiterpènes hydrocarbonés.

YOUNIS et BESHIR (2004) ont démontré que les monoterpènes oxygénés comprenaient 81.5 %, tandis que les hydrocarbures monoterpéniques constituaient 14.7 % du total des huiles de *M. longifolia* L. provenant de Soudan.

La composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Mentha longifolia* L., est caractérisée par les composés majoritaires suivants : α -pinene (3.57%), 1,8 cineole (11.54%), menthone (10.70%), isomenthone (2.4%), pulegone (47.15%), a-terpineol (3.17%) and d-cadinene (3.53%)

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L.Tunisien, dont le composé majeur étant le : pulegone (47.15%) (**HAJLAOUI et al., 2009**).

Tableau 3.4 : Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle *Mentha longifolia* L. analysés par CPG/MS.

N°	Indice de kovats	Composés	Teneur %.
01	1020	α -Pinene	3.57
02	1027	α -Thujène	0.53
03	1066	α -Fenchene	tr
04	1071	Camphène	0.42
05	1113	β -Pinène	1.01
06	1124	Sabinène	0.51
07	1161	Myrcène	0.37
08	1196	Limonène	0.79
09	1213	1,8-cinéole	11.54
10	1235	Z-b-Ocimène	0.11
11	1236	3-octanone	0.11
12	1245	c-terpinène	tr
13	1269	P-cymène	tr
14	1286	Terpinolène	tr
15	1388	3-octano	tr
16	1441	1-octénol-3	tr

17	1473	Menthone	10.70
18	1488	Menthofurane	tr
19	1494	Isomenthone	2.4
20	1544	B-bourbonène	0.17
21	1548	Linaloo	tr
22	1565	Acétate de méthyle	0.67
23	1590	Isopulégone	0.85
24	1591	Néoisomentho	0.40
25	1600	Terpinen-4-ol	0.25
26	1613	Menthol	0.16
27	1654	Pulegone	47.15
28	1668	α -Humulène	0.49
29	1669	trans-pipéritol	1.8
30	1693	α -terpinéol	3.17
31	1703	Germacrène D	0.84
32	1731	Carvone	0.34
33	1732	Pipéritone	0.96
34	1755	d-cadinène	3.53
35	1756	c-cadinène	0.15
36	1791	Myrténol	0.11
37	1804	Carveol	0.72
38	1813	Germacrène-B	0.24
39	1976	Oxyde de caryophyllène	0.87
40	1912	α -Calacorène	0.08
41	2166	Thymol	1.34

Les monoterpènes oxygénés	80.5 %
Les monoterpènes hydrocarbures	7.51 %
Les sesquiterpènes oxygénés	5.25 %
Les sesquiterpènes hydrocarbures	0.87%
Total	96.66%

En analysant la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. de trois régions de l'Albanie (centrale, sud et sud-est), **SALIHILA et al. (2018)** ont constaté qu'elle est dominée par :

- Pulegone (40.43%,), 1, 8 Cineol (8.27%), Thymol (6.47%), Menthol (6.45%), beta-Caryophyllene (6.01%), dans la région centrale de l'Albanie.
- Pulegone (28.66%), Carvone (20.33%), Linalool (9.77%), Menthol (6.49%), 1,8 Cineol (5.45%), Menthon (3.47%), Piperithone (3.43%) dans la région sud d'Albanie.

- Linalool (24.17%), Pulegone (11.77%), 1,8Cineol (8.6%), Limonene (7.5%), Thymol (6.28%), Menthol (4.11%), Piperithone (4.34%)

L'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. provenant de Croatie était caractérisée par une teneur élevée en monoterpènes oxygénés, (69,0%). les principaux composants oxygénés étaient la carvone (33,48%) et l'oxyde de pipériténone (28,95%). Le reste de l'huile, environ 31,0%, était composé d'hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques avec du limonène (10,29%) et β -caryophyllène (5,84%) en tant que composants principaux (**MASTELIC et JERKOVIC, 2002**).

YOUNIS et BESHIR (2004) ont montré la présence de 22 composés dans l'huile essentielle de *Mentha longifolia* ssp. *schimperi* au Soudan, dont les principaux étaient : carvone (67,3%), limonène (13,5%), 1,8-cinéole (5,4%), menthone (2,9%), linalol (2,8%) et isomenthone (1,2%).

Ces divergences de composition chimique des huiles essentielles récoltées à partir de plantes appartenant au genre *Mentha* peuvent être dues à une différence dans les niveaux d'enzymes biosynthétiques (**GERSHENZON et al., 2000**).

HAJLAOUI et al. (2008) ont noté que dans *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*, la composition chimique des huiles essentielles est indépendante de l'organe utilisé de la plante (tiges ou feuilles), contrairement à la teneur de chaque composant majeur qui est directement liée à l'organe utilisée. Six composants majeurs ont été identifier: menthol (32,5-19,4%), menthone (28,8-20,7%), pulegone (17,87-8%), 1,8 cinéole (10,8-5,6%), terpinéol-4 (4,9-3,1%) et pipéritone (3,3-2,2%).

SINGH et al. (2012), ont attribué les variations dans la composition chimique des huiles essentielles à de nombreux facteurs, y compris le lieu d'origine géographique des plantes, le stade phénologique des plantes, la période de la récolte et la partie de la plante utilisée.

La méthode d'extraction utilisée, les conditions de séchage (la méthode et la durée) et les facteurs génétiques (les chemotypes), peuvent aussi influencer le rendement en huiles essentielles (**MAHMOUDI et NOSRATPOUR, 2013**).

Les fluctuations et les variations constatées dans composition chimique peuvent être attribuées non seulement à l'origine et la plante mais également aux procédés appliqué

pour l'analyse et l'identification des composés de l'huile essentielle, notamment la colonne et les conditions programmées (TANTRY *et al.*, 2012 ; KUTBAY et AKFIRAT, 2015). L'indice de rétention d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température (GHANMI *et al.*, 2010).

3.6. Etude de l'Activité antimicrobienne :

3.6.1. Activité antibactérienne :

Les résultats de l'étude de l'activité antimicrobienne in vitro de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L., évaluée par la méthode de diffusion sur gélose (Tableau 3.5) sont exprimé en adoptant l'estimation de MOREIRA *et al.* (2005) & DJEDDI *et al.* (2007):

- Souche extrêmement sensible : Diamètre plus de 20 mm.
- Souche très sensible : Diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Souche sensible : Diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Souche non sensible : Diamètre moins de 8 mm.

Tableau 3.5 : Résultats de l'activité antibactérienne.

Diamètres des ZI (mm) \pm SD					
Plante étudiée	Bactéries Gram (-)			Bactéries Gram (+)	
	<i>K.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>S.a.</i>
<i>Mentha longifolia</i> L.	10 \pm 0.15	9 \pm 0.17	12 \pm 0.17	18 \pm 0.43	15 \pm 0. 22

L'huile essentielle de la menthe à longues feuilles a une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité élevée par rapport aux autres. Ainsi, les souches à Gram positif présentent souvent plus de sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles testées que les souches à Gram négatif.

En effet, pour les bactéries à Gram positif, *B. subtilis* est la souche la plus sensible avec la zone d'inhibition (18 \pm 0. 43 mm), suivie par *S. aureus* (15 \pm 0.22 mm).

Selon l'estimation donnée par MOREIRA *et al.* (2005) & DJEDDI *et al.* (2007), ces deux espèces bactériennes sont considérées comme très sensibles envers l'huile essentielle testée.

Cependant, une activité modeste a été observée contre les bactéries à Gram négatif sur *Klebsiella pneumoniae* (10 \pm 0,54mm), *Pseudomonas aeruginosa* (09 \pm 0.17 mm) et *Escherichia coli* (12 \pm 0.35 mm) à gram négatif. Ces espèces bactériennes, selon

l'estimation donnée par **MOREIRA et al. (2005)** et **DJEDDI et al. (2007)** sont considérées comme sensibles envers les huiles essentielles testées.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **HAJLAOUI et al., 2008 ; HAJLAOUI et al., 2009**) qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. Présente une activité antibactérienne contre les souches Gram positif et Gram négatif

Plusieurs travaux réalisés par **DERWICH et al. (2011)**, **NEDOROSTOVA et KLOUCEK (2009)** & **OKOH et al. (2010)**, ont confirmé la grande sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif. Ceci est dû principalement à la différence de la structure de la paroi cellulaire. En effet, la paroi des bactéries Gram (-) est surtout composée en lipopolysaccharides (LPS) et de protéines. Les lipopolysaccharides (LPS), grâce à ses charges négatives de surface, empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, alors que les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé (**BASLI et CHIBANE, 2010 ; BARCHAN et al., 2015**).

Néanmoins, ils permettent la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da, comme le carvacrol qui peut traverser cette barrière (**DORMAN et DEANS, 2000 ; ULTEE et al., 2002**).

Tandis que les bactéries Gram (+) sont moins protégées contre les agents antibactériens. Leurs paroi est riche en peptidoglycane (polymère complexe de sucres et d'acides aminés donnant à la bactérie sa forme et sa rigidité que ce soit chez les bactéries Gram positif ou négatif), n'entrave que la diffusion des molécules supérieures à plus de 50 000 Da (**HOGAN et KOLTER, 2002**).

De plus, les extrémités lipophiles des acides lipotéichoïque de la membrane cellulaire des bactéries à Gram positif peuvent faciliter la pénétration des composés hydrophobes (**OKOH et al., 2010 ; KARAKAYA et al., 2014**).

CUSHNIE et LAMB (2011), **LAHLOU (2004)** & **HAMMER et al. (2008)** ont attribué les fluctuations dans les résultats de la détermination de l'activité antimicrobienne à plusieurs paramètres notamment le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la nature de milieu de culture, les conditions de culture (temps d'incubation, la température, l'oxygène), la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure des molécules bioactives.

Selon **OUSSALAH et al. (2006)**, l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes).

Du fait de la variabilité quantitative et qualitative des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Etant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**BURT, 2004 ; SOUZA et al., 2006 ; BAJPAI et KANG, 2010**).

La plupart des mécanismes d'action sont attribués à l'interaction des composants des huiles essentielles avec la membrane cellulaire (**BENCHAAR et al., 2008**).

En effet, Le mode d'action des huiles essentielles dépend des caractéristiques de ses composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Leur accumulation entre les phospholipides entraîne une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne, en augmente sa perméabilité, ce qui induit la perte des constituants intracellulaires (**PINTO et al., 2002 ; YEN et CHANG, 2008**).

Les huiles essentielles peuvent aussi provoquer une perturbation chémo-osmotique en affectant le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique ce qui diminue la stabilité de la membrane ainsi que le transport membranaire (**SOUZA et al., 2006 ; COX et al., 2001**).

Dans une étude qui a été réalisée par **FREEMAN et CAREL (2006)**, l'huile essentielle de thé a provoqué des fuites d'ions potassium (K^+) au niveau des membranes cellulaires d'*E.coli* et *S. aureus*. Cette fuite de K^+ est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie.

Un autre mécanisme d'action proposé implique le groupement hydroxyle des phénols, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes (**ULTEE et al., 2002**).

Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe (COX *et al.*, 2001).

D'autres auteurs pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (KURITA *et al.*, 1979).

MAHMOUD *et al.* (2004) & CALSAMIGLIA *et al.* (2007) ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les huiles essentielles pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux.

En outre, les huiles essentielles peuvent interagir avec les membranes mitochondriales et à générer des radicaux libres qui oxydent les macromolécules, ce qui conduit à la mort par nécrose (TARIKU *et al.*, 2011). GUESMI et BOUDABOUS (2006) & CALSAMIGLIA *et al.* (2007) quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique.

3.6.2. Activité antifongique :

Les résultats relatifs à l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. sont consignés dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle.

<i>Mentha longifolia</i> L.	Diamètres des ZI (mm)± SD		
	<i>C. Albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>
	28±0,43	38±0,49	35± 0.54

En se basant sur l'estimation donnée par MUTAI *et al.* (2009), l'huile essentielle *Mentha longifolia* L. s'est avérée très active contre toutes les espèces fongiques testées à savoir : la levure *Candida albicans*, ainsi que les deux champignons *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*.

L'estimation donnée par MOREIRA *et al.* (2005) et DJEDDI *et al.* (2007), nous a permis de considérer *Candida albicans*, *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum* comme des souches extrêmement sensibles aux huiles essentielles étudiées.

Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries (COX *et al.*, 2000).

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux trouvés GULLUCE *et al.* (2007) par qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* exerce une forte activité inhibitrice de la croissance de nombreux champignons à savoir *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* et de levure : *Candida albicans*. Contrairement, aux travaux de HAJLAOUI *et al.* (2009) qui ont montré que l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. exerce une activité inhibitrice modérée de la croissance de nombreux champignons à savoir *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger* et de levure : *Candida albicans*. Cela peut être dû à la composition de l'huile essentielle.

SUPPAKUL *et al.* (2003) ont suggéré que l'activité antifongique des huiles essentielles, peut se faire selon deux mécanismes différents : certaines constituants provoquent la fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres, d'autres peuvent être insérés dans les lipides membranaires, par conséquent il y'a perte des fonctions membranaires.

En outre, l'activité antifongique des huiles essentielles pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'huile essentielle dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique (CARMO *et al.*, 2008).

Ces suggestions ont été déjà rapportées par MOUCHEM *et al.* (2015).

Certains agents antifongiques inhibent la croissance des cellules en interrompant la biosynthèse d'ergostérol, qui résulte d'une liaison des antifongiques à l'ergostérol sur la membrane cellulaire (LIMA *et al.*, 2006). Ce procédé affecte l'intégrité et de la fonction de certains protéines liées à la membrane et conduit à des troubles osmotiques (créé un canal dans les membranes fongiques par lequel s'échappent des ions, principalement K⁺ et H⁺), des perturbations de la croissance et la prolifération cellulaire (NATALIA DA SILVA BOMFIM *et al.*, 2015).

L'action antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (COX *et al.*, 2000). Les travaux de TEPE *et al.* (2006) montrent que la présence de l' α -pinène, le β pinène et le limonène inhibent l'activité respiratoire chez la mitochondrie de la levure.

Les variations observées dans les activités antifongiques entre les différents travaux sont liées à plusieurs paramètres dont : la nature du milieu de germination, le genre et l'état de l'espèce fongique (utilisée juste après son isolement ou après plusieurs repiquages), l'âge de la culture, En effet Plus cette dernière est âgée, plus elle devient sensible à l'action de l'huile essentielle. Mais ces variations dépendent aussi de la nature de l'huile essentielle et son contenu en composés volatils ; la concentration et la quantité de l'huile essentielle ; la concentration de l'inoculum concernant les spores (Une augmentation de la densité des spores, supérieur à 10^6 UFC, exige des concentrations élevées d'huile essentielle pour les éliminer) (**OURAINI et al., 2007**).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. pourrait être attribuée en particulier des composés oxygénés : menthol, menthone, pulegone 1,8 cineole et piperitone (**HAJLAOUI et al., 2008**). Par ailleurs, les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés majoritaires et minoritaires ce qui rend difficile l'explication de leurs propriétés antimicrobiennes. Il n'y a pas de composant majeur seul responsable de cette propriété (**MOGHTADER et AFZALI, 2009 ; DEBA et al., 2008 ; FALEIRO et al., 2003**).

Les interactions entre ces composants peuvent conduire à des effets antagonistes, additifs ou synergiques. Certaines études ont démontré que les huiles essentielles entières ont généralement une activité antimicrobienne plus élevée que les mélanges de leurs principales composantes, ce qui suggère que les composants mineurs sont essentiels à l'activité synergique, bien que des effets antagonistes et additifs ont également été observés (**GIORDANI et al., 2008 ; BASSOLE et JULIAN, 2012 ; REGNIER et al., 2008**).

3.7. Etude de l'activité antioxydante:

L'activité antioxydante de l'huile essentielle et de l'antioxydant standard (Vitamine C) par le piégeage du radical libre DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H), mesurable à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires

(BOUGANDOURA et BENDIMERAD, 2013 ; KAMKAR et al., 2010 ; MARINOVA et BATCHVAROV, 2011 ; MELENDEZ NORMA et al., 2014 ; TABART et al., 2009).

❖ **Pourcentage d'inhibition :**

Les résultats obtenus montrent que l'évolution de l'activité antiradicalaire est dosedépendante. En effet, le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration que ce soit du standard (vit C) ou de l'huile essentielle de la plante étudié (Figure : 3.3 et 3.4) jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'épuisement presque total du DPPH• présent dans le milieu réactionnel. En effet, pour une concentration de 32 mg/ml, l'huile essentielle a révélé un pourcentage d'inhibition de 82.60 %.

L'effet anti-radicalaire des huiles essentielles sur le DPPH• est dû à leur pouvoir donneur d'un atome d'hydrogène (CONFORTI et al., 2006). L'atome H transférée sur le radical libre DPPH• permet alors sa transformation en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (VILLANO et al., 2007 ; BARKAT et LAIB, 2012).

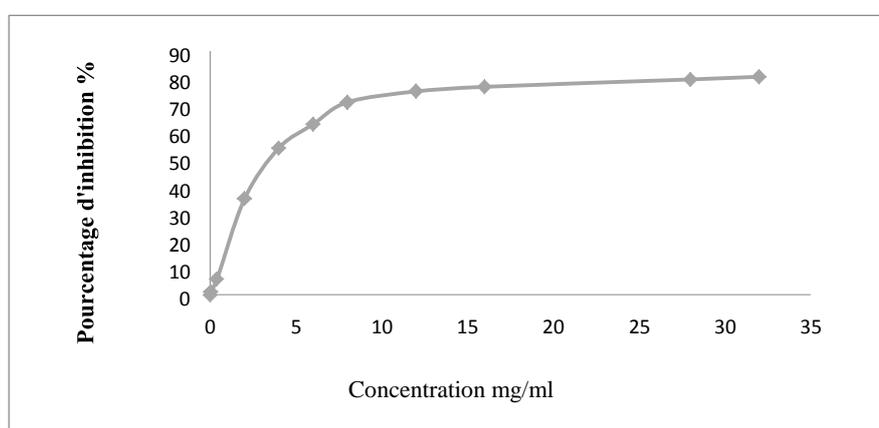


Figure 3.3: Variation de pourcentage d'inhibition pour l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L.

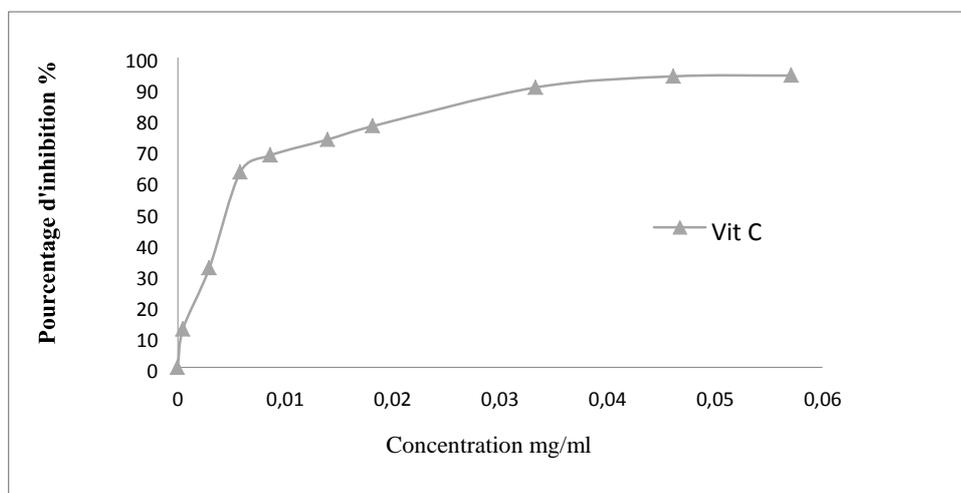


Figure 3.4: Variation de pourcentage d'inhibition pour le standard (Vitamine C).

PEKKARINEN et al. (1999) & KOLEVA et al. (2011) ont rapporté que la polarité du substrat n'affecte pas l'activité de balayage du DPPH•, car la méthode de piégeage du radical libre DPPH• est indépendante de la polarité du substrat (**KULISIC et al., 2004**).

Afin de s'affranchir de l'influence de la concentration, la réactivité est estimée par la concentration effective EC_{50} de l'antioxydant (**POPOVICI et al., 2009**).

❖ Détermination de la valeur EC_{50}

L'indice EC_{50} correspond à une réduction de 50% de l'activité du DPPH• dans le milieu réactionnel. Il est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé.

D'autant elle est plus élevée que son EC_{50} est petite (**KADRI et al., 2011 ; POPOVICI et al., 2009**).

La valeur EC_{50} de l'huile essentielle de la plante étudiée (*Mentha longifolia* L.) et de l'antioxydant standard sont déterminées graphiquement à partir des régressions linéaires (Figure 3.5).

Les valeurs EC_{50} déterminées de l'huile essentielle (*Mentha longifolia* L.) et de l'antioxydant standard (Vitamine C) sont de 3.48 ± 0.13 mg/ml et 0.0046 ± 0.0003 mg/ml, respectivement.

Selon les résultats enregistrés, l'huile essentielle testée est dotée d'un pouvoir antioxydant modéré relativement faible par rapport à l'antioxydant standard utilisé (Vitamine C).

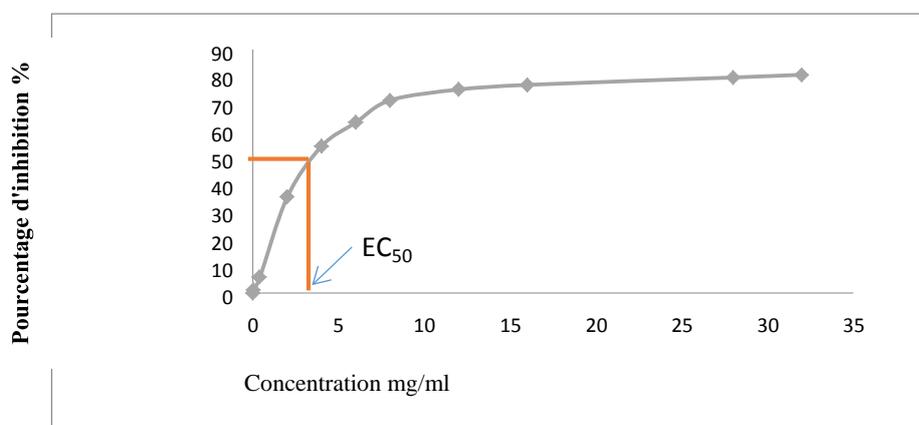


Figure 3.5 : Détermination graphique d'EC₅₀ de l'huile essentielle.

Selon **RUBERTO et BARATTA (2000)**, **OKOH et al. (2011)**, **ERDOGANORHAN et al. (2010)**, **GHEDADBA et al. (2014)** & **KADRI et al. (2011)**, les monoterpènes oxygénés et le mélange de monoterpènes et des sesquiterpènes hydrocarbures sont principalement responsables de potentiel antioxydant des huiles essentielles par leur capacité d'agir comme donneurs d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons, d'où la transformation réductrice de DPPH• en DPPH-H, et par conséquent la formation de la coloration jaune.

HUSSAIN, (2008) a attribué l'activité antioxydante de l'huile essentielle à la présence des groupes d'hydroxyle dans la structure chimique de leurs composés.

L'activité antioxydante d'une huile essentielle est principalement attribuée à ses composés majoritaires, bien que l'effet synergique ou antagoniste d'un composé mineur doive être pris en considération (**BURT, 2004 ; WU et al., 2013**).

BOUGANDOURA et BENDIMERAD (2013) ont démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique et tocophérol (Vitamine E) réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène.

Le test au DPPH• n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH• et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques (**POPOVICI et al., 2009**).

Les tests au DPPH• fournis dans la littérature sont basés sur le même principe que celui décrit par **BRAND-WILLIAMS et al. (1995)**, mais les protocoles analytiques diffèrent dans plusieurs paramètres (**POPOVICI et al., 2009 ; MARINOVA et BATCHVAROV, 2011**).

Toutefois il est important de noter que l'utilisation de différents protocoles de mesure et de différents indices d'évaluation de l'activité antioxydante réduit la fiabilité d'une comparaison des valeurs (POPOVICI et al., 2009).

Cependant, l'efficacité antioxydante de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L.a été signalé dans de nombreux travaux antérieurs (Tableau 3.7).

Tableau 3.7: Quelques travaux antérieurs sur l'efficacité antioxydante.

V échantillon	V DPPH	λ (nm)	T (min)	solvant	EC ₅₀	Paramètres Auteurs
0.5ml	2ml 0.2 mM	517	30	Methano l 99%	9 μ g/ml	HAJLAOUI et al. (2009)

TEPE et al. (2006), SHARIFIRAR et al.(2007) et AKROUT et al. (2010) ont attribué cette différence dans les valeurs d'EC₅₀ à plusieurs facteurs:

□ La composition chimique de l'huile essentielle, □

Le protocole expérimental utilisé comprenait:

- ✓ Le rapport entre la quantité de l'huile essentielle et la quantité de la solution DPPH utilisée dans le mélange,
- ✓ La concentration de la solution DPPH
- ✓ Le temps d'incubation,
- ✓ La façon d'exprimer l'unité EC₅₀.

Ce qui ne rend pas fiable la comparaison directe des valeurs EC₅₀ rapportés dans divers travaux. En effet, même pour les antioxydants de synthèse utilisés, tels que l'acide ascorbique, les valeurs EC₅₀ rapportées sont différents selon le protocole expérimental utilisé.

CONCLUSION

L'Algérie, de part, sa position géographique, présente une large gamme d'étages bioclimatiques, induisant une biodiversité immense de plantes aromatiques et médicinales qui demandent d'être exploitées, afin de déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être une alternative des pesticides synthétiques.

Dans ce cadre, la menthe tomenteuse (*Mentha longifolia L.*) a fait l'objet de notre étude phytochimique et des activités biologiques, dont les feuilles ont été récoltées dans la région du Hoggar (Tamanrasset), le mois de Mars 2019. Le rendement moyen en huile essentielle exprimé en milligramme par rapport à 100 g de la matière sèche est de l'ordre de $1.2 \pm 0.21\%$, ce dernier peut être rentable à l'échelle industrielle.

Quant au contrôle physico-chimique des différents paramètres à savoir : l'indice de réfraction, l'indice d'acide, la densité relative et le pouvoir rotatoire a montré que l'huile essentielle de l'espèce étudiée répond aux normes internationales.

L'activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, révèle une sensibilité marquée à l'huile essentielle testée.

Une bonne activité fongicide de l'huile essentielle testée s'est évaluée vis-à-vis de deux champignons à savoir : *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum*, et la levure : *Candida albicans*.

L'activité antioxydante a été évaluée par le test de piègeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH). Les résultats montrent que l'huile essentielle testée a une activité antioxydante modérée comparée l'antioxydant standard: vitamine C. Parallèlement aux travaux, ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des huiles essentielles qui sont responsables de ces activités biologiques, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace.

En effet, il ressort du présent travail que *Mentha longifolia L.* de la région du Hoggar est une plante très intéressante et riche en composés secondaires.

Les résultats obtenus sont remarquables, car ils ouvrent dans le futur des perspectives, en orientant les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires des activités biologiques des plantes étudiées

APPENDICE A

ETUDES STATISTIQUES

Calcul de la moyenne :

$$\bar{X} = 1/n \sum_1^n x_i$$

n : Nombre de répétitions. x_i

: Valeurs observées.

Calcul de l'écart type :

$$S = \sqrt{1/n - 1 \sum_i^n (x_i - \bar{X})^2}$$

APPENDICE B
MATERIEL NON BIOLOGIQUE

VERRERIES	APPAREILS	Réactifs
Bocaux.	Broyeur.	Mg So ₄ .
Capsules.	Balance analytique.	NaCl.
Ballon.	Etuve.	NaOH (0.1 M).
Flacons.	Dessiccateur.	Ethanol.
Entonnoir.	Clevenger.	Ether.
Flacons teintés.	Chauffe ballon.	H ₂ O ₂ .
Béchers.	Réfractomètre.	DMSO.
Burette.	Pycnomètre.	DPPH.
Tubes à essai.	Balance hydrostatique.	Vitamine C.
Boîtes de pétri.	Polarimètre.	
Seringue.	CPG/MS.	
	Spectrophotomètre (UVvisible).	
	Rotavapeur sous vide.	
	Bain-Marie.	
	Centrifugeuse.	
	Vortex.	

APPENDICE C

LISTE DES

ABREVIATIONS

HE : Huile essentielle.

ZI : Zone d'inhibition. E.c.

: Escherichia coli.

P.a.: Pseudomonas aeruginosa.

K.p. : Klebsiellapneumonia.

S.a. : Staphylococcus aureus.

B.s. : Bacillus subtilis.

C.a. : Candida albicans.

A.f. : Aspergillusflavus.

F.o.: Fusariumoxysporum.

ATCC :American Type Culture Collection.

PDA: Potato Dextrose Agar

DMSO :Diméthylsulfoxyde.

ISO : Organisation Internationale de Normalisation. AFNOR : Association Française de Normalisation.

Masse. ATP : adénosine-5'-triphosphate.

DPPH : 2,2-diphényle-1picrylhydrazyle.

Vit C : Vitamine C.

EC50 : Concentration requise pour diminuer la concentration du DPPH de 50%.

APPENDICE D

LISTE DES SYMBOLES

p/p : poids par poids.

v/p : volume par poids.

°C : degré Celsius.

h : heure.

Colonies. t : temps.

temps initial.

< : Inférieur. % : pourcentage.

millilitre.

microlitre.

M : Molaire.

m : mètre.

mm : millimètre.

± : Plus au moins

µm : micromètre.

min : minute.

ev : électro volt.

CFU : Unité Formant des

nm : nano mètre. t₀ :

mg : milligramme. g : gramme.

> : Supérieur. ml :

TR : Temps de rétention. µl :

IK : Indice de Kovats.

α : Alpha.

β : Béta.

γ : Gama.

APPENDICE A

Liste des

Figures

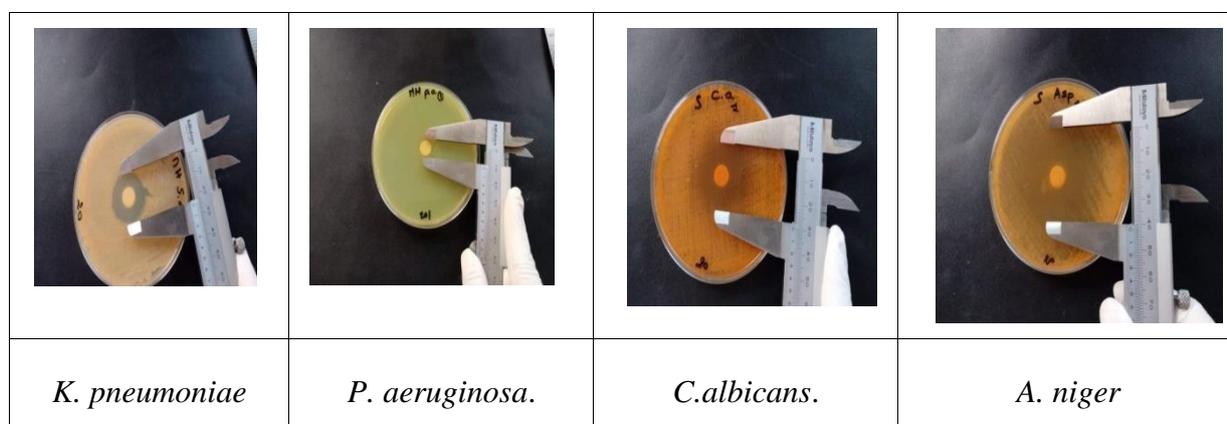


Figure A.1 : Résultats de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. subsp. *geyrii* Maire.



Figure A.2 : Virage de la couleur en présence de DPPH.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboughe Angone S., Aworet Samseny C. & Eyele Mve M., “Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon”, *Phytothérapie*, V.13, (2015), 283-287.
- Aboughe Angone S., Aworet Samseny C. & Eyele Mve M., “Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon”, *Phytothérapie*, V.13, (2015), 283-287.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), “ Recueil de normes : les huiles essentielles ”. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d’analyse. AFNOR, Paris, (2000), 440 p.
- Aghfir M., Kouhila M., Jamali A. & Ait Mohamed L., “Séchage solaire convectif pour la conservation des feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis*)”, *J.I.T.H.*, Albi, France. ENSTIMAC, (2007), 5p.
- Ahmadi L., Mirza M., & Shahmir F., “The volatile constituents of *Artemisia marschaliana* Sprengel and its secretory elements”. *Flavour Fragr J.*, (2002). V.17, 141-143.
- Alitonou G.A., Tchobo F.P., Sessou P., et al., “Chemical composition, antiradical and anti-inflammatory activities of four annonaceae from Benin”, *IJPCBS*, V. 3, (2013), 914–23.
- Amarti F., El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M. & Chaouch A., “Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l’huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc”, *Phytothérapie*, V.9, n° 3 , (2011), 149-157.
- Andrade E.H.A., Alves C.N., Guimarães E.F., Carreira, L.M.M. & Maia, J.G.S., “Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich”. *Biochem. Syst. Ecol.*, V.39, (2011), 669-675.
- Anton R. & Lobstein A., “ Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ”, Tec & Doc, Paris, (2005), 522 p.
- Anton R. & Lobstein A., “ Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ”, Tec & Doc, Paris, (2005), 522 p.

□

Aouni M., Pelen F. & Soulimani R., “Étude de l’activité antimicrobienne d’un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d’application”, *Phytothérapie*, V. 11, (2013), 225-236.

Asghar Z. & Masood Z., “Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro”. *Pak. J. Pharm. Sci.*, V. 3, (2008), 249254.

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., et al. “ Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatment with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS”, *Mut. Res.*, V. 606, n°1–2, (2006), 27-38.
- Baldwin I.T., “Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: ‘Talking Trees’ in the Genomics Era”, *Science*, V.311, (2006), 812-815.
- Bardeau F., “Les huiles essentielles”, Fernand Lanore, (2009), 315 p.
- Bartosz G., “Generation of reactive oxygen species in biological systems”, *Comments on Toxicology*, V. 9, (2003), 5-21.
- Baser K.H.C., Buchbauer G., “Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications”, CRC Press NW, (2010).
- Benjilali B. & Zrira S., “Plantes Aromatiques & médicinales. Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable “, Actes Edition, Rabat, (2005), 346 p.
- Berger M.M., “Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances”, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, V. 20, (2006), 48-53.
- Bougandoura N. & Bendimerad N., “Evaluation de l’activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq “Nature & Technologie ». *B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n°09, (2013), 14-19
- Boukhatem M. N., Hamaidi M .S., Saidi F. & Hakim Y., “Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l’huile essentielle du *Géranium Rosat* (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie)”, *Revue Nature et Technologie*, n° 03, (2010), 37-45.
- Boukssaim H., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Khia, A. Alaoui M. S. B., Chaouch A. & Farah A., “Caractérisation chimique et microbiologique des huiles essentielles des rameaux, des cônes et du bois de *Cupressus atlantica* , arbre forestier endémique du Maroc ”, *Phytothérapie*, V. 11, n° 5, (October 2013), 294-300.

□

□

Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A. & Satrani B., “Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters”, *Agro-solutions*, V.20, n°1, (2009), 45.

- Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A. & Satrani B., “Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters”, *Agro-solutions*, V.20, n°1, (2009), 45.
- Bourkhiss M., Hnach M.P., Costa J., Farah A. & Satrani B., “propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du maroc”, *bulletin de la société royale des sciences de liège*, V. 79, (2010), 141-154.
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y. & Chemat F., “Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity”, *Food Chem.*, V. 14, (2009), 355-362.
- Brigitte-Milpied H., “Progrès en dermato-allergologie: Bordeaux 2009”, *John Libbey Eurotext*, (2009), 391 p.
- Bruneton J., “Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales”, *Tec & Doc*, Paris, 4ème Edition, (2009), 1292 p.
- Burt S., “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review”. *Int. J. Food Microbiol.*, V.94, (2004), 223-253 p
- Caillet S. & Lacroix M., “Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA), (2007), 1-8.
- Cantrell C.L., Dayan F.E. & Duke S.O., “Natural products as sources for new pesticides”, *J. Nat. Prod.*, V. 75, (2012), 1231–1242.
- Carson C F. & Hammer K A., “Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar H.Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents”, *United Kingdom*, *John Wiley & Sons Ltd*, (2011), 204-238.

□

- Cassel E., Vargas R.M.F., Martinez N., Lorenzo D., Dellacassa E., “Steam distillation modeling for essential oil extraction process”, *Ind. Crops Prod.*, V.29, (2009), 171– 176.
- Cava R., Nowak E., Taboada A. & Marin-Iniesta F., “Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk”, *J. Food Prot.*, V.70, (2007) , 2757–2763.
- Chiasson H., Bélanger A., Bostanian N., “Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction”, *J. Econ. Entomol.*, (2001), 167-171.
- Clevenger J.F., “Apparatus for the determination of volatile oil”, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17, (1928), 341–346.
- Cseke L.J., Kaufman P.B. & Kirakosyan A., “The Biology of Essential Oils in the Pollination of Flowers”, *Natural product communications*, V.2, n°12, (2007), 13171336.
- Dabiré C., Roger H.C.N., André B., Mouhousine N. & Faustin S.S., “Effet du séchage de la matière végétale sur la composition chimique de l’huile essentielle et l’activité antioxydante d’extraits de *Ocimum basilicum* L.’”, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, V. 5, n°3, (2011), 1082-1095. 3
- Dabiré C.M., Eloi P., Roger H.Ch.N., Abdoul D.S., Jeanne M.R. & Mouhoussine N., “L’huile essentielle de *Grangea maderaspatana* (L.) poir. du Burkina Faso : rendement d’extraction et composition chimique’”, *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.*, V. 28, (2009), 81-86.
- De Billerbeck G., “Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques”. Springer, *Phytothérapie* , V.5, (2007), 249–253.
- De Billerbeck G., “Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques”. Springer, *Phytothérapie* , V.5, (2007), 249–253.
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. & Quentin R., “Bactériologie médicale. Techniques usuelles”, Edition MASSON, (2007), 546 p.
- Diana L., Ronicely R., Evandro M., Evan V. & Antonio P., “Influence of drying air temperature on the essential oil content from *Melaleuca alternifolia* Cheel’”, *International Conference of Agricultural Engineering*, (2008), 1-4.

□

□

- Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M. & Stocker P., “Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants”, *Food Chem. Toxicol.*, V. 48, (2010), 2599–2606.

Djilani A. & Dicko A., The therapeutic benefits of essential oils. In: Bouayed, J. Bohn T., *Nutrition, Well-being and Health*. Tech. Croatia, (2012), 155–178.

- Dubey V.S., Bhalla R. & Luthra R. “An overview of the non -mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants”. *J. Biosci.* V.28, n°5, (2003), 637–646.
- Dudareva N., Krzyzanowska J., Oleszek W. & Pistelli L., “Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives”, *Critical Rev. Plant Sci.*, (2006), V.25, n° 5, 417440.
- Dung N.T., Kim J.M. & Kang S.C., “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb). Merr and Perry buds”, *Food and Chemical Toxicology*, V. 46, (2008), 3632-3639.
- Dung N.T., Kim J.M. & Kang S.C., “Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb). Merr and Perry buds”, *Food and Chemical Toxicology*, V. 46, (2008), 3632-3639.
- Duraffourd C. & Lapraz J C., “*Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogenie*”, Edition masson, (2002), 7-139 p.
- Eisenreich W., Rohdich F. & Bacher A., “Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids”, *TRENDS in Plant Science*, V. 6, n°2, (200), 78-84.
- Eyele Mve Mba C., Menut C., Lamaty G., et al. “Aromatic plants of tropical central Africa. Part XIX. Volatile components from leaves of two lamiaceae from Cameroon: *leucas deflexa* hook and *Solenostemon monostachyus* (P. Beauv) ” *Briq. Flav. Fragr. J.*, V.9, (1994), 315 p.

□

- Favier A., “Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique”, *L’actualité Chimique*, (2003),108-115.
- Ferhat M A., Meklati B Y. & Chemat F., ”Citrus d’Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d’extractions”, Ed, Office des publications universitaires, Alger, (2010), 157 p.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., et al., “Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils”. *Food Chem.*,V. 102, (2007), 898–904.
- Guignard J. L. & Dupont F., “Botanique systématique moléculaire”, Ed. Masson.13eme Edition.
Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S.L. & Kaushik D., “Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, V. 2, (2010) 12-16.
Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S.L. & Kaushik D., “Pharmacological Potential of *Matricaria recutita*”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, V. 2, (2010) 12-16.
- Hadizadeh I., Peivastegan B. & Hamzehzarghani H., “Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternate*”, *American Journal of Applied Sciences* V.6, n°5, (2009), 857-861.
- Halliwell B. & Whiteman M., “Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?”, *British journal of pharmacology*, V.142, (2004), 31-2.
- Hammer K.A., Carson C.F., Dunstan J.A., Hale J., Lehmann H., Robinson C.J., Prescott S.L., & Riley T.V., “Antimicrobial and anti-inflammatory activity of five *Taxandria fragrans* oils in vitro”. *Microbiology and immunology*, V. 52, (2008). 522530.
- Hattab M E., Culioli G., Piovetti L., Chitour S E. & Valls R., “Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*”, *Journal of Chromatography*, V.1143, (2007), 1–7.

□

□

- Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A., “Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*”, *Separation and Purification Technology*, (2007), 44-50.
- Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., Dallali S. & Sebei H., “Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity”, *Ind. Crop Prod.*, V. 47, (2013), 291-299.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. & Nigam P.S., “*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities”, *Braz. J. Microbiol.*, V. 41, (2010), 1070–1078.
- Imelouane B., El Bachiri A ., Ankit M ., Khedid K ., Wathelet J.P. & Amhamdi H., “Essential Oil Composition and antimicrobial Activity of *Artemisia Herba –alba* Asso

Grown in Morocco “ Banat’s Journal of Biotechnology , V . 1 n° 2, (November 2010) , 48-55

- Isman M.B., Miresmailli S. & Machial C., “Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products” *Phytochem. Rev.*, V.10, (2011), 197–204.
- Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F., “ la connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : entre science et tradition, une application médicale raisonnée”, Springer Science & Business Media, (2013), 226 p.
- Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F., “ la connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : entre science et tradition, une application médicale raisonnée”, Springer Science & Business Media, (2013), 226 p.
- Kaloustian J. & Hadji-Minaglou F., “ la connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie : entre science et tradition, une application médicale raisonnée”, Springer Science & Business Media, (2013), 226 p.
- Kamkar A., Javan A.J., Asadi F. & Kamalinejad M., “The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil”, *Food and Chemical Toxicology*, V.48, (2010),1796-1800.
- Karray-Bouroui N., Rabhi M., Neffati M., Baldan B., Ranieri A., Marzouk B. et al., “Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*” *Industrial Crops and Products*, V.30, (2009), 338–343.
- Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Quaboul B., Chaouch A., Amusant N. & Charrouf Z., “Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc”, *Phytothérapie*, (2014),V.12, 341-347.
- Khorshidi J., Mohammadi R., Fakhr Tabatabaei M. & Nourbakhsh H., “Influence of Drying Methods, Extraction Time, and Organ Type on Essential Oil Content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, *Nature and Science*, V.7, n°11, (2009), 42-44.
- Koechlin-Ramonatxo C., “Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires”. *Nutrition clinique et métabolisme*, V. 20, (2006),165–177.

□

□

□

Laguerre M., López-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M. & Villeneuve P., “Outils d’évaluation in vitro de la capacité antioxydante”, *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, V. 14, n° 5, (Septembre-Octobre 2007), 278-292.

Lahlou M., “Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils”, *phytotherapy Research*, V.18, (2004), 435-448.

Laib I., “Etude des activités antioxydante et antifongique de l’huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*: application aux moisissures des légumes secs”, *Revue Nature & Technologie*, n° 07, (Juin 2012), 44-52.

- Lazouni H.A., Benmansour A., Taleb-bendiab S.A. & Chabane S.D., “Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill”, *Journal of Sciences & Technologie*, V.25, (2007), 7-12.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgard, J.F., Delubac O. & Stocker P., “Durand, P., Prost, M. Stress oxydant et pathologies humaines”, *La Presse médicale*, V. 30, (2001), 10761081.
- Li W., Hosseinian F.S., Tsopmo A., Friel J.K. & Beta T., “Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk”, *Nutrition*, V. 25, n°1, (2009), 105-114
- Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L. & Ming-Jiuan W., “Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn)”, *Journal of food and drug analysis*, V.11, n°1, (2003), 60-66.
- Maffei M.E., “Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles”, *South African Journal of Botany*, V.76, (2010), 612-63.
- Marrouf A. & Tremblin G., “Abrégé de biochimie appliqué”, Ed EDP science”, (2009), 485 p.
- Martín A., Varona S., Navarrete A. & Cocero M.J., “Encapsulation and CoPrecipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils”, *The Open Chemical Engineering Journal*, V. 4, (2010), 31-41.
- Martinez-Cayuela M., “Oxygen free radicals and human disease”, *Biochimie*, V. 77, n°3, (1995), 147-61. 288. Garait B., “Le stress oxydant induit par voie métabolique

□

□

□

(régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin”, Thèse pour obtenir le grade de docteur de l’université Joseph Fourier-Grenoble, (2006).

- Martysiak-Żurowska D. & Wenta W., “A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk”. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, V. 1, n°11, (2012), 83-89.
- Meddour A., Yahia M., Benkiki N. & Ayachi A., “Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa L. ” *Lebanese Science Journal*, V.14, n°1, (2013).
- Miguel, M.G., “Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils”. *Molecules*, V.15, (2010), 9252-9287.
- Molyneux P., “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin”, *J. Sci. Technol.*, V.26, n°2, (2004), 211-219.
- Moncada J., Tamayo J. A. & Cardona C A., “Techno-economic and environmental assessment of essential oil extraction from Oregano (*Origanum vulgare*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in Colombia”, *Journal of Cleaner Production*, (September 2015).
- Morone-Fortunato I., Montemurro C., Ruta C., Perrini R., Sabetta W., Blanco A., Lorusso E., & Avato P., “Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm”, *Industrial Crops and Products*, V.32, (2010), 639-649.
- Neuzil J. & Stocker R., “Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin”, *FEBS Letters*, V. 331, (1993), 281-284.
- NICOLAS J. F., “Progrès en Dermato-Allergologie- Lyon”, John Libby Eurotext, (2013), 391p.
- Ntzimani A.G., Giatrakou V.I. & Savvaidis I.N., “Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated

□

□

□

chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation Innovative”, *Food Sci. Emerg. Technol.*, V.11, (2010), 187–196.

- Official Methods of Analysis (A.O.A.C), 17th Ed, Maryland, U.S.A., (2000), 360 pages.
- Okoh O.O., Sadimenko A.P., Asekun O.T., et al. “The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L.”, *African J. of Biotech.*, V. 7, n°10, (2008), 1500-1502.
- Organisation Internationale de Normalisation (ISO 662), “Corps gras d'origines animale et végétale, Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles”, (1998), 7p.
- Oussalah M., Caillet S., Saicier L., Lacroix M., “Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat”, *eat Science*, V. 73, (2006), 236-244.
- OZENDA P (1991): Flore de sahara (3 édition mise à jour et augmentée), Ed. (C.N.R.S). Paris. 662 pages. + Cartes.
- OZENDA P., 1983.- Flore du Sahara. Ed. 2. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS.), Paris : 401.
- Petrier C., Gondrexon N. & Boldo P., “Ultrasons et sonochimie. Techniques de l'ingénieur”, V. AF6310, (2008), 1-14.
- PHARMACOPEE EUROPEENNE, 2005. 6ème Edition : Tome 1 et 2.
- Pichersky E., Gershenzon J., “The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense”, *Curr Opin Plant Biol.*, V.5, (2002), 237-243.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. & Defraigne J.O., “Physiological action of antioxidant defences”, *Nutrition Clinique et Métabolisme*, V. 16, (2002), 233-239.
- Piyo A., Udomsilp J., Khang-Khun P. & Thobunluepop P., “Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice”, *As. J. Food Ag-Ind. Special Issue*, (2009), S2-S9.

□

□

□

- Popovici C., Ilonka S. & Bartek T., “Evaluation de l’activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH”, *Revue de génie industriel*, V.4, (2009), 25-39.
- Porter N., “Essential oils and their production”, *Crop & Food Research*, n° 39, (2001).
- Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S., “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis”. *Journal of Chromatography*, (2007), V.1163, 2–24.
- Prabuseenivasan S., Jajakumar M. & Ignacimuthu S., “In vitro antibacterial activity of some plant essential oils”, *Bio Med Central Complementart and Alternative Medicine*, (2006), V. 6, N° 39.
- Preema Devi M., Chakrabarty S., Ghosh S K. & Bhowmick N., “Essential Oil: Its Economic Aspect, Extraction, Importance, Uses, Hazards and Quality in : Amit Baran Sharangi, Suchand Datta; Value Addition of Horticultural Crops”, *Recent Trends and Future Directions Springer*, (février 2015), 342 p.
- Proust B., “Petite Géométrie des Parfums”, Éditions du Seuil Paris, (2006), 126 p.
- Quattrocchi U., “CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology” V.5, CRC Press, (mai 2012), 3960 p.
- Regnault- Roger C., Philogène Bernard J.R. & Vincent C. “ biopesticides d’origine végétale”, 2eme Ed., Lavoisier, (2008), 576 p.
- Rolland Y., “Antioxydants naturels végétaux”, *OCL*. V.11, n°6, (2004), 419-424.
- Roux D., Chaumont J.P., Cieur C., Millet J., Morel J.M. & Tallec D., “Conseil en aromathérapie”, *Pro-Officina*, 2ème Edition, (2008), 13-31.
- Santos C., Goreti B., Ilda C., Amílcar T., Fernanda M. & Ferreira, “Antioxidant activity assessment in fruit liquors and spirits: methods comparison”, *Ciência Téc. Vitiv.* V.29, n°1, (2014), 28-34.
- Scherer R. & Godoy H. T., “Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1picrylhydrazyl method”, *Food Chemistry*, V.112, (2009), 654-658.

□

□

□

- Seguin M. Tardif B., Deschenea J., “Physique XXI - Tome C - Ondes et physique moderne”, De Boeck, (2010), 572p.
- Sell, C.S. (2006). “The Chemistry of Fragrance.From Perfumer to Consumer”, 2eme edition,The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., “In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss Food Control”, V.18, (2007), 800–805.
- Sharma O.P. & Bhat T.K., “DPPH antioxidant assay revisited“, Food Chem., V.113, (2009), 1202–1205.
- Sharma R. K., Sharma N., Samant S. S., Nandi S. K. & Palni L. M. S., “Antioxidant Activities in Methanolic Extracts of Olea Ferruginea Royle Fruits” International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, V. 3, n° 2, (March 2013).
- Singh B.P., “Germplasm introduction, exchange, collection and conservation of medicinal and aromatic plants-Their export potential”, 2nd Edition, Aavishkar Publishers, Rajasthan, (2009), 1-26.
- Skold M., Hagvall L. & Karlberg A.T., “Autoxidation of linalyl acetate, the main compound of lavender oil, creates potent contact allergens”, Contact Dermatitis, V.58, (2008), 9-14.

□

□

Skold M., Karlberg A.T., Matura M. & Borje A., “The fragrance chemical β caryophyllene—air oxidation and skin sensitization”, *Food and Chemical Toxicology*, V.44, (2006), 538–545.

Slamenová D., Horváthová E., Kovacikova Z., Kozics K. & Hunakova L.,

“Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents”, *Food Chem.*, V.129, (2010), 64–70.

- Sorg O., “Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality”, *Comptes Rendus Biologies*, V. 327, (2004), 649-662.
- Soto-Mendivil E.A., Moreno-Rodriguez J.F., Estarron-Espinosa M., Garcia-Fajardo J.A. & Obledo-Vazquez E.N., “Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*-E-Gnosis”, V.4, n°16, (2006). 263. Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A. & Belabbas M.A., “Activité antifongique de l’acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus satyroides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques”, *Phytothérapie*, V.1, (2007), 6-14.
- Souza C. R. F., Schiavetto I. A., Thomazini F. C. F. & Olivieira W. P. 2008. “Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spotted bed dryers”, *Brazilian journal of chemical engineering.*, V.25, n°1, (2008), 59-69.
- Subramanion L.J., Zuraini Z. & Sasidharan S., “Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract”, *Journal of Medicinal Plants Research*, V. 5, n°10, (May 2011), 1941-1947.
- Szabo M.R., Iditoiu C., Chambre D. & Lupea A.X., “Improved DPPH determination of antioxidant activity spectrophotometric assay”, *Chem. Pap.*, V.61, n°3, (2007), 214216.
- Szumny A., Figiel A., Gutiérrez-Ortíz A. & Carbonell-Barrachina A.A., “Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method”, *Journal of Food Engineering*, V. 97, n°2, (2010),253-260.

□

- Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J. & Hilali A., “Evaluation de l’activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. ”, Environ. Sci., V. 6, n°4, (2015), 1111-1117.
- Teixeira da Silva J.A., “Mining the essential oils of the Anthemideae”, African Journal of Biotechnology, Vol.3, (2004), 706-720.
- Teuscher E., Anton R. & Lobstein A., “Plantes aromatiques épicées, aromates, condiments et huiles essentielles”, Lavoisier, Edition TEC and DOC, V. 6, (2005), 266-272.
- Thompson J D., Chalchat J C., Michet A. & Linhart Y B., “EHLERS B- Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes”, Journal of chemical ecology, V.29, n°4, (2003).
- Tirzitis G. & Bartosz G., “Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights”, ACTA ABP Biochimica Polonica , V. 57, n° 1, (2010), 139–
- Tsai C.W., Lin C.Y. & Wang Y.J., “Carnosic acid induces the NAD(P)H: quinone oxidoreductase expression in rat clone cells through the p38/nuclear factor erythroid-2 related factor pathway”, J. Nutr., V.141, n°12, (2010), 2119–2125.
- Unsicker S.B., Kunert G. & Gershenzon J., “Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores Curr Opin”, Plant Biol., V.12, n°4, (2009), 479-485.
- VIGAN M., “les huiles essentielles « leur retour et leur toxicité » in : progrès en dermato-allergologie”, bordeaux, John Libbey Eurotext, (2009), 391 p.
- Wang L. & Weller C.L., “Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants”. Trends in Food Science & Technology, -V.17, n°6, (2006), 300-312.
- Wannes W. A., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., et al., “Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower”, An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association Food and Chemical Toxicology, V.48, n°5, (2010), 1362-1370.

□

□

- Wenqiang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T. & Can Q., “Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods”. *Food Chem.* V.1001, (2007), 1558-1564.
- Wilkinson J.M., “Methods for testing the antimicrobial activity of extracts”, Chapter VIII, (2006), 157-165.
- Yan X. & Chen S., “Regulation of plant glucosinolate metabolism”, *Planta*, V.226, (2007), 1343-1352.
- Zelko I.N., Marian T.J. & Folz R.J., “Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression”, *Free radical biology & medicine*, V. 33, (2002), 337-349.
- Zhang X., Gao H., Zhang L., Liu D., Ye X., “Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition”, *Ind. Crops Prod.*, V.39, (2012), 162-169 p.
- Zuzarte M. & Lgia S., “Essential Oils Chemistry In: Damio Pergentino de Sousa : Bioactive Essential Oils and Cancer”, Springer, (octobre 2015), 292 p.
- Zuzarte M. & Lgia S., “Essential Oils Chemistry In: Damio Pergentino de Sousa : Bioactive Essential Oils and Cancer”, Springer, (octobre 2015), 292 p.