

UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Magister

Spécialité Biotechnologies végétales

EXTRACTION, CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE
QUELQUES METABOLITES SECONDAIRES ACTIFS D'UNE
PLANTE A CARACTERE THERAPEUTIQUE, *Mentha rotundifolia* L.

Présenté par

Siham BENTOURA

Devant le jury composé de :

Mme F. SAIDI.	Professeur université Blida 1	Présidente
Mme C. CHAOUIA	M C A université Blida 1	Examinatrice
Mme S. BELHADJ.	Professeur université de Djelfa	Examinatrice
Mr MS. HAMAIDI.	Professeur université Blida 1	Promoteur
MME F. HAMAIDI	M C A université Blida 1	Co-promotrice

Blida Décembre 2015

RESUME

L'étude phytochimique et les extractions réalisées sur *Mentha rotundifolia* L. ont permis de quantifier les fractions apolaire (5.2%) et polaire (15.78%), un rendement en huile essentielle de 0.689 %, des polyphénols totaux (111.21mg EAG /g de MS) et les flavonoïdes (6.68mg E Quercétine/ g de MS).

Le screening phytochimique a permis entre autre de déterminer la présence de certains composés tels que ; les tanins (tanins gallique), les flavonoïdes (Les flavones), les dérivés anthracéniques combinés ((anthranoles, anthranonones et anthranones), les saponosides, les alcaloïdes, et les Hétérosides cardiotoniques.

Les résultats de la chromatographie ont permis de déterminer la composition chimique de l'huile essentielle (Oxyde de pipéritone , oxyde de pipéritène Carvone Borneole Y –Terpinène et Terpinène-4-).

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits vis-à-vis des souches microbienne étudiées a révélé que l'extrait méthanolique a une action inhibitrice plus forte que celle de l'huile essentielle.

L'étude du pouvoir antioxydant a démontré que l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L. présente une capacité de neutraliser le radical libre DPPH puissante en la comparant à l'huile essentielle et L'extrait méthanolique présente une activité antioxydante plus faible que celle de la Quercétine mais plus marquée en présence de la Rutine. Concernant l'huile essentielle son activité s'avère être très faible face à la Quercétine et à la Rutine.

Mots clés : *Mentha rotundifolia* L. ; huile essentielle, métabolites secondaires ;
Activité antioxydante ; effet antimicrobien .

ABSTRACT

The phytochemical study and the extractions of *Mentha rotundifolia* L. performed have enabled us to a non polar fraction registered at 5.2% and a polar fraction at 15.78%, an essential oil yield of 0.689% , 111.21mg EAG/ de MS of total polyphenols and 6.68 mg E Quercetine/ de MS of Flavonoids.

The phytochemical study enabled us also to determine the presence of certain compounds such as tannins (tannins Gallic), flavonoids (flavones), the compounds derivatives (anthranols, anthranonones and anthranones), the saponosids, alkaloids and the heterosids cardiotonics.

The analysis of gas chromatography, allowed as to determine the composition of essential oil (Piperitone oxide, oxide Piperitenone , ,Carvone, Borneole, Y- Terpinene Terpinène-4-ol).

The study of antimicrobial activity of the extracts as for as the stains, revealed that the methanol extract has got sronger inhibitory effect than the effect of essential oil.

The study of antioxidant effect revealed tha the methanol extract has got an ability to neutralyse the free radical DPPH which is more powerfull than the

essential oil. Comparing it to the antioxidants of synthesis (Quercetin and Rutin), the methanol extracts has got an antioxidant activity lower than

the Quercetin but the essential oil activity is more significant if we compare it to the Rutin activity. The essential oil activity is greatly weaker than the Quercetin and Rutin activity.

Keywords: *Mentha rotundifolia* L., essential oil, secondary metabolites, antioxidant Activity, antimicrobial effect.

ملخص

مكنت الدراسة الفيتو كيميائية للنبتة *Mentha rotundifolia* L. تحديد نسب المكونات المستخلصة و هي : الجزء القطبي بنسبة (78. 15 %) و الجزء لا قطبي بنسبة (5.2 %) و الزيوت الأساسية (0.689 %) و البولي فينول الإجمالي (111.21 mg EAG / g MS), (Polyphénols), مركبات الفلا فو نو يد (Flavonoides) (6.68 mg/g EQ/g de) (MS) .

لقد تمكنا من خلال دراسة الفحص الكيميائي من تحديد وجود بعض المواد : مادة الدباغ (les tanins galliques و الفلافونويد (Les flavonoides) مشتقات الأنتراسينك المتصلة (les derivès anthracèniques combinès), الصابونين (saponosides) , و القلويد (Les alcaloides) غليكوزيدات القلب (Hétérosides cardiotoniques). بفعل استعمال تقنية حديثة : الكر و ماتو غرا في الغازية المقرونة بطيف الكتلة استطعنا أن نتعرف على التركيب الجزئي للزيت الأساسية للنبتة (*Mentha rotundifolia* L. وهي , Carvone , Piperitone oxide, oxide Piperitenone , Terpinène-4-ol.(Borneole, Y- Terpinene) . أظهرت دراسة الفعالية ضد المكروبات أن للمستخلصات للنبتة (*Mentha rotundifolia* L.) أثر كبير على المكروبات بالمقارنة مع الزيت الأساسية التي بات لها تأثير مضاد صفيف . كما أكدت دراسة الفعالية المضادة للأكسدة المستخلص النبتة خصائص قوية في دسس الجذور الحرة وذلك بالمقارنة مع الزيت الأساسية و المواد الاصطناعية

كلمات المفتاح . *Mentha rotundifolia* L. ,: الزيت الأساسية المركبات الثانوية. الأثر الضاد للجراثيم الأثر المضاد للأكسدة.

DEDICACES

A ma famille, mes filles (Nesrine, Feriel, et Sara), mon mari Abdelkrim, qui ont toujours été présents par leurs soutiens, leur tendresses, leur amour et beaucoup d'attentions dans les moments les plus difficiles tout au long de la réalisation de ce travail.

A mes parents, à la mémoire de mon père, à ma mère que dieu la garde, qui a toujours crue en moi pour son amour inépuisable, sa bonté et sa tendresse dont je ne saurai mesurés.

A mes frères (Samir, Fayçal, Karim et Chafik), ma sœur Meriem, mes belles sœurs (Nadjet, Sahara et Lesley), mes neveux et nièces.

A ma belle famille.

A tous mes amies et collègues de la faculté Agronomie et Biologie et de l'Institut des Sciences Vétérinaires (ISV), elles sont nombreuses qu'elles se reconnaissent.

REMERCIEMENT

Je remercie dieu le tout puissant en premier lieu de m'avoir donné la santé, la force, le courage et la patience de réaliser ce travail.

Je remercie Mr HAMAIDI, MS. et Mme HAMAIDI, F., pour m'avoir encadré et diriger ce travail avec patience, qu'ils trouvent ici le témoignage de toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury.

- Madame SAIDI, F., pour l'honneur qu'elle a fait en acceptant de présider la soutenance de ce mémoire.
- Madame CHAOUIA, C., pour avoir accepté d'examiner ce travail.
- Madame BELHADJ, S., pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à ceux qui ont généreusement partagé leurs temps et leur bienveillance pour contribuer à la réalisation de cette étude.

Je remercie Madame DAHMANI, N., Professeur a' l'institut de chimie organique de l'Université Houari Boumediene (USTHB), pour son aide précieuse et ses conseils fructifiants.

Un merci très spécial pour mon ami et sœur Lamia pour m'avoir soutenue depuis les préparatifs du concours de Magister jusqu'aux dernières étapes de la mise en forme du mémoire je ne saurai comment la remercier.

Je remercie l'équipe de l'Agence Nationale des Ressources Hydrique (ANRH),

Mes amis sont nombreux, je vous dis tous un grand Merci.

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

DEDICACES

REMERCIEMENT

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	18
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	20
1. Les plantes médicinales	20
1.1. Définition	21
1.2. La phytothérapie	21
1.3. Les préparations thérapeutiques.....	22
1.4. Les métabolites secondaires.....	23
1.5. Les huiles essentielles	29
1.5.1. Définition.....	29
1.5.2. Distribution, localisation et fonction.....	30
1.5.3. Propriétés physiques	31
1.5.4. La composition chimique.....	32
1.5.5. Les groupes d'huile essentielle.....	32
1.5.6. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentiels	33

1.5.7.	Activités biologiques des huiles essentielles.....	33
1.5.8.	Les techniques d'extractions des huiles essentielles.....	34
1.5.9.	Toxicité des huiles essentielles.....	36
1.6.	Activités biologiques.....	36
1.6.1.	Activité antioxydante.....	36
1.6.2.	Activité antimicrobienne.....	38
1.7.	Etude de la plante	43
1.7.1.	Les menthes.....	43
1.7.2.	Choix de la plante.....	45
1.7.3.	Localisation.....	46
1.7.4.	Description botanique.....	46
1.7.5.	Noms communs	47
1.7.6.	Propriétés et utilisation.....	48
1.7.7.	Toxicologie.....	49
Chapitre II : EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES		50
2.	Matériel	50
2.1.	Matériel biologique.....	50
2.2.	Systematique de la plante.....	51
2.6.	Méthodes.	53
2.6.1.	Identification botanique de la plante	53
2.6.4.	Etude phytochimique.....	54
2.7.	Les activités biologiques	69
2.7.1.	L'activité anti radicalaire (antioxydante) des extraits	69
2.7.2.	Activité antimicrobienne.....	72
Chapitre III : résultats et discussion.....		76
3.	Résultats de l'étude botanique de la plante.....	76
3.1.	Etude macroscopique	76
3.2.	Etude microscopique.....	78
3.3.	Résultats de l'étude phytochimique.....	85
3.3.1.	Détermination de la teneur en eau de la plante fraiche	85
3.3.2.	Détermination de la teneur des cendres.....	86
3.3.3.	Screening phytochimique.....	87

3.3.4. Résultats et discussion du dosage de certains principes actifs de <i>Mentha rotundifolia</i> L.....	89
3.3.5. Activités biologiques.....	99

CONCLUSION.....	117
------------------------	------------

REFERENCES

APPENDICES

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Effets biologiques des polyphénols [28].....	25
Figure 1.2: Structure de base des flavonoïdes [30], [19].	26
Figure 1.3: Structure des différentes classes des flavonoïdes [18]....	27
Figure 1.4: Poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'origan [44]	31
Figure 1.5: Glande simple d'origan chargée d'huiles G X800 [45].....	31
Figure 1.6: Représentation schématique d'appareil d'hydro distillation, le Clevenger [83].....	34
Figure 1.7: Montage d'hydro-diffusion [83]	35
Figure 1.8: Montage d'extraction par le CO2 supercritique [84].....	35
Figure 1.9: Schéma du montage d'extraction assistée par micro ondes [83].....	35
Figure 1.10: Principe de la méthode de diffusion par disque [93]	38
Figure 1.11: Aspect microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> (GX1000) [100].	40
Figure 1.12: Aspect microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au M E B (A) et <i>P. aeruginosa</i> au MP (Gx1000) (B) [100].	40
Figure 1.13: Aspect microscopique d' <i>Escherichia coli</i> (ME :A) et (MP : B) [100].	41
Figure 1.14: Observation de <i>Klebsiella pneumoniae</i> au MP après coloration de gram(B) et au MEB (A) [100].....	41
Figure 1.15: Observation de <i>Citrobacter freundii</i> au Microscope Photonique après coloration de Gram. (Gx400) [100].....	42
Figure 1.16: Aspect de <i>Candida albicans</i> au MP (G x 1000) [100].	42
Figure 1.17: Comparaison entre les deux sous espèces de <i>Mentha</i> <i>suaveolens</i> [108].....	46
Figure 1.18: Lieu d'habitat de <i>Mentha rotundifolia</i> L. (Hamdania, Mars ,2013).....	47
Figure 1.19: <i>Mentha rotundifolia</i> L avant floraison, Mars, 2013. (A) et en période de floraison, Juillet, 2013 (B).....	47

Figure 2.1: Echantillon de plante fraiche de <i>Mentha rotundifolia</i> L. (Original ,2013).....	50
Figure 2.2: Carte topographique de localisation de la station de récolte de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	51
Figure 2.3: Echantillon de plante et poudre sèche de <i>Mentha rotundifolia</i> L. (Original, 2013).....	52
Figure 2.4: Protocole expérimental de caractérisation des tanins.....	56
Figure 2.5: Protocole expérimentale de caractérisation des flavonoïdes	57
Figure 2.6: Protocole expérimental de caractérisation des alcaloïdes.	59
Figure 2.7: Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet [126].....	60
Figure 2.8: Protocol expérimental de l'extraction des fractions polaires et apolaires par soxhlet.....	61
Figure 2.9: Protocole expérimentale schématique du dosage des phénols totaux (le test du Folin Ciocalteu) [129].	63
Figure 2.10: Appareillage de type Clevenger [133].....	65
Figure 2.11: Appareillage de type Clevenger (original).....	66
Figure 2.12: forme libre et réduite du DPPH [140].....	69
Figure 3.1: Vue d'une feuille (face supérieure et inférieure) à la loupe binoculaire (Originale).....	77
Figure 3. 2: Fleurs en épis de <i>Mentha rotundifolia</i> L (Originale).	77
Figure 3.3: Vue d'une portion de la tige à la loupe G x 2.5 (Originale).	78
Figure 3.4: Vue d'ensemble d'une racine à la loupe au G X 4.5 (Originale).....	78
Figure 3.5: Coupe transversale au niveau de la feuille de <i>Mentha rotundifolia</i> . L vue au MP Gx100 après double coloration (Originale).....	79

Figure 3.6: Coupe transversale de la feuille de <i>Mentha rotundifolia</i> . L vue au MP, Gx400 après double coloration (Originale). ...	80
Figure 3.7: Poils épidermiques tecteurs et glandes sécrétrices de la feuille de <i>Mentha rotundifolia</i> . L vus au MP, G x 400.après double coloration (Original).....	80
Figure 3.8: Vue d'ensemble d'une coupe transversale d'une tige de <i>Mentha rotundifolia</i> . L en structure secondaire vue au MP, Gx100(A). Les cellules épidermiques (B : Gx400) et le pachyte discontinu (C, Gx100).....	82
Figure 3.9: Coupe transversale au niveau de la zone angulaire de la tige de <i>Mentha rotundifolia</i> . L vue au MP, G x400 apres double coloration (Original).....	83
Figure 3.10: Poils épidermiques de la tige de <i>Mentha rotundifolia</i> . L vus au MP,G x400 après double coloration (Original).....	83
Figure 3.11: Glande sécrétrice au niveau d'une coupe transversale de tige Gx400 (Original).....	84
Figure 3.12: Détail des faisceaux cribro-vasculaire dans une coupe transversale de tige de <i>Mentha rotundifolia</i> L. vus au MP, G x400 (Original).	84
Figure 3.13: Taux d'humidité de <i>Mentha rotundifolia</i> . L.....	85
Figure 3.14: Evolution de la masse en (g) en fonction du temps en jours (J).....	86
Figure 3.15: Pourcentages en cendres et matière organique.	87
Figure 3.16: Pourcentages de la fraction polaire et apolaire de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	89
Figure 3.17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	90
Figure 3.18: Courbe d'étalonnage de la Quercétine.	92
Figure 3.19: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L. par GC/MS.	97
Figure 3.20: Composition en pourcentages des principales classes des familles de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	98

Figure 3.21: Courbe de régression linéaire : le pourcentage CR en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique en ug/ml. (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type).....	99
Figure 3. 22: Pourcentage CR en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de <i>Mentha rotundifolia</i> L. (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type).....	100
Figure 3.23: Courbe d'étalonnage de la Rutine. (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type)	100
Figure 3.24: Courbe d'étalonnage de la Quercétine (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type).	101
Figure 3.25: Comparaison des IC50de l'extrait M-OH de M.r et du standard (Quercétine, rutine).....	102
Figure 3.26: Pourcentage de capture du radical DPPH de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L.....	104
Figure 3.27: Pourcentage CR en fonction de la concentration de l'huile essentielle en ug/ml.....	104
Figure 3.28: Classement du pouvoir anti radicalaire en fonction des IC50	107
Figure 3. 29: Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des souches vis-à-vis des ATB.....	109
Figure 3. 30: Effet des antibiotiques sur les souches bactériennes.	109
Figure 3. 31: Effet de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> sur quelques souches microbiennes (DZI : diamètres des zones d'inhibitions en mm).	111
Figure 3.32: Aromatogramme des huiles essentielles vis à vis de certaines souches bactériennes.	113
Figure 3.33: Effet de l'extrait méthanolique de <i>Mentha rotundifolia</i> sur quelques souches microbiennes (DZI : diamètres des zones d'inhibitions en mm)	114
Figure 3.34: Aromatogramme de l'extrait méthanolique vis-à-vis de certaines souches bactériennes.	115

Figure 3.35: Etude comparative de l'effet antimicrobien de l'extrait
méthanolique et l'huile essentielle de '*Mentha rotundifolia* L.
vis-à-vis de quelques souches microbiennes..... 115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1: Variations de distribution des métabolites secondaires dans la plante	23
Tableau 1.2: Classes importantes des composés phénoliques	24
Tableau 1.3: Les principales classes de flavonoïdes.....	27
Tableau 1.4: Liste des principaux radicaux libres	36
Tableau 1.5: Les principaux antioxydants retrouvés dans les aliments .	37
Tableau 2.1: Souches bactériennes et la souche fongique utilisées.....	52
Tableau 2.2: Volumes de l'extrait et ses additifs.	64
Tableau 2.3: Conditions d'analyses de la CG/MS adaptée par le laboratoire d'analyse organique et fonctionnelle de l'USTHB.....	68
Tableau 2.4: Les différentes concentrations des extraits (concrète polaire et l'huile essentielle).....	70
Tableau 2.5: Les concentrations des extraits (a et b) et leurs additifs en méthanol et solution DPPH.....	71
Tableau 2.6: les disques d'antibiotiques	73
Tableau 3.1: Teneur en eau et matière sèche chez <i>Mentha rotundifolia</i> L.....	85
Tableau 3.2: Teneur des cendres	86
Tableau 3.3: Résultats du screening phytochimique	88
Tableau 3.4: Teneur des phénols de l'extrait méthanolique de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	90
Tableau 3.5: Teneurs en polyphénols de quelques espèces de la famille des Lamiaceae.....	91
Tableau 3.6: Teneur en flavonoïdes (mg E Quercétine/ g de MS (Moyenne des 3 Valeurs ± Ecart type).....	92
Tableau 3.7: Teneurs des flavonoïdes chez d'autres espèces de Menthes.....	93

Tableau 3.8: Rendement des HE de <i>Mentha rotundifolia</i> . L	94
Tableau 3.9: Propriétés organoleptiques de <i>Mentha rotundifolia</i> L.....	95
Tableau 3.10: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	96
Tableau 3.11: % d'identification des familles chimiques de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	97
Tableau 3.12: Activité antioxydante (méthode DPPH) de l'extrait méthanolique exprimé en pourcentage de capture du radical (% CR).	101
Tableau 3.13: Comparaison des IC50 des différentes espèces de la famille des Lamiaceae	103
Tableau 3.14: Activité antioxydante (méthode DPPH) de l'huile essentielle exprimée en pourcentage de capture du radical (% CR).	105
Tableau 3.15: Activité antioxydante des HE de quelques espèces de Menthes.....	105
Tableau 3.16: Comparaison entre activité Antioxydante de HE et celle de l'Extrait.....	106
Tableau 3.17: Résultats de l'antibiogramme (diamètres moyens des zones d'inhibitions \pm écarts types en mm). CHL (Chloramphénicol 30 μ g), PI (acide Pipémidique 20 μ g), FA (Acide Fucidique 10 μ g).....	108
Tableau 3.18: Moyennes des diamètres de zones d'inhibitions en (mm) des HE et l'extrait M-OH Vis-à-vis des souches testées.	110
Tableau 3.19: Degré de sensibilité des souches vis-à-vis des extraits M-OH et HE (175).....	111

INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales, si certaines pratiques paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent être plus fondées et plus efficaces. Pourtant toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et améliorer la santé des humains [1] [2].

Le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres de façon empirique [3]. De nos jours ces plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique. Il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine (dérivé du genre *Cinchona*) employée contre la Malaria, sans la digoxine (du genre *Digitalis*) qui soigne le cœur ou encore l'Ephédrine (du genre *Ephédra*) que l'on trouve dans de nombreuses prescriptions contre le rhume. Ces trois plantes ainsi que beaucoup d'autres sont largement utilisées par la médecine classique [4].

Dans les pays en voie de développement, entre 70% et 95% de la population fait recours aux plantes médicinales pour des soins primaires par manque des médicaments prescrits, mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés directement ou indirectement à partir des plantes médicinales, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles [5].

L'Algérie possède un patrimoine végétal très riche avec 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques qui restent peu étudiées et peu exploitées sur le plan pharmacologique. La valorisation des plantes médicinales

de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain.

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à une plante parmi toutes les variétés de plantes poussant dans le sol algérien, très utilisée en phytothérapie, il s'agit de *Mentha rotundifolia* L.

Notre étude est articulée sur les objectifs suivants :

- ❖ Un screening phytochimique dans le but d'identifier les groupes de métabolites secondaires présent dans la plante.
- ❖ Extraction des huiles essentielles et étude de leur profil chromatographique par CG/MS.
- ❖ Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.
- ❖ Evaluation des activités biologiques à savoir l'activité antioxydante et antimicrobienne.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes médicinales

De tous les temps le règne végétal a offert à l'homme des ressources essentielles à son alimentation, hygiène et sa santé. IL semblerait que l'Homme a connu et utilisé les plantes médicinales depuis la haute antiquité. Toutes les grandes civilisations anciennes (chinoise, romaine, musulmane) ont fait recours aux plantes médicinales aromatiques, pour leurs propriétés médicinales, parfumantes, ainsi que leur utilisations rituelles [6].

L'histoire des plantes fait référence à la médecine grec, habituellement à Hypocrate (300 ans avant J-C), à Dioscoride (1er siècle de notre ère) ou Galien (II^{ème} siècle de notre ère). Bien que l'histoire des plantes soit beaucoup plus ancienne, elle est liée à celle de l'Homme.

L'époque sumérienne est définie par des tablettes d'argiles gravées de signes cunéiformes représentant des recueils de familles de plantes médicinales, près de 250 herbes y sont indiquées, sous forme d'onguents, de tisanes et décoctions.

En Inde les plantes curatives sont mentionnées dans le veda (ensemble quatre recueils antiques contenant les noms de molécules et des remèdes).

Dans la médecine chinoise traditionnelle, l'acte thérapeutique s'applique avant tout, à rétablir l'harmonie entre le corps et l'esprit.

En Afrique, les anciens textes égyptiens font état d'emploi des plantes médicinales. Le papyrus égyptien (environ 1500 ans avant Jésus christ), mentionne 100 herbes, avec nombreuse familles, et indications [7] [8].

1.1. Définition

La pharmacopée française [9] donne une définition claire des plantes médicinales « Les plantes médicinales sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses. Ces plantes médicinales peuvent avoir des usages alimentaires, condimentaires et hygiéniques ».

La pharmacopée française (édition 2012) a structuré ces plantes en deux listes [10]:

-Liste A : constituée de 365 plantes médicinales « plantes utilisées traditionnellement ».

-Liste B : constituée de 123 plantes médicinales « plantes utilisées traditionnellement et dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu ».

Pour chaque plante médicinale, est précisé le nom en français, le nom scientifique, actuellement admis, la famille botanique, et les parties de la plante utilisées et connues pour leur toxicité.

1.2. La phytothérapie

On appelle phytothérapie, la thérapie par les plantes, elle provient de deux mots grec qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». Elle désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes naturels.

On peut la distinguer par trois types de pratiques [11] :

- ❖ Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation des plantes selon leurs vertus découvertes empiriquement.
- ❖ Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent les principes actifs dans les plantes.
- ❖ Une pratique de prophylaxie, déjà utilisée dans l'antiquité (explique le fait qu'on est tous des phytothérapeutes sans le savoir).

1.3. Les préparations thérapeutiques

En raison de la complexité de leur composition, les préparations à base de plantes, ont l'avantage de produire un effet non seulement sur un mécanisme d'action isolé mais interagit avec de nombreuses structures biochimiques, Le spectre de l'efficacité de l'extrait thérapeutique est plus large et ses effets secondaires indésirables sont significativement plus rares et moins prononcés. Le succès d'un traitement aux plantes dépend de leur préparation [12].

1.3.1. Les tisanes

Elles peuvent être utilisées dans le cadre d'un traitement de phytothérapie, pour une indication précise (maux de ventre, migraine) ou simplement comme boisson traditionnelle [13]. Parmi ces tisanes, on retrouve :

a. Les infusions

Elle consiste à verser de l'eau chaude sur une quantité déterminée de plante puis laisser infuser pendant 3 à 15 minutes selon l'effet de la plante choisi [14].

b. Les décoctions

Ce procédé consiste à mettre les plantes dans une casserole, recouvrir d'eau froide et porter à ébullition. Il est conseillé de laisser frémir la préparation pendant une vingtaine de minutes jusqu'à réduction d'un tiers du liquide [14].

c. La macération

Cette technique permet une extraction lente de tous les principes actifs de la plante dont l'action des températures risque de les altérer [16], [15] Elle consiste à laisser une quantité de plantes dans de l'eau, l'huile, du vin, ou dans de l'alcool à froid. La durée de macération peut varier de quelques heures à quelques semaines. Elle est plus efficace que la décoction et l'infusion, car les substances actives se dissolvent dans l'alcool [14].

1.4. Les métabolites secondaires

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires dont on ne connaît toujours pas le rôle. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions ultérieures [17].

1.4.1. Localisation des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires existent dans toutes les parties des plantes, mais sont repartis différemment selon leurs rôles défensifs (tableau 1.1)

Tableau 1.1: Variations de distribution des métabolites secondaires dans la plante

Type de tissu	Molécules retrouvées	Exemples de plantes
Trichomes	Mono terpènes	Lamiacées
Trichomes	Sesquiterpènes	Solanacées
Trichomes	Flavonoïdes	Solanacées
Semences	Aminoacides non protéiques	Légumes
Epidermes	Alcaloïdes	Genista
Paroi des semences	Furanocoumarines	Pastinaca
Paroi cellulaire	Tanins	Beaucoup d'arbres
Ecorce	Quinines	Cinchona
Cellules mortes	Tanins	Plantes ligneuse
Glandes à l'huiles	Furanocoumarines	Citrus
Glandes à l'huiles	Sesquiterpènes	Gossipium

[17]

1.4.2. Classes des métabolites secondaires

Il existe trois grands groupes de métabolites secondaires [18, 19,20] :

- ✓ Les composés terpéniques (les terpènes).
- ✓ Les composés phénoliques (les polyphénols).
- ✓ Les composés aromatiques (les alcaloïdes).

1.4.2.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont considérés parmi les composés les plus importants dans les métabolites secondaires rencontrés dans la nature. Ils sont responsables des arômes et des couleurs chez la majorité des végétaux en plus de leurs intérêts et leurs rôles dans les activités biologiques (tableau 1.2) [21] [22]

Tableau 1.2: Classes importantes des composés phénoliques

Nombre de carbone	Structure de base	Classe
6	C6	Phénols simples benzoquinone
7	C6-C1	Acides phénols
8	C6-C2	Acetophenols, acides benzoïques
9	C6-C3	Acides hydroxy cinnamiques, polypropanes, coumarines, iso coumarines
10	C6-C4	Naphtoquinones
13	C6-C1-C6	Xanthonnes
14	C6-C2-C6	Stilbenes
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes, iso flavonoïdes
18	(C6-C3)2	Lignans , neolignans
30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoides
	(C6-C3-C6) n	Tanins condensés, lignines

[21] [22]

1.4.2.1.1. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols interviennent dans de nombreux processus physiologiques [23] [24] [25] [26] tels que :

- ✓ La qualité alimentaire
- ✓ Dans les des blessures mécaniques de la plante.
- ✓ La capacité que possède une espèce de résister aux attaques des insectes est fortement corrélée avec la teneur en polyphénols.
- ✓ Rôle dans les activités carcinogènes, anti inflammatoire, antiathérogènes, anti thrombotiques, analgésiques, antibactérienne, antivirales , anticancéreuses, anti allergènes, vasodilatateurs et antioxydants.
- ✓ Vu leur intérêt, ces derniers sont de plus en plus utilisés en thérapeutique, regroupés dans la catégorie des veino-toniques et les vasculo-protecteurs (figure 1.1).
- ✓ D'autres molécules polyphénoliques font l'objet d'une étude clinique comme antiagrégants plaquettaires ou hypotenseur, mais sans aucuns résultats probants. [27].

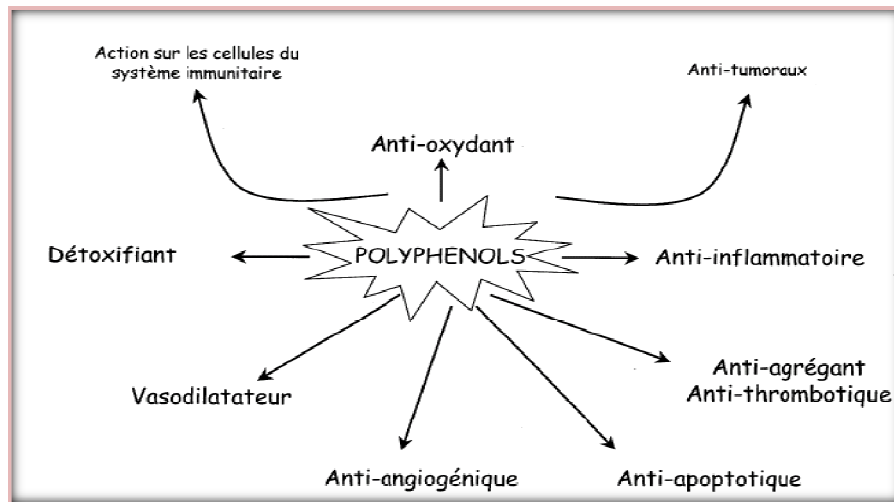


Figure 1.1: Effets biologiques des polyphénols [28].

1.4.2.2. Les flavonoïdes

Représentent une classe des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétale. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsable de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavonoïdes sont aussi ubiquitaires dans la cuticule des feuilles et l'épiderme cellulaire où ils assurent la protection des tissus contre les dommages causés par les radiations UV [19].

1.4.2.2.1. Structure chimique

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes avec un poids moléculaire faible, constitués de 15 atomes de carbones, arrangés comme suit : C6-C3-C6. Ils sont constitués de 2 noyaux aromatiques : A-B, liés par un pont de trois carbones souvent sous forme d'hétérocycles. Les substitutions au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes de familles des flavonoïdes (figure 1.2) [29].

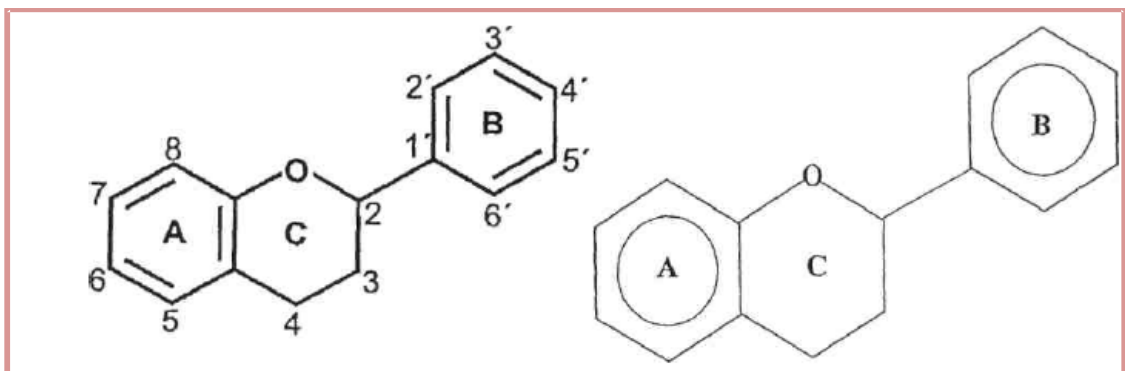


Figure 1.2: Structure de base des flavonoïdes [30], [19].

1.4.2.2.2. Classification

Les différentes classes de flavonoïdes sont [18] :

- ✓ Les Flavonols : Quercétine, Myricétine, Rutine, Kaempferol
- ✓ Les Flavones : Apigénine, Lutéoline,
- ✓ Les Flavonones : Eriodictyol, Naringénine.
- ✓ Les Isoflavones : Génistéine, Daidzéine
- ✓ Les Anthocyanidines : Alpha Tocophérol, Malvidine

Les principales classes de flavonoïdes ainsi que leurs rôles biologiques sont présentés dans le tableau 1.3 et figure 1.3 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Tableau 1.3: Les principales classes de flavonoïdes

Classe	Nombres connus	Rôles biologiques
Anthocyanines	250	Pigments bleu et rouge
Chalcones	60	Pigments jaunes
Aurones	20	Pigments jaunes
Flavones	350	Pigments des fleurs
Flavonols	350	Métabolites repoussant dans les feuilles
Dihydrochalcone	10	Certains ont un gout amer
Proanthocyanidines	50	Substances astringentes
Catéchines	40	Certaines ont les mêmes propriétés que les tanins
Bi flavonoïdes	65	/
Iso flavonoïdes	15	Effet estrogène, toxique pour les champignons

[18]

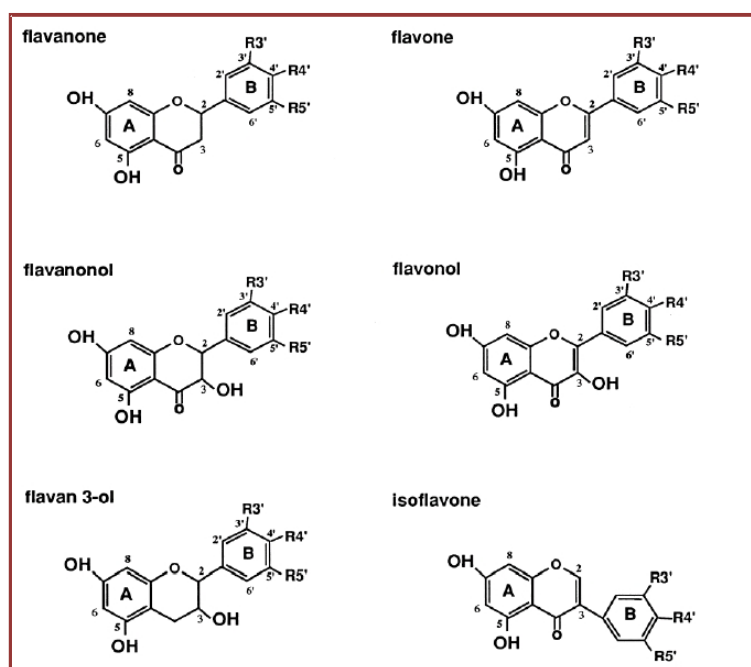


Figure 1.3: Structure des différentes classes des flavonoïdes [18]

1.4.2.2.3. Distribution, localisation et biosynthèse

a. Distribution

Les flavonoïdes sont communs aux bryophytes et représentent principalement les résidus o-glycoside et c- glycoside de flavones et leur dérivés c-uroniques.

Chez les Ptéridophytes il n'y a pas de grandes variétés structurales, on retrouve des Biflavonoides, des Proanthocianines, des O-glycosides Flavoniques, et quelques familles, élaborent des Chalcones. Chez les Gymnospermes, la Proanthocianines est ubiquitaire tandis que chez les angiospermes, il existe une diversité structurale maximale [18].

b. Localisation [18].

- Les flavonoïdes sont hydrosolubles.
- Ils s'accumulent dans les vacuoles.
- Ils peuvent être concentrés dans l'épiderme et le mésophile des feuilles.
- Ils sont localisés au niveau des cellules épidermiques des fleurs.
- Ils ont toujours été détectés sous forme d'aglycones libres lipophile au niveau de la cuticule foliaire. Ceci est particulièrement vrai pour les plantes des zones arides et semi arides.

c. Origine et biosynthèse

La biosynthèse des flavonoïdes s'effectue à partir d'un précurseur commun, le 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalcone par action des enzymes. Des étapes ultérieures de glycosylation et l'acétylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elle se trouve in vivo [32], [33], [34], [35].

1.4.2.2.4. Activités biologique des flavonoïdes

✓ Activité antioxydante

Les flavonoïdes ont été découverts dans les années 30 par Albert Szent Gyorgyi en tant que composés ayant une activité antioxydante prononcée [36]. Ils expriment ces propriétés par piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ce, par suppression de la formation du complexe (ERO) par inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans leur production [37].

✓ Activité anti tumorale

La plupart des flavonoïdes sont in vitro, antimutagène, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anti carcinogènes et inhibiteur de la croissance des cellules tumorales in vitro [19]. Les effets anti carcinogènes de la Quercétine et d'autres flavonoïdes deviennent de plus en plus évidents [38].

✓ Effet cardiovasculaire

Beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes, les rapports épidémiologiques ont démontré une incidence plus limitée sur le cœur des personnes ayant une ingestion diététique élevée en flavonoïdes [39].

1.5. Les huiles essentielles

1.5.1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances liquides complexes organiques et aromatiques, qu'on trouve naturellement dans diverses parties végétales.

Selon la pharmacopée européenne (7^{ème} édition) « l'huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la

vapeur d'eau soit, par distillation sèche, soit par procédé mécanique approprié sans chauffage [19]. Le volume des huiles dépendent du rendement de la distillation, et varient, chez une même plante, en fonction de la saison. Elles sont par conséquent très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [40], [41].

1.5.2. Distribution, localisation et fonction

1.5.2.1. Distribution et localisation

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Parmi le nombre important d'espèces (8000 à 15000), seule 10% sont dites aromatiques, telles que : les Myrtaceae, Lauraceae Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, les Zingiberaceae et les Piperaceae. Ils s'accumulent dans tous les types d'organes végétaux : fleurs (origan), feuilles (citronnelles , eucalyptus) ,écorces (cannelier) , bois (bois de rose) ,racines (vétiver) ,les rhizomes (acore) ,les fruits (badianes) , et les graines (carvi) [19]. Leur synthèse et leur localisation est généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées présentes dans des tissus situés sous l'épiderme [42] (figure 1.4 et figure 1.5).

Les constituants des huiles essentielles peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement subérifiées [43].

Dans certains cas les sites sécréteurs sont superficiels comme les poils ou les trichomes glandulaires [46]. Ils peuvent également être situés à l'intérieur des poches sécrétrices ou des canaux sécréteurs dans le cas des Astéracées [47], [48], [49], [50].

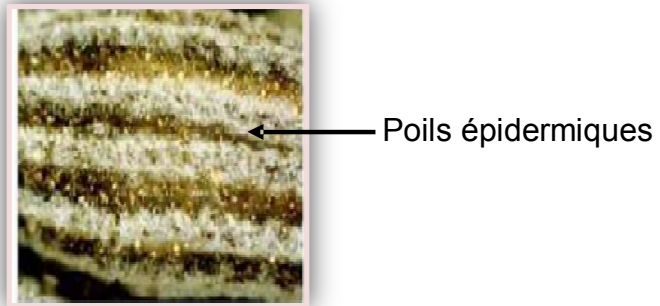


Figure 1.4: Poils épidermiques sur un sépale d'une fleur d'origan [42]



Figure 1.5:Glande simple d'origan G X800 [42]

1.5.3. Propriétés physiques

Malgré leurs différences de structure, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques [4] [43].

- ✓ Elles sont généralement liquides à température ordinaire.
- ✓ Elles sont volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau.
- ✓ Elles sont généralement incolores ou jaune pâle et quelques fois colorées.
- ✓ Leur densité est généralement inférieure à 1.
- ✓ Elles sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans la plupart de solvants organiques et dans les huiles fixes.
- ✓ Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.
- ✓ Très altérable et s'oxydent avec la lumière et au contact de l'air.

1.5.4. La composition chimique

La composition chimique de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte [51] [3] [52]. Son étude est généralement effectuée par [54] :

- ✓ chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- ✓ chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).
- ✓ La résonance magnétique nucléaire (RMN)

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces [55].

1.5.5. Les groupes d'huile essentielle

Selon la voie métabolique utilisée, les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés. Elles peuvent également renfermer divers produits issus des processus de dégradation qui mettent en jeu des constituants non volatiles [19] [56].

a. Les Terpénoïdes

C'est le groupe le plus varié au niveau structural dont 25000 composés appartenant à la famille des terpènes ont été identifiés et connus comme des métabolites secondaire [56] [57].

b. Les composés aromatiques

Ce sont des phenylpropanoïdes (C_6-C_3), moins communs que les terpénoïdes [19].

- On retrouve fréquemment des composés (C_6-C_1) telle la Vanilline.
- Les lactones qui dérivent des acides phénols (Chavicol, Eugénol),
- Des dérivés Méthoxy (Anéthol, Estragol)

1.5.6. Facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

La composition et les rendements des huiles essentielles varient selon diverses conditions [58] [46] [59] [60].

- ✓ L'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, séchage, lieu de séchage, la température, les parasites, et virus et les mauvaises herbes.
- ✓ La complexité des huiles volatiles.
- ✓ Les transformations du matériel végétal issues d'une hydro distillation tardive entraînent des modifications physiques et chimiques des huiles essentielles.
- ✓ Les hybridations, les facteurs de mutations, les polyploïdies, le polymorphisme chimique [61].

1.5.7. Activités biologiques des huiles essentielles.

Le rôle physiologique des huiles essentielles dans le règne végétal est vaste. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés :

- ✓ Les huiles essentielles sont employées pour leur saveurs et odeur en industrie des produits naturels et industrie des parfums [62].
- ✓ Elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne [63] [59] et d'origine fongique [64]. Elles ont un rôle dans l'activité antioxydante [65] [66].
- ✓ Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de plusieurs plantes médicinales [67] [68].
- ✓ Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, sur la levure pathogène *Candida albicans*, ont été mises en évidence [69] [70] [71].
- ✓ Certains (HE) sont très irritantes, astringentes et caustiques [72] [73] [74].
- ✓ Dans le domaine agro-alimentaire, les (HE) peuvent également être employés comme agents de protection des denrées alimentaires [75]
- ✓ Certaines (HE) présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers [76] [77].

- ✓ L'effet des (HE) contre les ulcères gastriques a été démontré par les travaux de JAFRI *et al.*, [78].
- ✓ Ils facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol [79].
- ✓ Des travaux tentent d'évaluer les effets des huiles essentielles sur le comportement des individus [80] et leur utilisation dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues [81].

1.5.8. Les techniques d'extractions des huiles essentielles

Les différents modes d'extraction des huiles essentielles peuvent être classés en deux catégories [82] :

- ❖ Les méthodes classiques qui comprennent l'expression, l'hydrodistillation (Figure 1.6), hydro diffusion (Figure 1.7), l'enfleurage, l'extraction par les solvants organiques.
- ❖ Les méthodes modernes qui sont l'extraction par fluide supercritique et la distillation assistée au four micro ondes (figure 1.8 et figure 1.9)

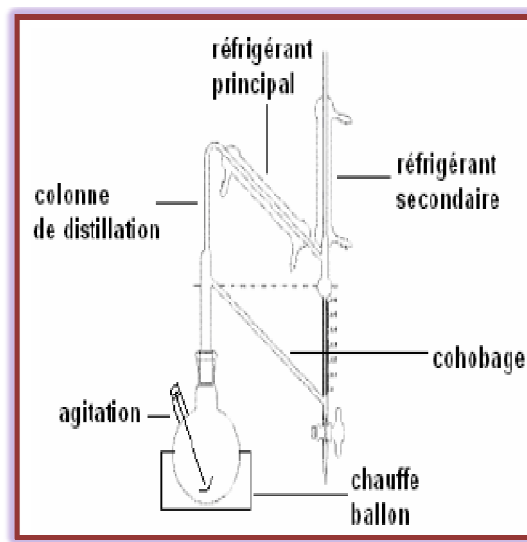


Figure 1.6: Représentation schématique d'appareil d'hydro distillation, le Clevenger [83]

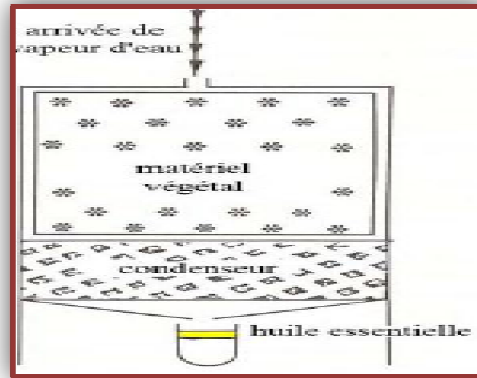


Figure 1.7: Montage d'hydro-diffusion [83]

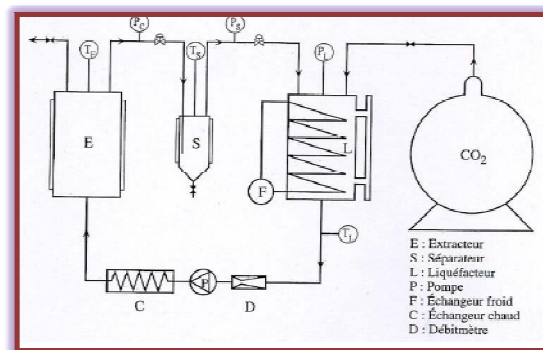


Figure 1.8: Montage d'extraction par le CO₂ supercritique [84]

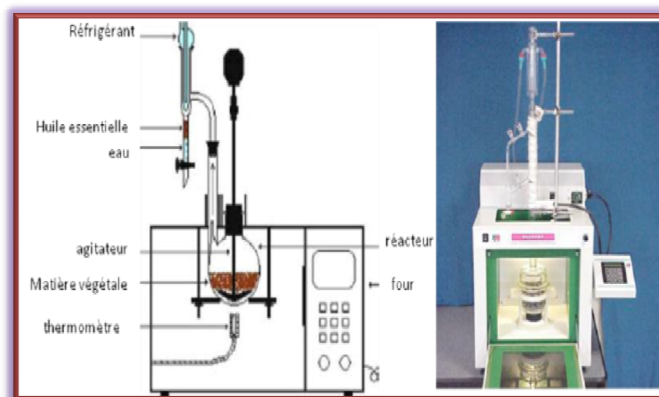


Figure 1.9: Schéma du montage d'extraction assistée par micro ondes [83]

1.5.9. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risques. En effet, certaines sont irritantes, allergènes, phototoxiques, neurotoxiques et cancérogènes [85].

1.6. Activités biologiques

1.6.1. Activité antioxydante

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

1.6.1.1. Les radicaux libres

Ce sont des entités chimiques produites quotidiennement par l'organisme, comportant un électron célibataire [86], ils deviennent nocifs quand ils sont en excès et induisent certains dommages au niveau de la structure des protéines, des lipides, [87] et des acides nucléiques [88], entraînant un stress oxydant qui intervient dans l'induction des processus de vieillissement cellulaire accéléré et au développement des pathologies humaines (tableau 1.4).

Tableau 1.4: Liste des principaux radicaux libres

Radical	Formule
Anion superoxyde	O_2^-
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Hydroxyle	OH
Peroxyle	$RCOO^-$
Hydro-peroxyde	$ROOH$
Alcoxyle	$RO\cdot$
Oxygène singulet	$1/2O_2$
Oxyde nitrique	$NO\cdot$

[89]

1.6.1.2. Types d'antioxydants

Des systèmes de défenses permettent de prévenir la formation radicalaire et de limiter les lésions d'oxydations résultantes. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle.

a. Les antioxydants endogènes

Ce sont des enzymes ou protéines élaborés par notre organisme en présence de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge [90].

b. Les antioxydants exogènes

Ils sont présents dans l'alimentation tels que : la vitamine A, C, E (tableau 1.5), les polyphénols en particulier les flavonoïdes et les cofacteurs des enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants endogènes [90].

Tableau 1.5: Les principaux antioxydants retrouvés dans les aliments

Antioxydants	Protège contre :	Source
Vitamine C	Les maladies cardiovasculaires, les cataractes, et certains types de cancers	Agrumes, tomate, melon, kiwi, poivron, brocoli
Vitamine E	Les maladies cardiovasculaires, cancer de la prostate, ralenti la maladie d'Alzheimer.	Noix, graines, les huiles, fruits, et légumes
Les caroténoïdes	Les cancers du poumon, et maladies cardiovasculaires	Carotte, patate douce, courge, brocoli, chou frise, épinard, et les fruites : abricot, pêche.
Sélénium	Réduction de l'incidence des cancers de la prostate, du colon, et du poumon	Céréales complètes, noix, oignons, l'ail, volaille, viande rouge.
Les flavonoïdes	Cancers	Bleuet, cerise, canna berge, mure, cassis, prune raisins rouge.

1.6.1.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Un antioxydant peut agir de diverses manières [91] :

- Il peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même.
- Il peut absorber l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur.
- Il peut aussi agir par chélation avec des métaux ralentissant ainsi les réactions de fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène).

1.6.2. Activité antimicrobienne

Les plantes aromatiques sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour leurs saveurs qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Leur richesse en composés phénoliques leur confère une forte activité antimicrobienne à large spectre sur les bactéries [74] [73].

1.6.2.1. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

1.6.2.1.1. L'aromatogramme

Il est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion sur milieu gélose (figure 1.10) [92].

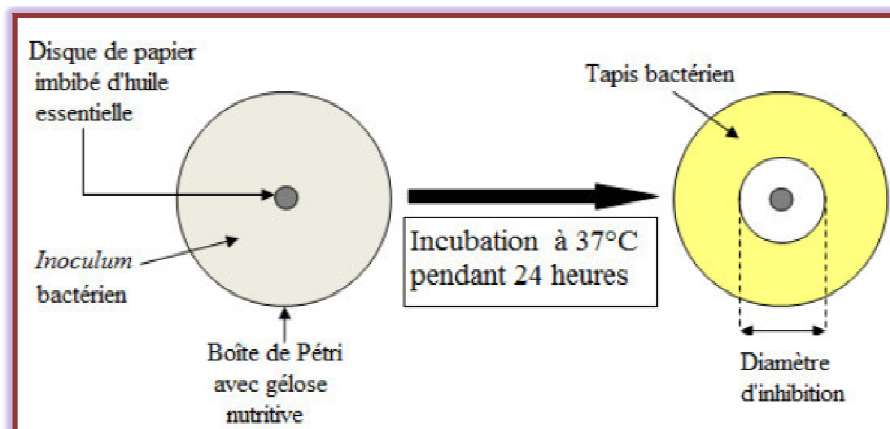


Figure 1.10: Principe de la méthode de diffusion par disque [93]

a. Méthode de diffusion en puits

Elle assure une diffusion radiale des huiles essentielles ou substances à tester en donnant une zone d'inhibition claire parfaitement mesurable [94].

b. Méthode de dilution

Les extraits de plantes à tester sont mélangés à des concentrations connues d'extraits avec le milieu de culture [95].

c. Méthode de micro atmosphère

C'est une technique qui nécessite un dépôt de disques imprégnés d'extraits à tester au centre du couvercle de la boîte de pétri puis renversés et mise en incubation. L'huile s'évapore dans l'atmosphère et peut exercer un effet inhibiteur sur les microorganismes [96].

1.6.2.1.2. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide

Elle est réalisée par repiquage des zones d'inhibition formées [97] [98].

- ❖ S'il y a croissance bactérienne, notre substance ou l'huile à tester a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- ❖ S'il n'y a pas croissance bactérienne, notre substance a un effet bactéricide vis-à-vis de la souche.

1.6.2.2. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

1.6.2.2.1. Staphylococcus aureus

Les staphylocoques sont des cocci Gram positif, irréguliers, aérobie-anaérobie facultatif, s'assemblent en forme d'une grappe de raisin (figure 1.11) et sont responsables des infections communautaires et nosocomiales [99] [28].

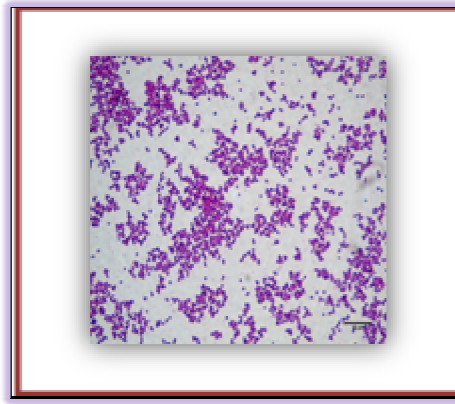


Figure 1.11: Aspect microscopique de *Staphylococcus aureus* (GX1000) [100].

1.6.2.2.2. Pseudomonas aeruginosa

Le genre *Pseudomonas* est un bacille Gram négatif, mobile, aérobic stricte (figure 1.12) c'est le germe -type des infections hospitalières et nosocomiales [28] [99].

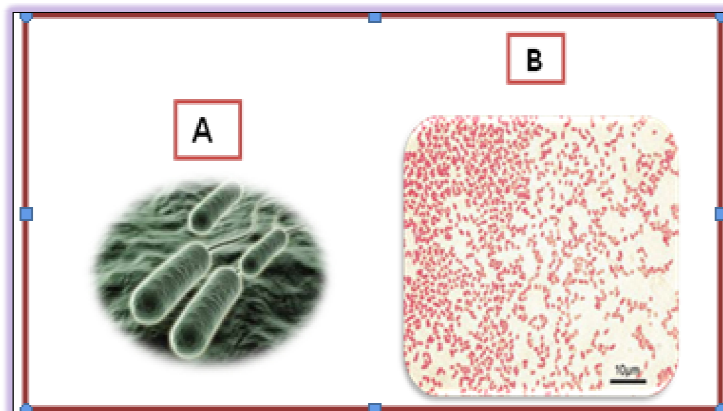


Figure 1.12: Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* au M E B (A) et *P. aeruginosa* au MP (Gx1000) (B) [100].

1.6.2.2.3. Escherichia coli

C'est l'espèce dominante de la flore aérobic du tube digestif (figure 1.13), elle est Gram négative [99].

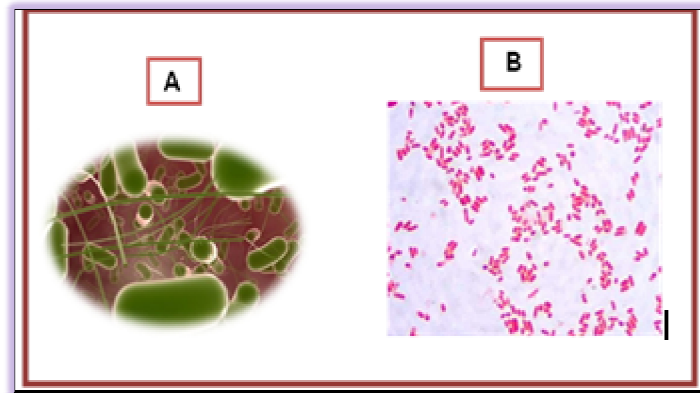


Figure 1.13: Aspect microscopique d'*Escherichia coli* (ME :A) et (MP : B) [100].

1.6.2.2.4. *Klebsiella pneumoniae*

C'est des bacilles à Gram négatif, immobiles, capsulés, appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae (figure 1.14) [99].

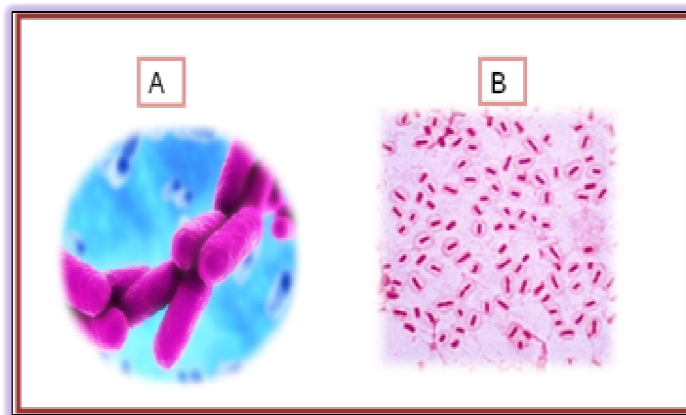


Figure 1.14: Observation de *Klebsiella pneumoniae* au MP après coloration de gram(B) et au MEB (A) [100].

1.6.2.2.5. *Citrobacter freundii*

C'est un Bacille à Gram négatif, mobile, responsable d'infections urinaires, infections de plaies et de septicémie (figure 1.15) [99].

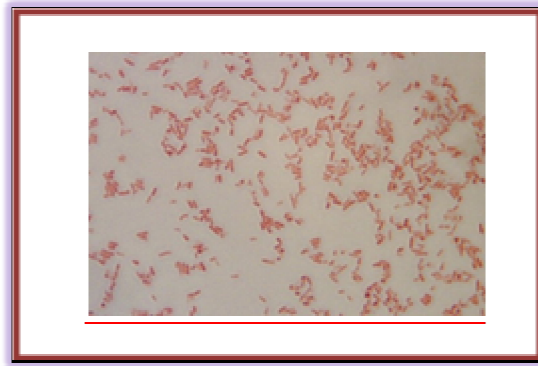


Figure 1.15: Observation de *Citrobacter freundii* au Microscope Photonique après coloration de Gram. (Gx400) [100].

1.6.2.2.6. Salmonella typhimurium

C'est des bacilles à gram négatif, Aérobie- anaérobie facultatif, responsables de gastro- entérites, infections alimentaires et fièvre typhoïde [99].

1.6.2.2.7. Candida albicans

C'est une Levure non pigmentée,, non capsulée, à bourgeonnement multiple. Elle est saprophyte (figure 1.16).endogène et responsable de gastro-entérites et infections alimentaires [101].

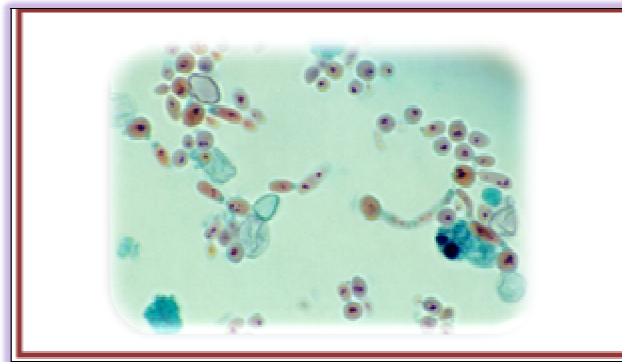


Figure 1.16: Aspect de *Candida albicans* au MP (G x 1000) [100].

1.7. Etude de la plante

1.7.1. Les menthes

Les menthes sont des plantes médicinales très anciennes, les archéologues ont découvert des feuilles de menthe dans les pyramides d’Egypte vieilles de 3000ans [102] [103].

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, ce sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des Lamiaceae. Elles regroupent une vingtaine d’espèces dont 5 ou 6 sont utilisées en phytothérapie. [104]. Elles renferment 50 à 85% de Menthol, 20 à 25 % de Menthone ,6% à 12% de Tanins et de Flavones et d’autres substances aromatiques, dont la quantité et la qualité différent d’une plante à l’autre [105].

Les menthes appartiennent à : [106]

Embranchement	—————>	Angiospermes
Famille	—————>	Lamiacées
Sous famille	—————>	Nepetoides
Tribu	—————>	Menthae
Genre	—————>	Mentha

On connaît plusieurs espèces de menthe, Linné, a publié une monographie de cette plante, les principales sont [106] :

<i>Mentha aquatica</i> Lin	→	La menthe aquatique
<i>Mentha gentilis</i> , lin	→	La baume des jardins
<i>Mentha piperita</i> , lin	→	La menthe poivrée
<i>Mentha pelgium</i> , lin	→	La menthe pouliot
<i>Mentha sylvestris</i> , Lin	→	La menthe sauvage
<i>Mentha rotundifolia</i> , Lin	→	Menthastre

1.7.1.1. Utilisation et vertus des menthes

Selon Al Idrissi. (1982), les différentes vertus sont:

- ✓ Elles fortifient le système nerveux, c'est un stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible,
- ✓ Le Menthol, composant majoritaire des Menthes lui confère de très nombreuses vertus thérapeutiques : anti diarrhéiques, bactériostatique, antiseptique, analgésique, action tonique ; stomachique stimulante, et carminative.
- ✓ Les feuilles sont utilisées en décoction pour calmer l'excitation, les maux de tête et facilite la digestion et en infusion pour parfumer des boissons et plus particulièrement les thés.
- ✓ elles peuvent être utilisées comme condiments.
- ✓ Elles aromatisent certaines cigarettes, savons, eaux de bain et chewing-gum
- ✓ Elles entrent dans la composition des médicaments d'usage très variés aromatisent les dentifrices et les collutoires.

1.7.2. La plante étudiée

Mentha rotundifolia L Hudson est synonyme de *Mentha suaveolens* ssp *suaveolens* L Hudson, c'est une plante vivace appartenant à la famille des lamiacées fréquemment retrouvée dans les bords des chemins et les endroits humides [107].

La *Mentha suaveolens* présente deux sous espèces, la sous espèce *suaveolens*, présente en Europe, l'Afrique du nord, l'Amérique et le Japon et la sous espèce *insularis* absente en Algérie, elle est endémique de la Corse et la Sardaigne [108]. La différenciation des sous espèces peut être réalisée en prenant en considération les différents paramètres morphologiques (couleurs, forme des feuilles et des fleurs, absence ou présence des pétioles) (figure 1.17).

Des travaux effectués sur 58 échantillons d'huiles essentielles isolées de plants de *Mentha rotundifolia* poussant à l'état sauvage en Corse suivie par une analyse statistique des données permet une identification claire des deux sous espèces. [108].

Mentha rotundifolia L., dont le nom vernaculaire est « Timarssat », présente des feuilles aussi longues que large, sessiles et des fleurs violettes, elle peut être comme un hybride de *Mentha longifolia* L et de *Mentha suaveolens* L [107], [108], [109]. Alors que pour d'autres auteurs *Mentha rotundifolia* L. et *Mentha suaveolens* L correspondent à la même espèce [110].

Le problème d'hybridation interspécifique et intraspécifique chez les menthes rend l'identification très complexe et de nombreux auteurs publient toujours des rectificatifs concernant cette espèce [108].

Cependant cette plante a fait l'objet d'étude approfondie impliquant sa composition chimique et son utilisation thérapeutique [107] [111].

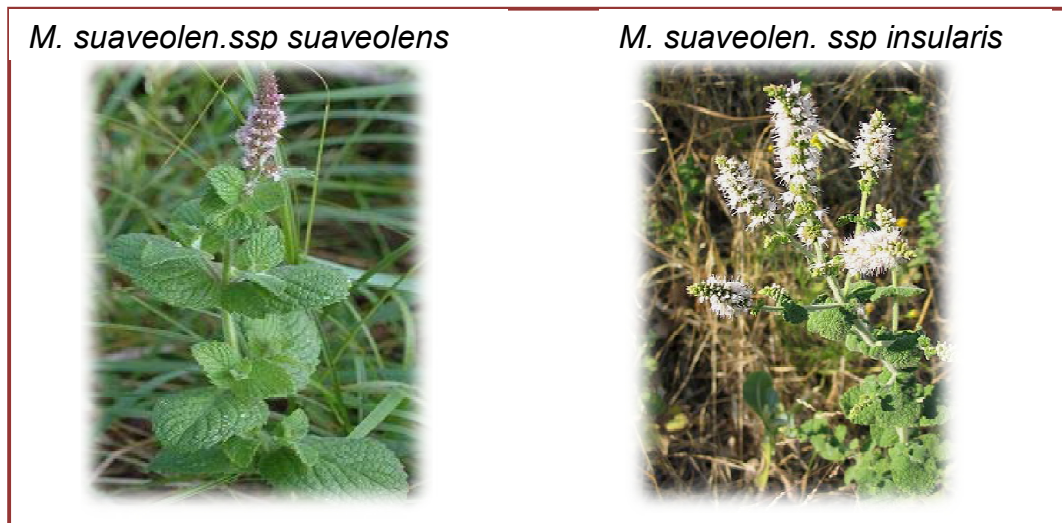


Figure 1.17: Comparaison entre les deux sous espèces de *Mentha suaveolens* [108]

1.7.3. Localisation

Mentha rotundifolia L. se retrouve particulièrement dans les milieux humides, les bords des eaux (figure 1.18), des plaines et des montagnes à 2100 mètre [112]. Elle existe en Europe, et l'Afrique du Nord, dans toute la méditerranée sauf en Chypre, en Grande Bretagne et en Autriche [112], [113].

1.7.4. Description botanique

Mentha rotundifolia. L. est une plante vivace à tiges typique des labiées, dressées dont les plus âgées sont légèrement lignifiée, son hauteur est de 25 à 80 centimètre. L'ensemble de la plante est recouvert de poils denses et blanchâtres la rend douce au toucher, comme toutes les menthes elle dégage une odeur caractéristique rappelant celle de la pomme. Les feuilles de couleur vert vif, sessiles, ovales et presque ronde de 4.5 cm de long et 3cm d'épaisseur [112] [13]. Concernant les fleurs, elles sont de couleur blanches à mauves claire de 5 millimètre de long se rassemblent et se réunissent en grappes ou en épis (figure 1.18 et Figure 1.19).

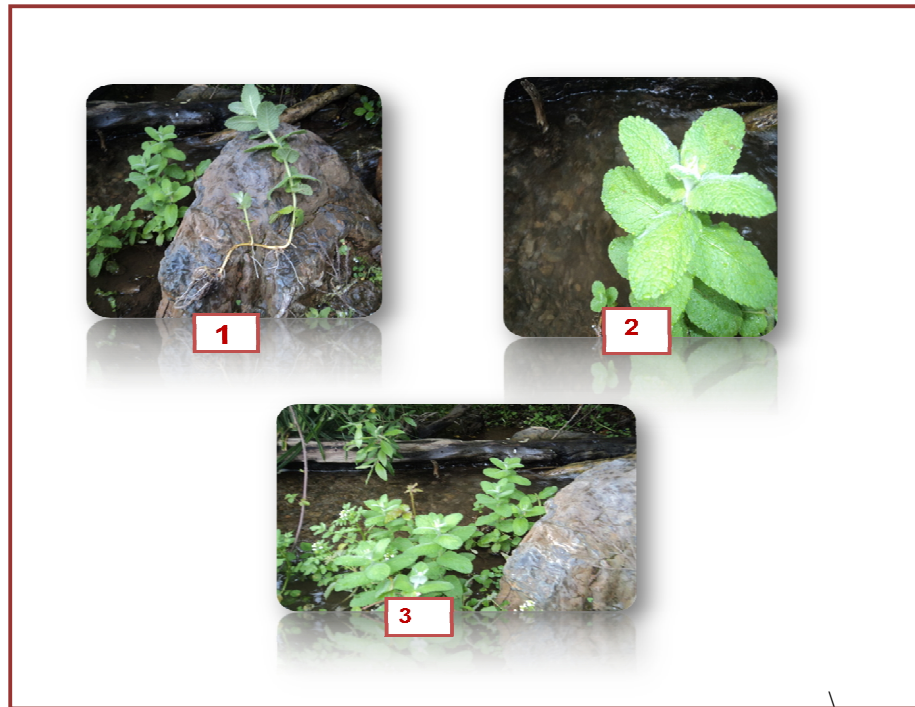


Figure 1.18: Lieu d'habitat de *Mentha rotundifolia* L. (Hamdania, Mars ,2013)

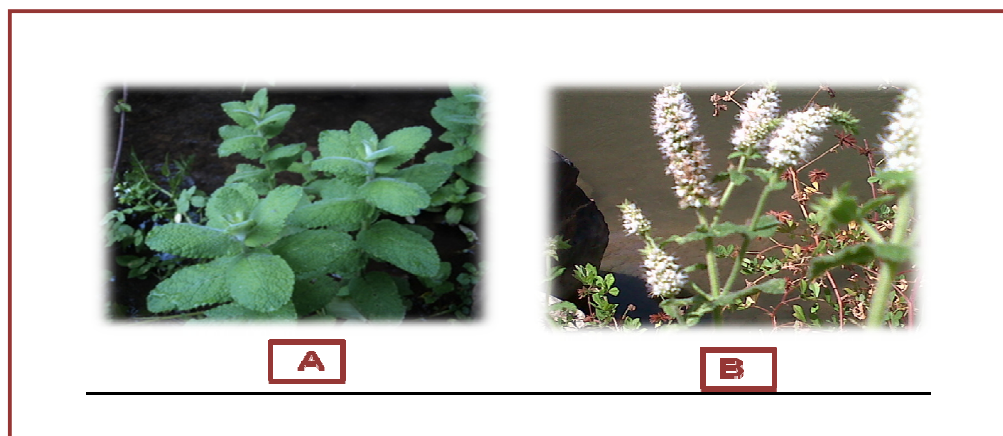


Figure 1.19: *Mentha rotundifolia* L avant floraison, Mars, 2013. (A) et en période de floraison, Juillet, 2013 (B).

1.7.5. Noms communs

1.7.5.1. En Algérie

Diverses appellations lui sont attribuées telles que : Timersitt, Timersad sa prononciation diffère légèrement d'une région à une autre.

✓ Cette plante est signalée sous le nom de Timersudt, [114].

- ✓ Selon G- HUYGHE, signalée comme Himersad = menthe [115].
- ✓ Dans les Aurès on attribue au nom scientifique *Mentha Rotundifolia* L. le nom chawi de Tamersout.
- ✓ Dans la région berbère on lui attribue le nom de Morsot [116].

1.7.5.2. Dans d'autres pays

Mentha rotundifolia L possède plusieurs autres appellations à travers l'Europe tels que [111]:

- ✓ Français : Menthe, Menthe à feuilles rondes, Menthe crépue, Menthe du Nil
- ✓ Allemand : Apfelminze, Bastardrossminze, Bowles Apfelminze, Runde Minze
- ✓ Anglais : Apple mint, Roundes-leaved mint
- ✓ Italien : Mentastro, Menthone
- ✓ Espagnole : herba buena de burro
- ✓ Portugais : Hortela' -comum, Hortela' de -cavalo, Mentrastro
- ✓ Néerlandais : Aakruid, Bosmunt, wittemunt, wollige munt
- ✓ Maroc : Timidja, l'mersita

1.7.6. Propriétés et utilisation

Comme toutes les plantes médicinales, *Mentha Rotundifolia* L. possède des effets très marquants [112] [117] [118] [119].

- ✓ Effets cardiovasculaires, activités hypotensives, vasodilatateurs et bradycardies.
- ✓ Propriétés antibactériennes et antifongiques
- ✓ Agit comme agents retardant la reproduction du vecteur de malaria *Anophèle septensis*.
- ✓ Agit comme bactéricides pour purifier l'eau, contre la nausée, les maux de tête, et les piqûres d'insectes.
- ✓ En Algérie les feuilles et les tiges sont consommées généralement en décoction par voie orale contre les troubles et les coliques digestives, contre les vertiges et le refroidissement, -Les feuilles séchées sont employées comme laxatif [118].

- ✓ Elle est également utilisée en culinaire, dans les boissons (alcools, liqueurs, sirop, vinaigre), dans les condimentaires (grillades, salades, accompagnements des viandes, et des légumes), les desserts (accompagnement des glaces, des fruits et aromatise les confitures), les sauces [112].
- ✓ Dans plusieurs régions de l'Aurès et de l'Algérie, la plante est associée à la pâte afin de rehausser le goût du pain et de l'aromatiser. Ce dernier porte le nom berbère de Timarsitin, en arabe le pain dumghan [119].

1.7.7. Toxicologie

A des doses usuelles, la consommation de ses parties aériennes à des fins culinaires ou pour préparer des boissons d'agrément, ne présente aucun risque de toxicité [105].

CHAPITRE II : EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

L'expérimentation a été réalisée au niveau de deux laboratoires de recherche de l'université Blida 1 de la faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV), il s'agit du Laboratoire d'amélioration végétale, le laboratoire des biotechnologies végétales et le laboratoire de recherche de reproduction animale de l'Institut des Sciences Vétérinaires (ISV).

L'expérimentation s'est étalée sur une année, de Mars 2013 à Mars 2014.

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

L'étude a porté sur l'espèce *Mentha rotundifolia* L. (Menthe à feuilles rondes) appartenant à la famille des Lamiaceae, connue pour ses vertus thérapeutiques (figure 2.1).



Plante fraiche

Figure 2.1: Plante fraiche de *Mentha rotundifolia* L. (Original ,2013)

2.2. Systématique de la plante

La classification botanique de *Mentha rotundifolia* L. [120].

Embranchement	→	Phanérogames
Sous embranchement	→	Angiospermes
Classe	→	Dicotylédones
Sous classe	→	Gamopétales
Famille	→	Lamiaceae
Genre	→	Mentha
Espèce	→	<i>Mentha rotundifolia</i> L.Huds

2.3. Récolte

La récolte de la plante a été réalisée durant la période allant du mois d'Avril au mois de Mai 2013 au niveau de la station de Cherkia dans la région d'El Hamdania, à une Altitude de 450m, une Longitude Y= 4025-455-65 et à une Latitude X= 480- 803- 03) (figure 2.2).



Figure 2.2: Carte topographique de localisation de la station de récolte de *Mentha rotundifolia* L.

2.4. Séchage et broyage

Le matériel récolté est séché à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante dans un endroit aéré durant 15 jours. L'échantillon est finement broyé à l'aide d'un mixeur électrique, la poudre végétale obtenue est stockée dans des bocaux fermés hermétiquement. Pour l'ensemble de notre expérimentation nous avons utilisé approximativement 4 Kg de matière végétale sèche (figure 2.3).

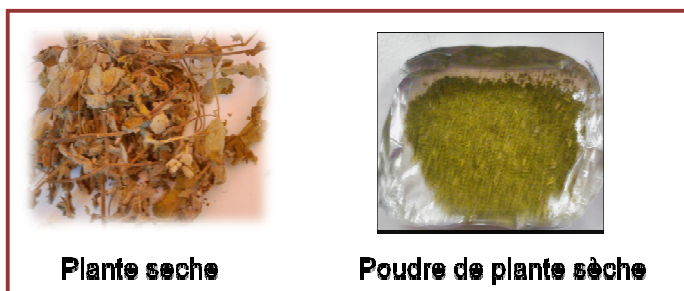


Figure 2.3: Echantillon de plante et poudre sèche de *Mentha rotundifolia* L. (Original, 2013).

2.5. Matériel biologique utilisé

Nous avons utilisé 6 souches bactériennes et une souche fongique (tableau 2.1) provenant toutes du laboratoire de bactériologie de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Tableau 2.1: Souches bactériennes et la souche fongique utilisées

Le Gram	Les souches	N° ATCC
Bactérie Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	28923
Bactéries Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27859
	<i>Salmonella typhimurium</i>	4404540
	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Citrobacter freundii</i>	1554512
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603
Souche fongique	<i>Candida albicans</i>	1023

2.6. Méthodes.

2.6.1. Identification botanique de la plante

L'identification de la plante s'est faite au niveau de trois laboratoires :

- Le laboratoire de biologie végétale du département de biologie.
- Le laboratoire de Botanique du département d'agronomie
- Le département de Botanique de l'Ecole National Supérieure d'Agronomie d'El Harrach (ENSA).

2.6.2. Détermination de la teneur en eau

Le protocole adopté est celui de ZERRAD et *al.*, (2006) [121].

a. Plante fraîche

Les feuilles fraîches sont pesées (PF) puis séchées à l'étuve ventilée à 75 °C.

Elles sont ensuite pesées toutes les 24h jusqu'à l'obtention d'un poids constant (PS). La teneur en eau (T) est calculée comme suit [121]:

$$\% \text{ / g de poids frais} = 100 \times (\quad - \quad) /$$

T : teneur en eau ou humidité

PF : poids frais en (g) avant dessiccation

PS : poids sec en (g) après dessiccation

La teneur en matière sèche (MS) est calculée selon la relation suivante :

$$\% = 100 -$$

b. Poudre sèche

Le taux d'humidité de la poudre (T) est calculé comme suit [121]:

$$= 100 \times (\quad - \quad) /$$

2.6.3. Détermination de la teneur en cendres

La minéralisation a été réalisée selon le protocole de MARTIN et *al.*, (1984) [122].

a. Principe

La technique consiste à l'incinération de la poudre végétale ou drogue jusqu'à l'obtention des cendres blanches.

b. Technique

Une prise d'essai P (1g) de feuilles séchées est introduite dans un four à moufle et calcinée au rouge entre 500 et 550°C pendant 6 heures jusqu'à la disparition totale de toutes les particules charbonneuses. Après 24 heures, la capsule est introduite dans un dessiccateur pendant 15 mn avant d'être pesée. La mesure obtenue est rapportée à 100g de plante sèche.

c. Expression des résultats

La détermination du taux des cendres (T%) se fait différence de poids la formule suivante :

$$\% = (P1 / P) \times 100$$

Soit :

P1 : poids des cendres contenues dans la capsule

P: poids de la drogue prise essai

2.6.4. Etude phytochimique.

Cette étude a été réalisée par un screening phytochimique et une analyse de la fraction volatile (huile essentielle) et la fraction non volatile de la plante.

2.6.4.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée.

a. Principe

Basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant des réactions de précipitations, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de colorations [123] [124]

2.6.4.1.1. Caractérisation des tanins

La présence de tanins catéchiques et galliques a été mis en évidence à l'aide du perchlorure ferrique [124].

➤ L'infusé à 5%

5g de poudre de l'échantillon dans 100 ml d'eau bouillante. Après 15 minutes, la suspension est filtrée et rincée pour obtenir 100 ml d'infusé.

- Les tanins galliques, hydrolysables, sont mis en évidence par ajout de 15 ml de réactif de Stiasny à 5 ml de l'infusé à 5 %. Après 15 mn de chauffage au bain marie à 90° C, le mélange est filtré et saturé par 5 g d'acétate de sodium, ensuite on ajoute 1 ml de FeCl_3 à 5%. L'apparition de d'une teinte bleu- noire indique la présence de tanins galliques.

- Les tanins catéchiques, sont caractérisés par addition de 1 ml de HCL concentré à 5 ml de d'infusé. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. Les tanins catéchiques sont révélés en présence d'alcool amylique par l'apparition d'un précipité rouge faute de leur insolubilité (Figure 2.4).

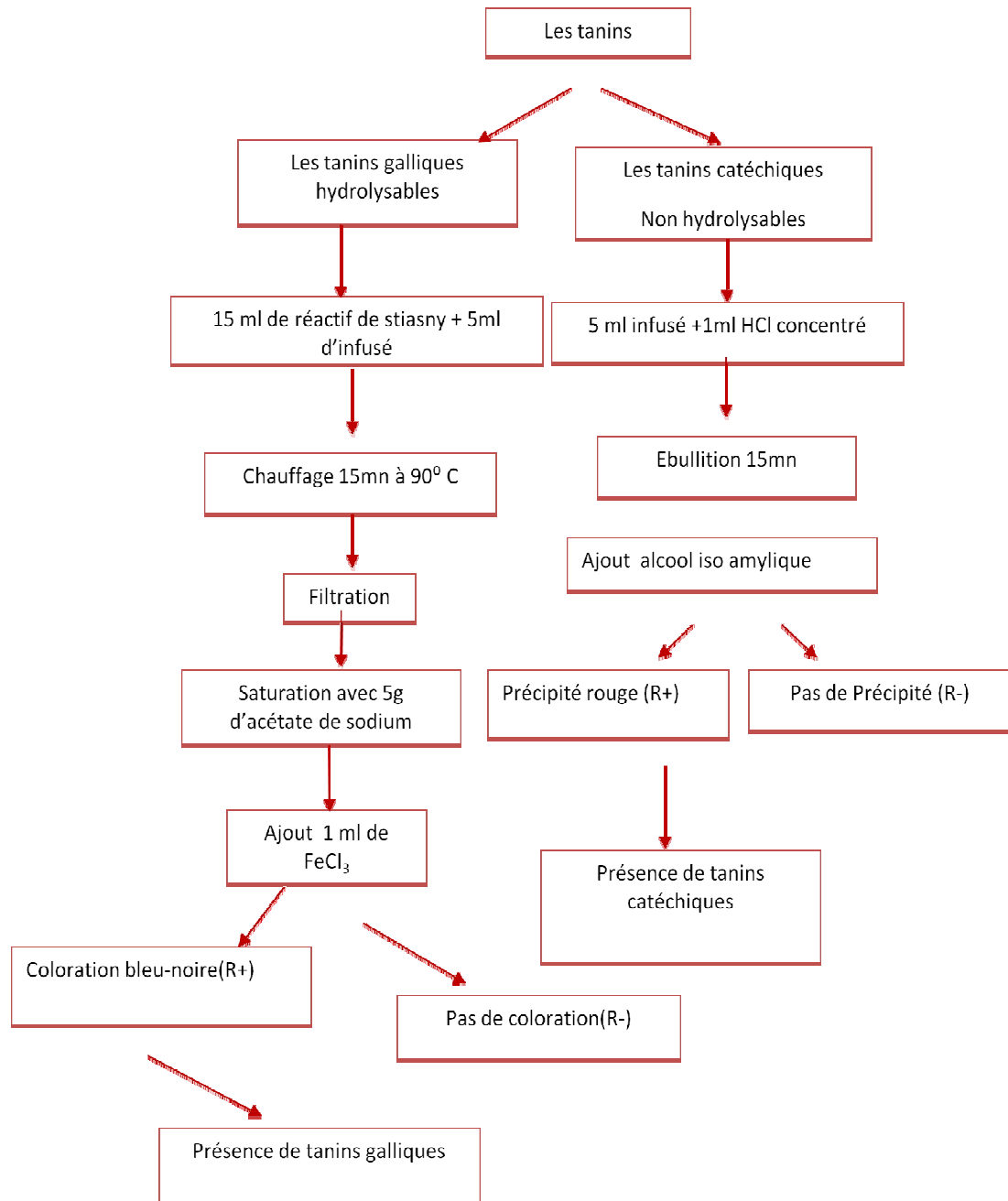


Figure 2.4: Protocole expérimental de caractérisation des tanins

2.6.4.1.2. Caractérisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes pigments quasiment universels des végétaux, constituent une grande famille de composés très souvent abondamment présents dans les plantes. Plusieurs tests de caractérisations permettent de mettre en évidence différents types de flavonoïdes [124].

➤ Les réactions à la cyanidine

Ces réactions permettent de révéler la présence de flavonoïdes libres (flavones et dihydroflavonols). A 5 ml d'infusé à 5%, ajouter 5 ml d'une solution de HCl concentré à 50% dans l'éthanol à 95% (alcool chlorhydrique). Ensuite, ajouter 1 ml d'alcool iso amylique et quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration rose-orange (flavones), ou rose violacée (flavanones) révèle la présence de flavonoïdes libres (figure 2.5).

Les leucoanthocyanes sont également révélés par la réaction à la cyanidine mais sans ajout de copeaux de magnésium, après 15 mn de chauffage au bain marie, l'apparition d'une coloration rouge (rouge- cerise) est caractéristique de leur présence (flavonols et flavanonols).

Les anthocyanes sont révélés par ajout de 5ml d'infusé à 5% de 5 ml de H₂SO₄ à 10% et 5 ml de NH₄OH à 50%. Si la coloration de l'infusé s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure à la présence d'anthocyanes (figure 2.5).

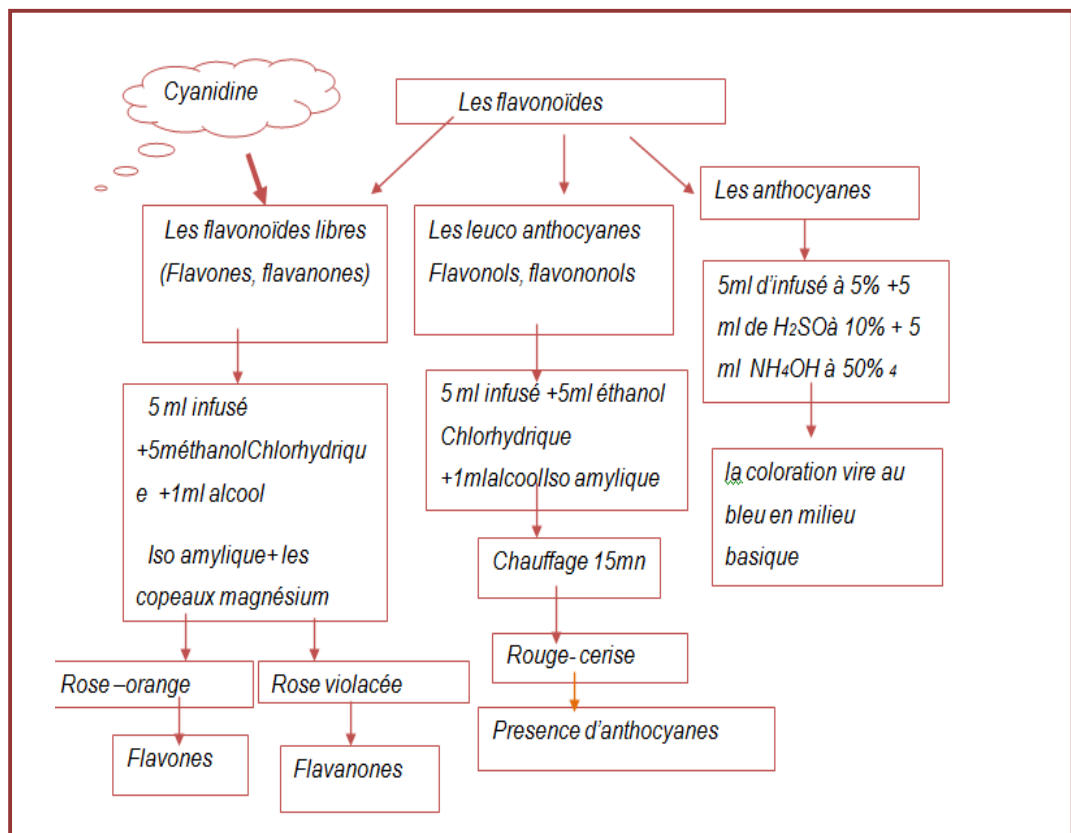


Figure 2.5: Protocole expérimental de caractérisation des flavonoïdes

2.6.4.1.3. Caractérisation des dérivés anthracéniques

On retrouve les dérivés anthracéniques dans les plantes, sous forme de génines ou aglycones libres ou sous forme combinées d'hétérosides anthracéniques, leur présence est mise en évidence à l'aide de la solution NH_4OH diluée à 50% [123].

➤ Préparation de l'extrait chloroformique

1g de poudre végétale est ajoutée à 10ml de CHCl_3 , suivie d'un chauffage pendant 3 minutes au bain Marie .La solution est filtrée à chaud. Le résidu de la poudre épuisée par le CHCl_3 servira à mettre en évidence les formes hétérosides (O-hétérosides et C-hétéroside).

2.6.4.1.4. Caractérisation des saponosides

➤ Préparation du décocté 1%

1g de poudre ajoutée 100ml d'eau puis mise en une ébullition légère pendant 15mn, la suspension est filtrée puis introduite dans 10 tubes à essai successivement de 1 à 10ml de filtrat tout en complétant le contenu de chaque tube à 10ml avec de l'eau. On agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. La hauteur de mousse est mesurée 15 minutes après l'agitation.

L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube (N) dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm.

$$= \quad /$$

2.6.4.1.5. Caractérisation des alcaloïdes

La présence d'alcaloïdes se caractérise par la précipitation de sels et par la révélation à l'aide du réactif de Mayer (solution de tétra-iodomercure de potassium) [123].

A 10g de poudre on ajoute 50ml H_2SO_4 à 10%. Après 24heures de macération à température ambiante, le macéré est filtré et lavé avec de l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Prélever 1ml de filtrat y ajouter 5 gouttes de

réactif de Mayer et attendre 15 minutes. La présence d'alcaloïdes est mise en évidence par l'apparition d'un précipité blanc –jaune ou jaune- clair (figure 2.6).

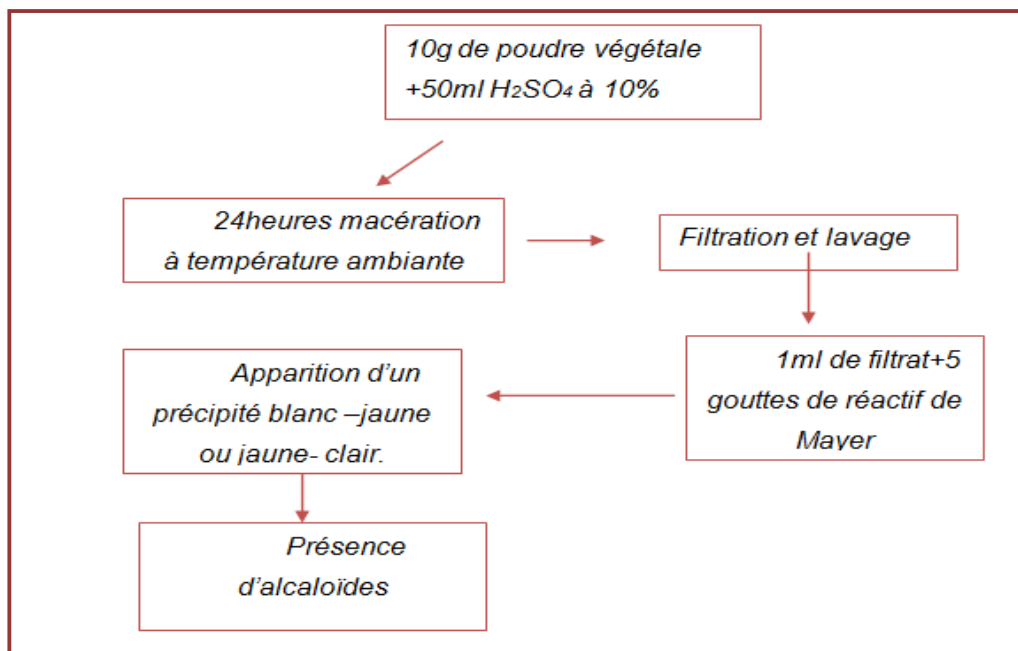


Figure 2.6: Protocole expérimental de caractérisation des alcaloïdes.

2.6.4.2. Etude des composés non volatiles

La fraction non volatile (composés polaires et apolaires) a été extraite à l'aide du soxhlet.

a. Principe

L'extracteur soxhlet permet le traitement des solides (matériel végétal). Il est principalement utilisé dans la préparation des échantillons avant les analyses. Ce traitement se fait avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés [123].

b. Description du soxhlet

Le soxhlet est constitué d'un ballon monocol rodé, d'un réfrigérant et d'un extracteur, dont le corps contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal, cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant surmonté d'un réfrigérant. Après chauffage du ballon, les vapeurs du solvant passent dans le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de

l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide (matériel végétal) dans le solvant. Ce dernier se condense et s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon provoquant alors le retour du liquide riche en substances extraites dans le ballon. Le cycle peut se répéter indéfiniment jusqu'à épuisement complet du solide d'où l'efficacité et l'importance de cette technique (figure 2.7).

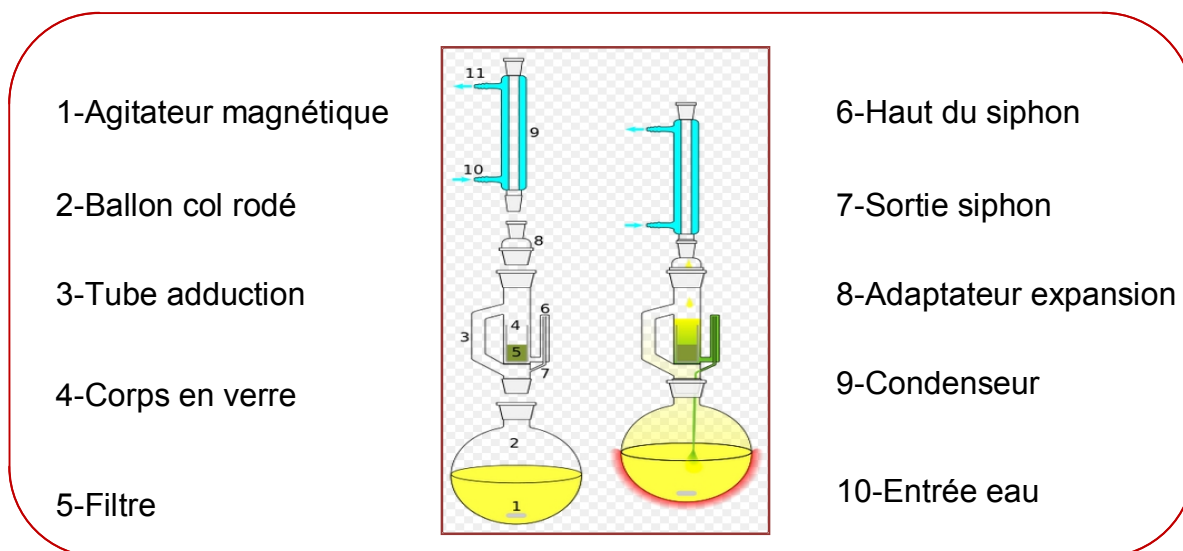


Figure 2.7: Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet [126].

c. Technique

20 g de poudre de feuilles séchées sont introduites dans une cartouche en papier filtre qui sera ensuite placée dans le soxhlet. 250 ml d'éther de pétrole sont incorporés à l'intérieure du ballon à col rodé. Le tout est placé sur une plaque chauffante et porté à ébullition.

Après une série de douze siphonages, le ballon contenant le solvant enrichi en substances solubles (fraction lipidique ou apolaire) ainsi que la matière végétale contenue dans la cartouche (le marc) sont récupérés. Le marc est mis à sécher à l'air libre, une fois séché il est introduit dans une nouvelle cartouche qui sera soumise à une nouvelle extraction au soxhlet en utilisant le méthanol comme solvant organique afin d'obtenir les substances polaire après douze siphonages, [127].

Les fractions polaire et apolaire des deux extractions sont passées dans un évaporateur rotatif afin d'obtenir deux extraits : l'extrait méthanolique et l'extrait éthéré secs.

Les deux ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des deux fractions de la plante (figure 2.8).

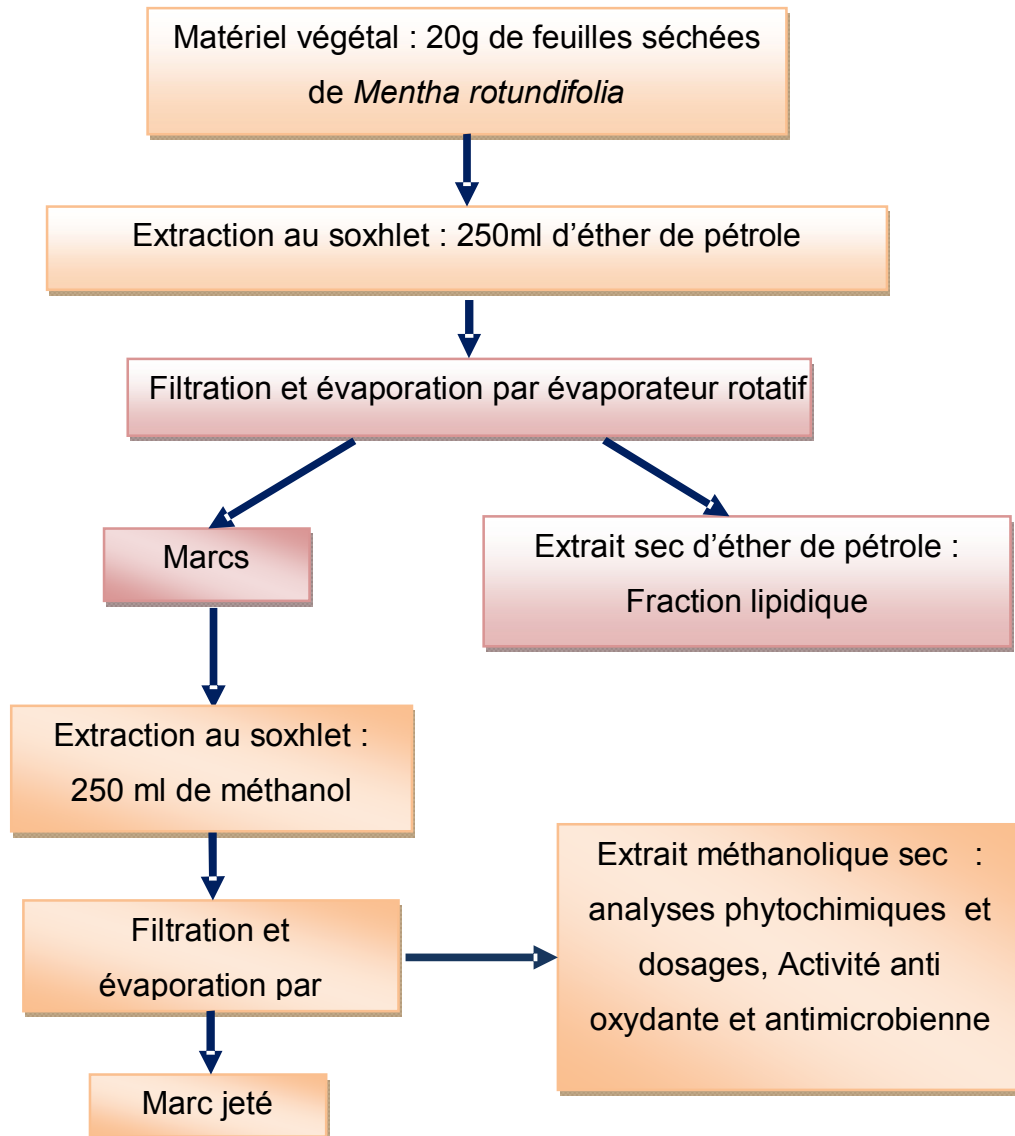


Figure 2.8: Protocol expérimental de l'extraction des fractions polaires et apolaires par soxhlet

2.6.4.3. Etude et dosage de deux principes actifs de *Mentha rotundifolia.L*

2.6.4.3.1. Les composés phénoliques

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols, l'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu (FC) décrite par BOIZOT et CHARPENTIER [128] est la plus utilisée.

Pour notre étude, nous avons utilisé la méthode de SEMIH OTLES et *al.*, [129].

a. Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué d'un mélange à base d'acide Phosphotungstique et d'acide Phosphomolybdique, ces derniers sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale de 750 nm.

L'absorbance par référence, à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique) permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait, elle est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche.

b. Mode opératoire

✓ Test de Folin Ciocalteu [128] [129]

Dans des tubes à essai adéquats on a introduit 50µl d'extrait méthanolique, mélangé avec 250µl du réactif Folin et 750µl de Na₂ CO₃ à 7.5%. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité à une température ambiante pendant 120 minutes, l'absorbance est mesurée à 760nm avec un spectrophotomètre UV contre un blanc sans extrait (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** et

figure 2.9).

c. Calcul et quantification

La quantification des polyphénols totaux à été faite selon une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), réalisée par un extrait d'étalon d'acide

gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalence d'acide gallique par gramme de matière sèche (EAG/g de matière sèche).

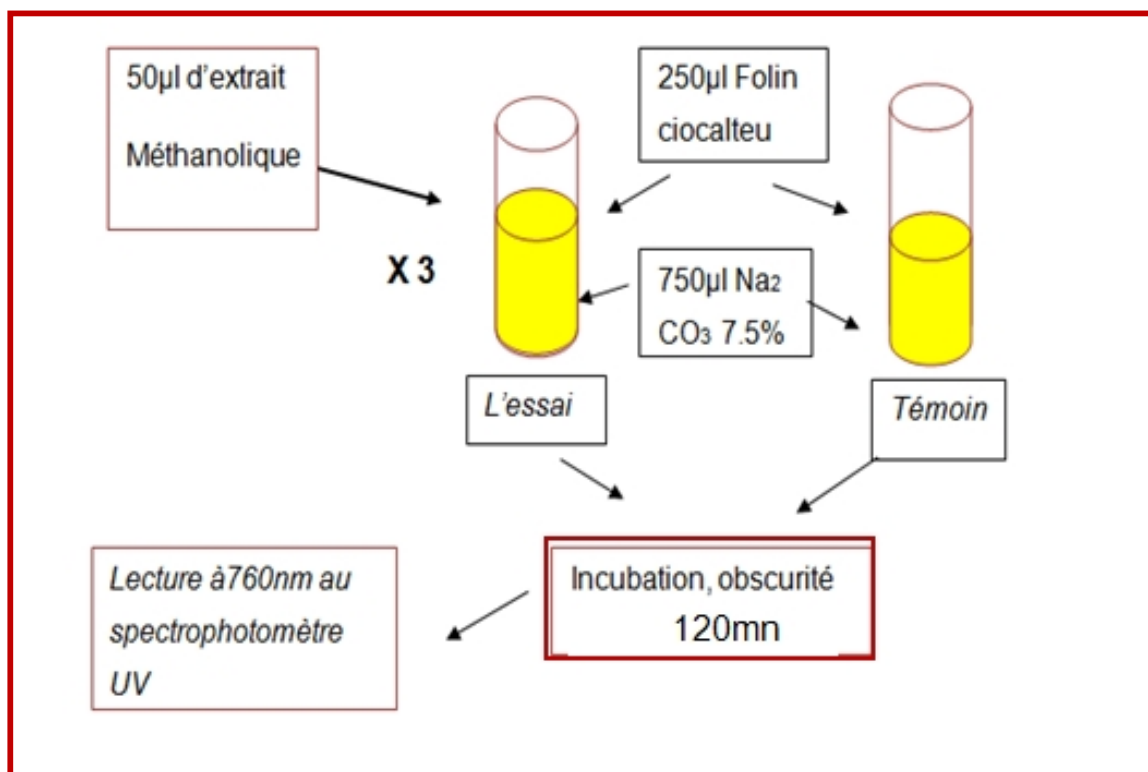


Figure 2.9: Protocole expérimentale schématique du dosage des phénols totaux (le test du Folin Ciocalteu) [129].

2.6.4.3.2. Les flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux a été effectuée selon la méthode décrite par MAHMOUDI et *al.*, [130].

➤ Technique

- ✓ 500 µl d'extrait méthanolique sont ajoutées à 1500 µl de méthanol à 95%.
- ✓ 100 µl AlCl₃ à 10%.
- ✓ 100 µl d'acétate de sodium.
- ✓ 2.8 ml d'eau distillée.

- ✓ Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ Le blanc est réalisé par substitution de l'extrait méthanolique par du méthanol à 95% (tableau 2.2).
- ✓ L'absorbance est mesurée à 415 nm en utilisant un spectrophotomètre UV.
- ✓ Les résultats sont exprimés en mg équivalent Quercétine/g de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalon de la Quercétine.

Tableau 2.2: Volumes de l'extrait et ses additifs.

	Extrait M-OH	Méthanol 95%	AlCl ₃ 10%	Acétate sodium	H ₂ O distillée
Essai	500 µl	1500 µl	100 µl	100 µl	2.8 ml
Témoin	0	1500 µl	100 µl	100 µl	2.8 ml

2.6.4.4. Etude des composés volatils

2.6.4.4.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

a. Principe

L'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. a été extraite par hydrodistillation, c'est la méthode d'extraction simple, normée pour l'extraction d'une huile essentielle [131] et pour le contrôle de qualité [132].

Elle consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau mis à ébullition. Les composés volatils contenus dans les cellules diffusent à travers les parois cellulaires, une fois à l'extérieure de ces dernières, l'huile va constituer avec l'eau un complexe liquide-vapeurs, ces vapeurs hétérogènes vont se condenser dans le réfrigérant, les huiles essentielles se séparent de l'hydrolat par simple différence de densité. Cette dernière étant plus légère que l'eau (sauf quelques exceptions), elle surnage au dessus de l'hydrolat.

b. Les conditions opératoires

L'étude est réalisée sur un montage de type Clevenger muni d'un système de cohobation (figure 2.10).

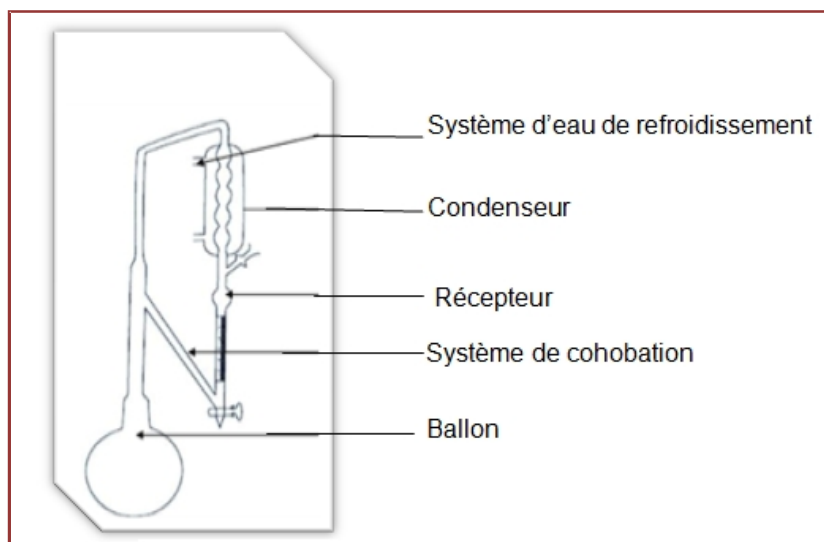


Figure 2.10: Appareillage de type Clevenger [133].

Ce montage se compose de quatre parties principales :

- ✓ Le réacteur, le ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
- ✓ La colonne, un cylindre en verre au-dessus du récepteur qui recueille la phase vapeur.
- ✓ Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs.
- ✓ Le vase florentin où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (Eau florale)

c. Protocole et mode opératoire

On a introduit 100 g de feuilles séchées de *Mentha rotundifolia* L. dans un ballon ayant une capacité d'un litre et contenant de l'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures [133] (figure 2.11).



Figure 2.11: Appareillage de type Clevenger (original).

Le système de cohobation permet de maintenir constant le volume de l'eau présent initialement. Durant tout le processus de distillation les vapeurs chargées d'huiles essentielles se condensent à leur arrivée au niveau du réfrigérant, elles retombent sous forme de gouttelettes dans l'essencier et forment avec l'eau un mélange hétérogène qu'on récupère dans une ampoule à décanter.

Pour la séparation des huiles essentielles de l'eau, on ajoute de l'éther diéthylique. Les huiles obtenues, vont être pesées et conserver dans des flacons opaques et hermétiques à une température de 4°C, trois essais sont réalisés dans l'étude du rendement.

d. Le calcul du rendement

Le rendement d'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'HE extraite et le poids des feuilles séchées traitées au préalable [134]. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{\text{poids de l'HE extraite}}{\text{poids des feuilles séchées}} \times 100 \quad [134]$$

Considérons :

R	⇒	Rendement de l'HE en %
P_H	⇒	Poids de l'HE en g
P_A	⇒	Poids de la plante traitée en g

2.6.4.4.2. Contrôle organoleptique

Les propriétés organoleptiques des huiles essentielles regroupent tout ce qui est perceptible par les sens. On a évalué les différentes caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de notre échantillon végétal ou nous avons notés la couleur, l'aspect et l'odeur.

2.6.4.4.3. Etude qualitative et quantitative des huiles essentielles

2.6.4.4.3.1. Analyse par CG-MS

La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CGMS) au niveau du laboratoire d'analyse organique fonctionnelle (LAOF) de la faculté de chimie de l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene (USTHB) sous des conditions opératoires bien précises et bien déterminées.

a. Principe

- Le but de cette analyse est la détermination de la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles. Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse soumis l'échantillon à plusieurs tests, à savoir : [135] [136]
- Ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température.
- Accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation

- Détection du signal à la sortie de l'appareil ce qui conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leur rapport de masse et charge m/z
- Identification par une comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « banques de données » de références. Les systèmes modernes sont généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés [124].

b. Conditions opératoire

Le protocole utilisé dans cette étape est celui adopté au laboratoire d'analyse organique et fonctionnelle de l'USTHB, l'huile récupérée est analysée par CGMS. Pour calculer les indices de retentions des différents constituants, un mélange d'alcane à été injecté dans les mêmes conditions (tableau 2.3).

Tableau 2.3: Conditions d'analyses de la CG/MS adaptée par le laboratoire d'analyse organique et fonctionnelle de l'USTHB

CG/MS	
<u>Chromatographie gazeuse</u>	<u>Spectrométrie de masse</u>
-Appareil : Hewlett-Packard 6890	Appareil : Agilent MSD 5973
Colonne : HP5 MS (30 mx0.32mm x 0.25 μ m)	Mode d'ionisation : impact électronique
Gaz vecteur : Hélium	Tension d'ionisation : 70 eV, basse résolution.
Débit : 0.25 ml/mn	Balayage automatique : m/z 25 à 350
Température de l'injecteur : 250°C	Température de la source : 280°C
Température du détecteur : 250°C	Interface : couplage direct
Quantité injectée : 0.2 μ l	Pression : 2.10^{-6} Torr
Température de colonne : 45°C/8mn jusqu'à 250°C /10 mn à raison de 2°C/mn	

2.7. Les activités biologiques

2.7.1. L'activité anti radicalaire (antioxydante) des extraits

Pour l'étude des activités anti radicalaires et antioxydante des échantillons extraits (la concrète polaire et extrait méthanolique) de *Mentha rotundifolia* L. , nous avons utilisé in vitro la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr : 394,33). [137].

a. Principe

Le DPPH ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl est un radical libre stable. Sous forme libre, il est de couleur violette, mais une fois réduit par un donneur d'hydrogène, sa coloration devient jaune [138] [139] (Figure 2.12).

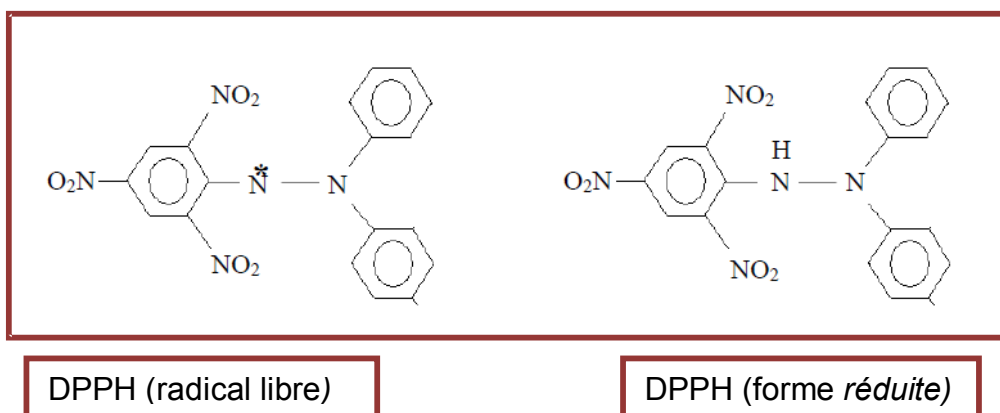


Figure 2.12: forme libre et réduite du DPPH [140]

b. Mode opératoire

✓ Préparation de la solution du DPPH

2mg de DPPH sont pesés à l'aide d'une balance de précision et dissout dans 50ml de Méthanol absolu, la préparation est conservée à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

✓ Préparation d'extraits

Pour tous les extraits que ce soit la concrète polaire ou l'huile essentielle, on prépare des solutions mères dans du méthanol absolu, ces dernières vont subir des dilutions qui représentent des concentrations de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$ (tableau 2.4).

Tableau 2.4: Les différentes concentrations des extraits (concrète polaire et l'huile essentielle)

Extraits à tester	Huiles essentielles de feuilles de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	Extraits méthanolique
Les concentrations en $\mu\text{g/ml}$	300	50
	400	100
	500	200
	700	400
	1000	500

c. L'essai DPPH

Dans des tubes secs stériles, on a introduit à partir des solutions mères (HE et extrait méthanolique) respectivement (300 μl , 400 μl , 500 μl , 700 μl , 1000 μl) et (50 μl , 100 μl , 200 μl , 400 μl , 500 μl).

- On ajuste avec 1ml de méthanol absolu.
- 2ml de solution DPPH sont ajoutées dans chaque tube.
- On laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Pour chaque concentration, le test est réalisé trois fois de suite.
- Pour chaque série on prépare un blanc constitué de méthanol et la solution DPPH.
- Des solutions standards (Quercétine et Rutine) sont préparées en suivant les mêmes étapes et les mêmes conditions expérimentales.
- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à la longueur d'onde de 515nm par spectrophotomètre (tableau 2.5).

Tableau 2.5: Les concentrations des extraits (a et b) et leurs additifs en méthanol et solution DPPH

Les huiles essentielles (a)					
Les concentrations ug/ml	300	400	500	700	1000
Volume du méthanol (µl)	700	600	500	300	0
Volume de la solution DPPH ml	2	2	2	2	2

Extrait méthanolique (b)					
Les concentrations (ug/ml)	50	100	200	400	500
Volume du méthanol (µl)	950	900	800	600	500
Volume de la solution DPPH (ml)	2	2	2	2	2

d. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en activités antioxydante qui définit la capacité de piéger le radical libre, elle est estimée par le pourcentage(%) de décoloration du DPPH, elle se calcule selon la formule suivante [141]:

$$\% = \frac{(\text{ }) - (\text{ })}{(\text{ })} \times 100$$

- ✓ Les résultats ont été exprimés par la moyenne des trois mesures ± écart type.
- ✓ La détermination de la EC50 appelée aussi la IC50, est déterminée pour chaque extrait (HE et extrait méthanolique), Elle est définie comme étant la concentration de substrat qui cause la perte de l'activité du DPPH de 50%.

- ✓ Les résultats de la EC_{50} moyenne ont été calculée par les courbes de régressions linéaires = + , ou' = 50%.
- ✓ Le calcul du pouvoir radicalaire : APR, il est inversement proportionnell'IC50.

$$= 1/ 50$$

2.7.2. Activité antimicrobienne

Dans cette partie nous avons abordé, l'étude de l'effet antibactérien et antifongique de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle des feuilles de *Mentha rotundifolia* L.

2.7.2.1. Les souches bactériennes

Les souches microbiennes référenciées ATCC (American type culture collection), proviennent du laboratoire de bactériologie de l'institut pasteur (tableau 2.1).

2.7.2.2. Les Milieux de culture

Les milieux utilisés sont :

- le milieu Sabouraud pour les champignons
- le milieu Mueller- Hinton pour les bactéries
- Gélose nutritive pour revivification des souches

2.7.2.3. Les extraits (HE et extrait Méthanolique).

- L'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. a été extraite des parties aériennes (feuilles) de la plante par hydrodistillation (Clevenger).
- Extrait méthanolique issue d'une extraction par soxhlet.

2.7.2.4. Les antibiotiques

Pour réaliser le témoin positif on a utilisé des disques d'antibiotiques (

tableau 2.6).

Tableau 2.6: les disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques (6mm de diamètres)	Les concentrations mcg (μ g) 1mcg=1000mg
Chloramphénicol	30mcg (C30)
Acide Pipémidique	20mcg (PI20)
Acide Fucidique	10 mcg (FA 10)

2.7.2.5. Etapas préliminaires

a. Coulage des milieux de cultures

Après stérilisation et refroidissement des milieux Préalablement mis en surfusion à 45°C, on coule les géloses dans des boites de pétri aseptiquement sous hotte à flux laminaire stérile.

b. Revivification et préparation des suspensions bactériennes

Pour notre étude, on a utilisé des cultures jeunes de 18 à 24 heures fraîchement réactivées. Leur réactivation se fait comme suit :

- A partir des tubes de conservation, on prélève la souche à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Cette souche est mise en culture sur des milieux solides, puis mise en incubation dans une étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries, 25°C pendant 5jours pour la souche fongique.

c. Préparations des suspensions bactériennes

A partir des souches réactivées au préalable, on prépare des suspensions bactériennes pour chaque souche.

- On prélève à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies jeunes qu'on dépose dans des tubes contenant une eau physiologiques stérile, bien agité pour une meilleure homogénéisation.
- On doit s'assurer de la concentration de la suspension bactérienne, par dosage de cette dernière de sa densité optique qui doit être comprise entre 0.08 et 0.1 à une longueur d'onde de 625 nm.

d. Préparation des extraits

La solubilisation des huiles essentielles et L'extrait méthanolique a été faite dans le DMSO (60%), Ce solvant a été préalablement testé aux concentrations utilisées, il est sans effet sur ces bactéries et la souche fongique.

e. Les produits à tester

L'évaluation du pouvoir antimicrobien de *Mentha rotundifolia* L. s'est déroulée en deux étapes :

- Dans un premier temps, on a testé l'extrait méthanolique des feuilles de *Mentha rotundifolia* L.
- Dans un second temps, on a testé le produit d'extraction : l'huile essentielle.

2.7.2.6. Mise en évidence de la zone d'inhibition.

a. Description du principe

Nous avons utilisé la technique de diffusion sur gélose [142]. Cette technique consiste à déposer un disque en papier Wattman de 9mm de diamètre imbibé de la substance à tester (HE et extrait M OH) sur une boîte de géloseensemencée de culture à étudier. Cette substance diffuse sur la surface à partir du disque et un gradient décroissant s'établit autour de ce dernier.

b. Technique

1ml d'inoculum sont déposés sur chaque boîte de pétri, après une imprégnation de 5mn l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte, quatre disques de papier wathman de 9mm de diamètre sont déposés.

- Un disque imbibé avec 10 μ l de la solution mère (HE 1mg/1ml) + DMSO à 60%)
- Un disque imbibé avec 10 μ l de la solution mère (Extrait M OH 1mg/ml+ DMSO à 60%).
- Un témoin négatif (DMSO + eau distillée).
- Un témoin positif (disques d'antibiotiques).

Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37° C pendant 18 à 24 heures. Nous procédons de la même façon pour les souches fongiques ces dernières sont mises en culture dans un milieu Sabouraud et incubées à 25° C pendant 5 jours. Chaque test est réalisé 3 fois.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

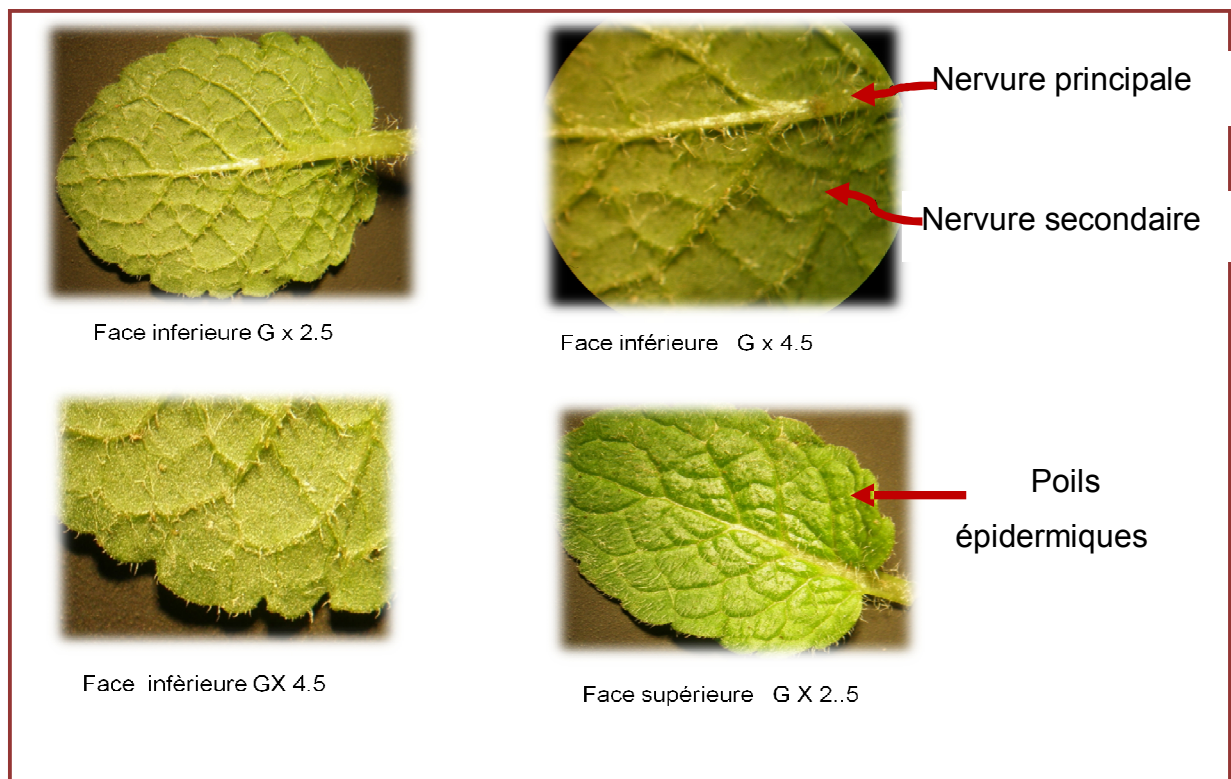
3. Résultats de l'étude botanique de la plante

Après comparaison des caractéristiques morphologiques macroscopiques de notre plante récoltée au niveau d'El Hamdania (station de Chrea), avec ceux de la plante répertoriés dans l'herbier de l'INA, nous avons identifié l'appartenance botanique de notre plante choisie, confirmant son genre et son espèce : *Mentha rotundifolia* L.

3.1. Etude macroscopique

a. La feuille

Elle est d'une couleur vert vif, , ovale presque ronde de 4.5 cm de long et 3 cm d'épaisseur (figure 3.1).



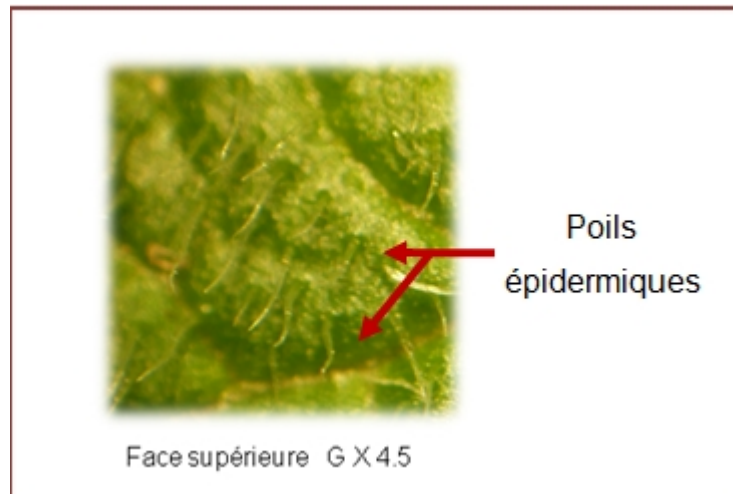


Figure 3.1: Vue d'une feuille (face supérieure et inférieure) à la loupe binoculaire (Originale).

b. Les fleurs

Elles sont de couleur blanche à mauves claire de 5 mm de long et se rassemblent en grappes ou en épis terminant le rameau (figure 3. 2).

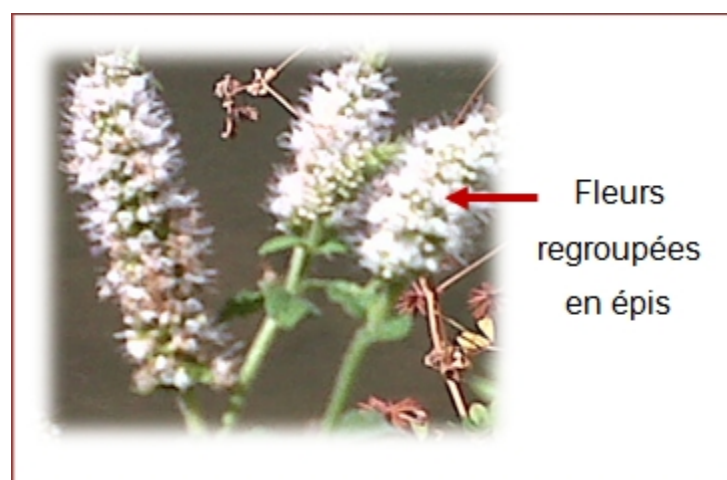


Figure 3. 2: Fleurs en épis de *Mentha rotundifolia* L (Originale).

c. La tige

Elle est typique des labiées, dressée dont les plus âgées sont légèrement lignifiées, couvertes d'un duvet épais (figure 3.3).

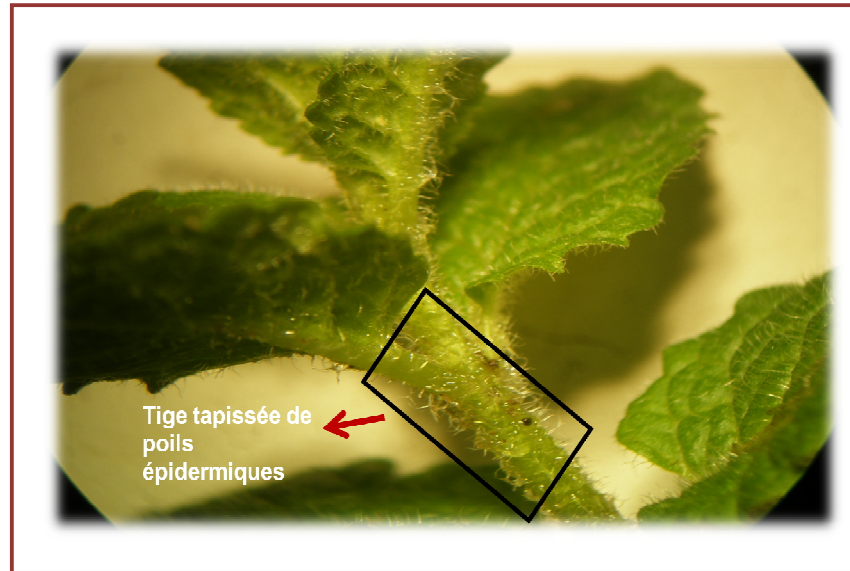


Figure 3.3: Vue d'une portion de la tige à la loupe G x 2.5 (Originale).

d. La racine

C'est un long rhizome rampant, traçant et chevelu (figure 3.4).

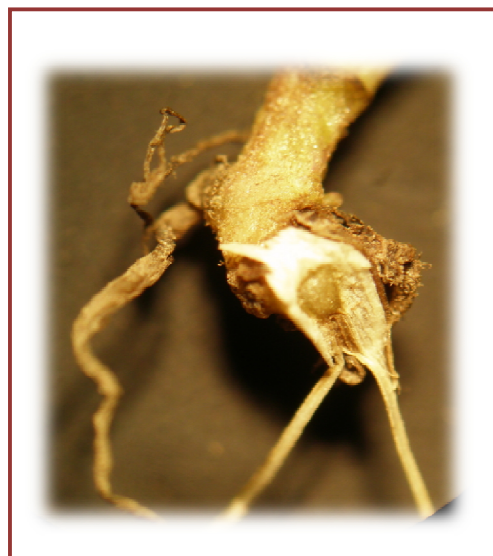


Figure 3.4: Vue d'ensemble d'une racine à la loupe au G X 4.5 (Originale).

3.2. Etude microscopique

Afin de localiser les structures sécrétrices, nous avons réalisé des coupes transversales colorées au niveau de la feuille et la tige.

a. Structure de la feuille

La coupe transversale, montre que la feuille se compose de structures suivantes :

- La cuticule qui enveloppe vers l'extérieure les cellules épidermiques.
- L'épiderme inférieure et épiderme supérieure constitué par une assise de cellules dont certaines s'allongent pour donner des poils épidermiques. On peut observer des poils épidermiques tecteurs et des glandes sécrétrices.
- Un parenchyme palissadique et Parenchyme lacuneux.
- Une nervure principale qui renferme les éléments conducteurs (figure 3.5 Figure 3.6 Figure 3.7).

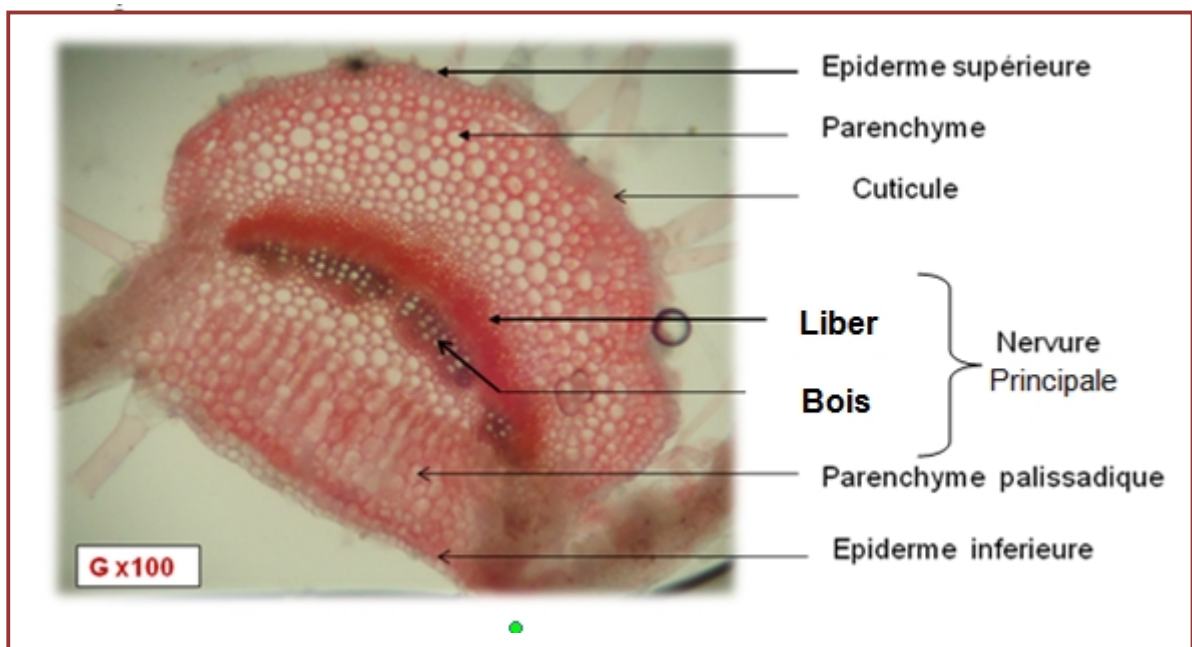


Figure 3.5: Coupe transversale au niveau de la feuille de *Mentha rotundifolia*. L vue au microscope photonique (Gx100) après double coloration.

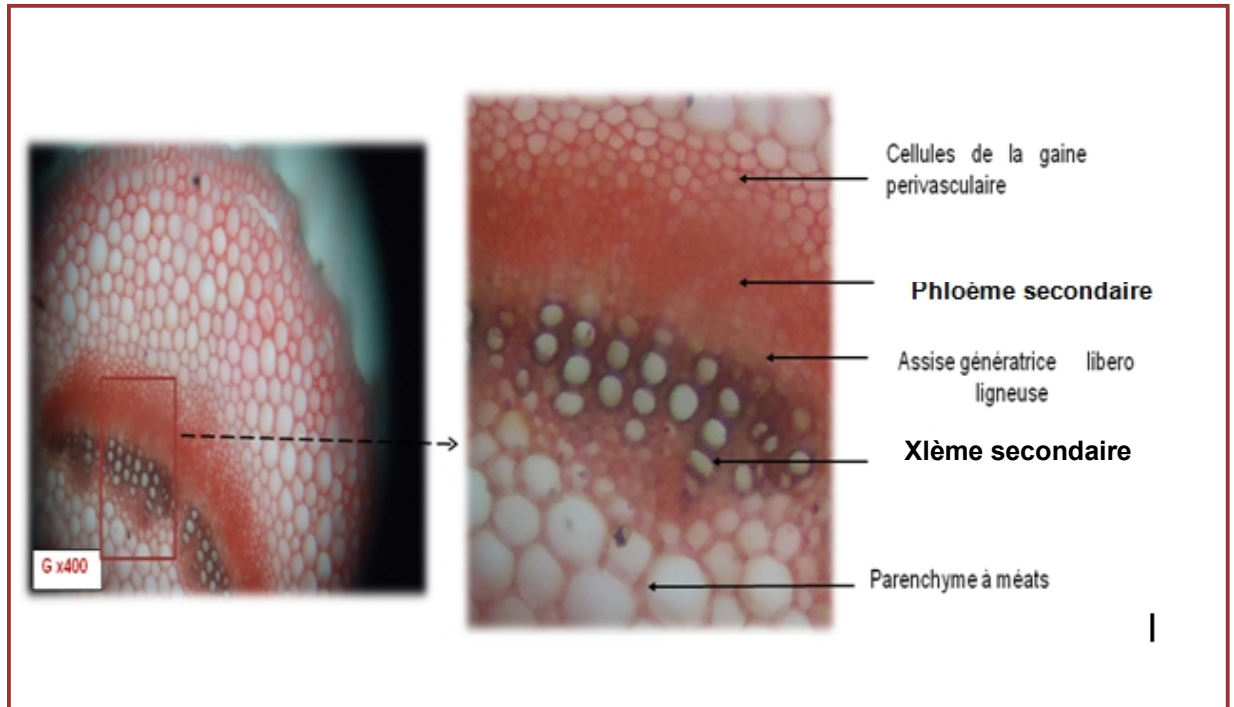


Figure 3.6: Coupe transversale de la feuille de *Mentha rotundifolia*. L vue au microscope photonique, (Gx400) après double coloration

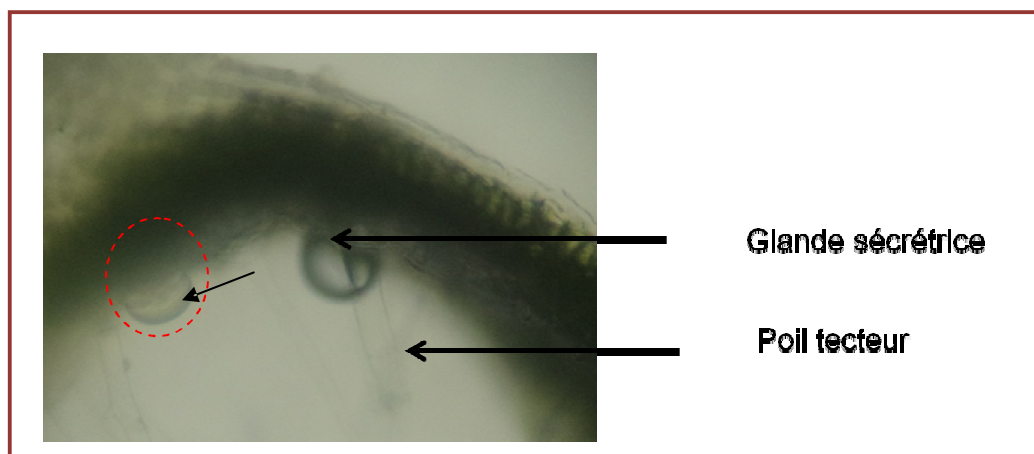


Figure 3.7: Poils épidermiques tecteurs et glandes sécrétrices de la feuille de *Mentha rotundifolia*. L vus au MP, G x 400.après double coloration.

b. Structure de la tige

Les coupes transversales réalisées dans la tige de *Mentha rotundifolia* L. ont montré différents tissus. De l'extérieur vers l'intérieur on observe:

- Une cuticule légèrement striée et vers l'extérieur les cellules épidermiques.
- Un épiderme constitué d'une seule assise de cellules.

- Le collenchyme tangentiel, un tissu de soutien vivant présent dans les angles. Les membranes des cellules présentent des épaisissements de nature cellulosiques.

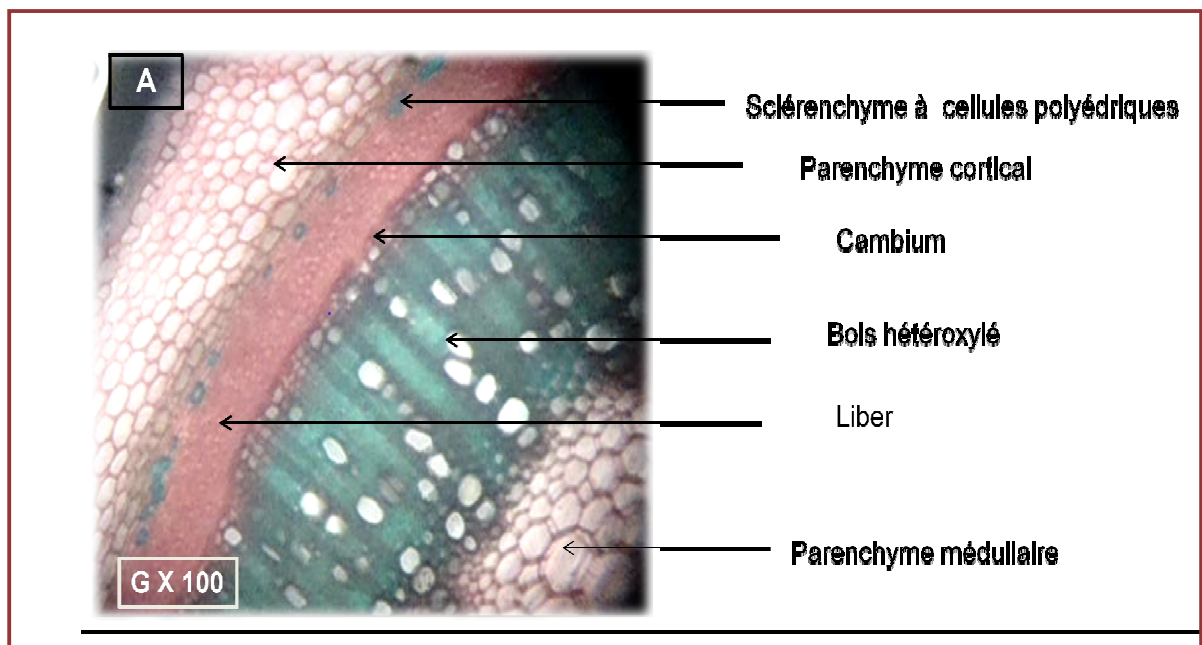
Le liber et le bois (métaxylème et protoxylème), parenchyme cortical, les cellules présentent des méats entre elles (figure 3.8 Figure 3.9 Figure 3.10 Figure 3.11

Figure 3.12).

- C'est une tige de dicotylédone, le développement essentiellement fasciculaire du xylème secondaire (pachyte discontinu) et absence de liège et modeste lignification sont autant d'arguments qui justifient les caractères herbacés de cette tige (Figure 3.8 C).

- Les faisceaux cribrovasculaire disposés sur un seul cercle.
- Présence d'un parenchyme médullaire très important ce qui confirme le caractère aérien de la tige.

-



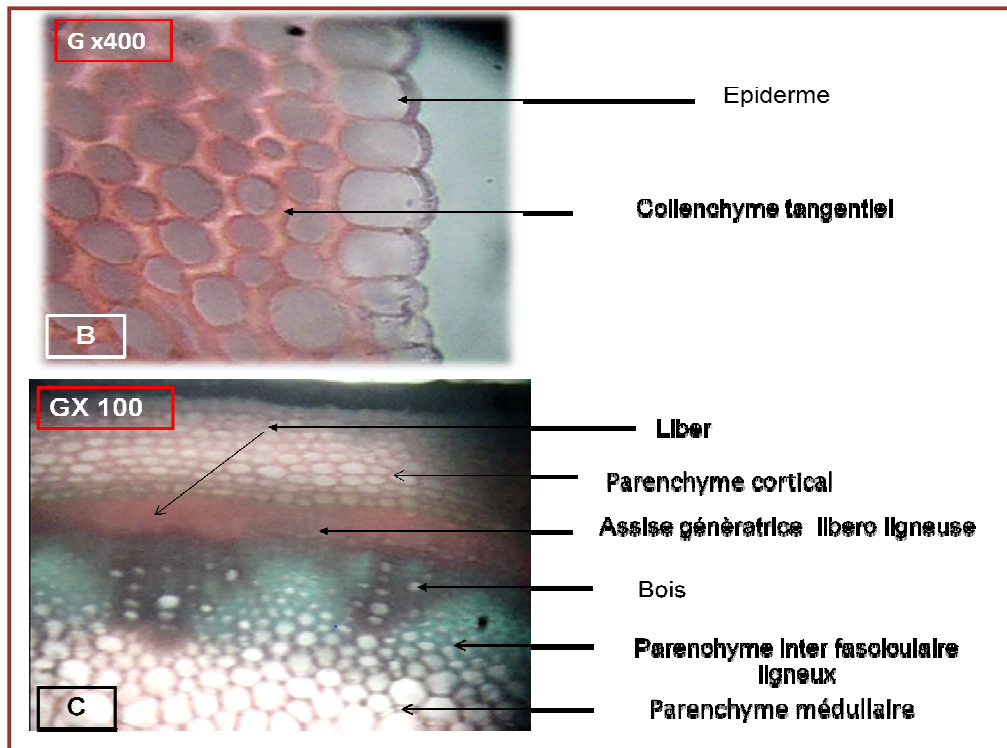


Figure 3.8: Vue d'ensemble d'une coupe transversale d'une tige de *Mentha rotundifolia*. L en structure secondaire vue au MP, Gx100(A). Les cellules épidermiques (B : Gx400) et le pachyte discontinu (C, Gx100).

Au même titre que la feuille, la tige (figure 3.9 Figure 3.10) montre des poils épidermiques tecteurs et des glandes sécrétrices.

Cette étude nous a permis de localiser les poils tecteurs jouant un rôle dans l'évapotranspiration (figure 3.10) et les sites sécrétrices de *Mentha rotundifolia* L. représentés par des glandes sécrétrices (figure 3.11)

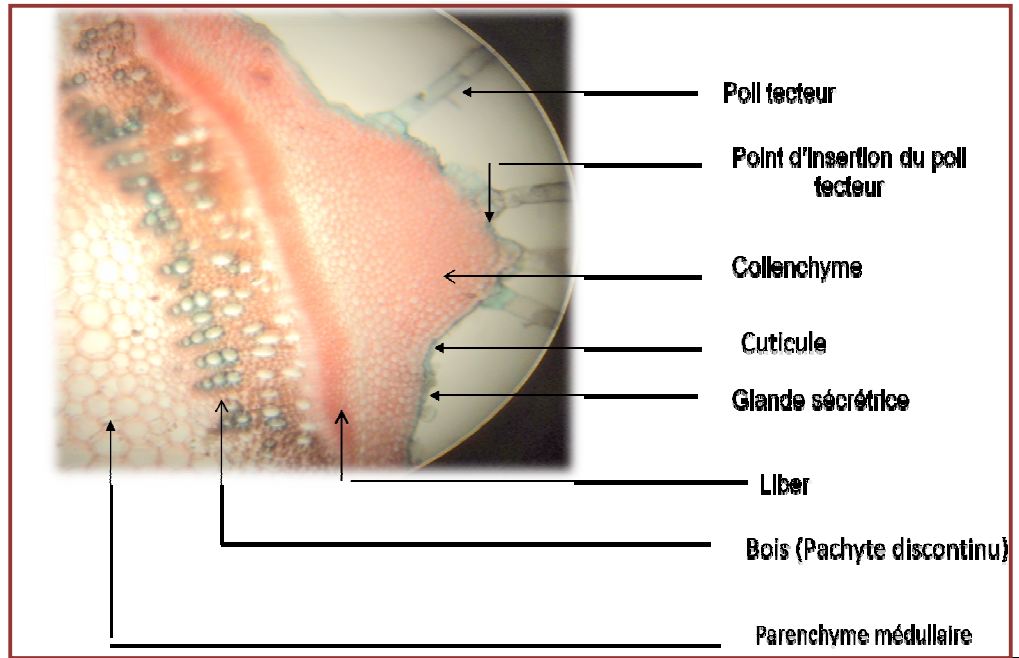


Figure 3.9: Coupe transversale au niveau de la zone angulaire de la tige de *Mentha rotundifolia*. L vue au MP, G x400 apres double coloration (Original).

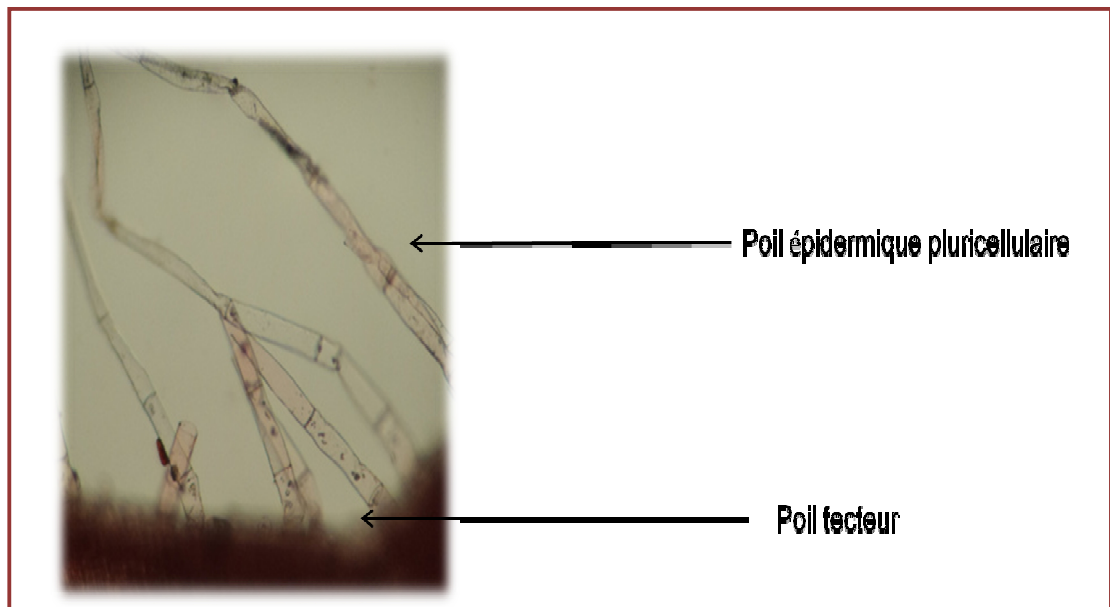


Figure 3.10: Poils épidermiques de la tige de *Mentha rotundifolia*. L vus au MP,G x400 apres double coloration (Original).

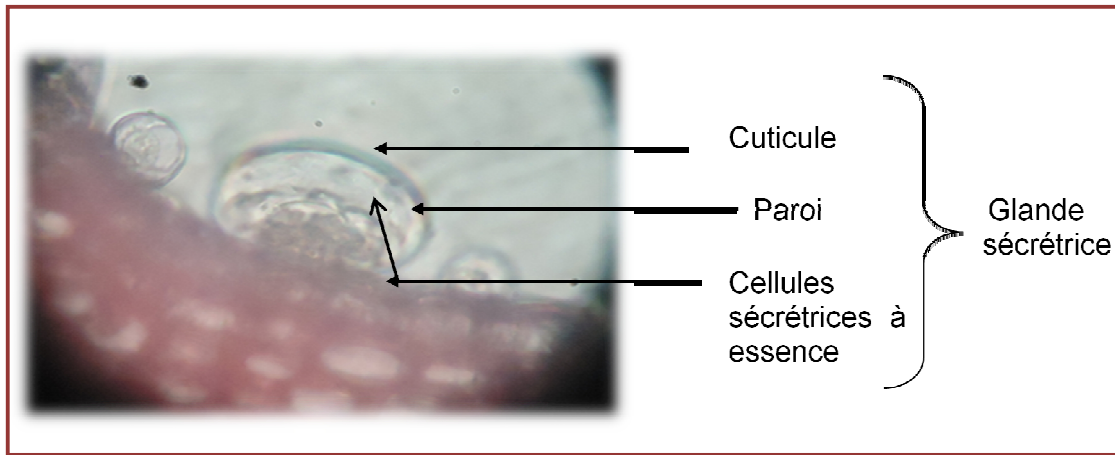


Figure 3.11: Glande sécrétrice au niveau d'une coupe transversale de tige Gx400 (Original)

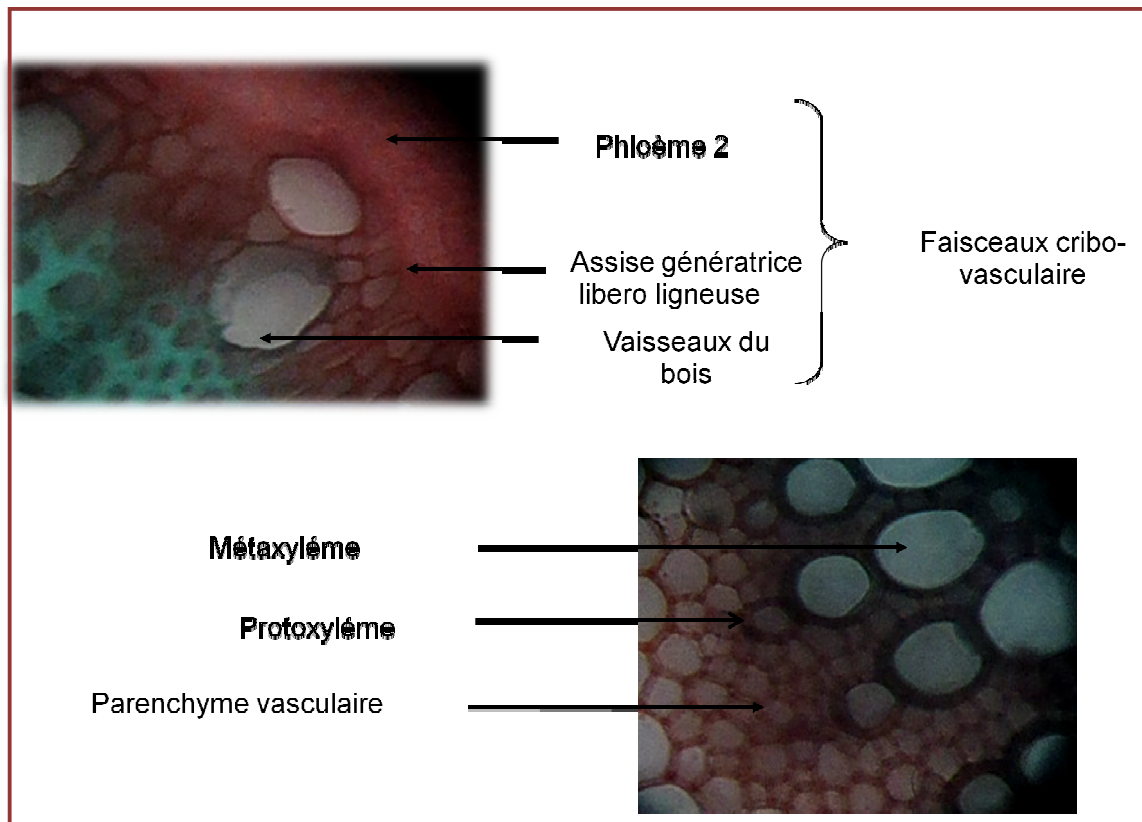


Figure 3.12: Détail des faisceaux cribro-vasculaire dans une coupe transversale de tige de *Mentha rotundifolia* L. vus au MP, G x400 (Original).

3.3. Résultats de l'étude phytochimique

3.3.1. Détermination de la teneur en eau de la plante fraîche

Les végétaux sont riches en eau, cette importance est étroitement liée avec certains métabolismes de la plante. Les analyses de notre échantillon de feuilles de *Mentha rotundifolia* L. révèlent un taux d'humidité de **64.45 ± 0.3159** (tableau 3.1). Ces résultats sont conformes à ceux signalés par la pharmacopée européenne (figure 3.13).

Tableau 3.1 : Teneur en eau et matière sèche chez *Mentha rotundifolia* L.

Poids frais en (g)	Poids sec (PS) en (g)	Teneur en eau (T) en (%)	Matière sèche (MS) en (%)
1.0003 ± 0.1	0.316	64.45±0.3159	35.551

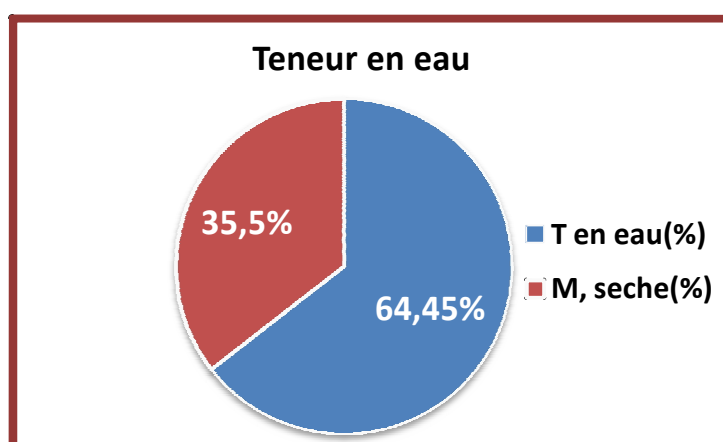


Figure 3.13: Taux d'humidité de *Mentha rotundifolia*. L

3.3.1.1. Cinétique de la masse et le taux d'humidité

La figure 3.14 montre que la masse et le taux d'humidité du matériel végétal diminuent en fonction du temps traçant une branche hyperbolique, avec deux zones distinctes :

La première zone(1) montre une diminution rapide de la teneur en eau du matériel végétal jusqu'au point critique (E) correspondant à l'évaporation de l'eau de la couche superficielle.

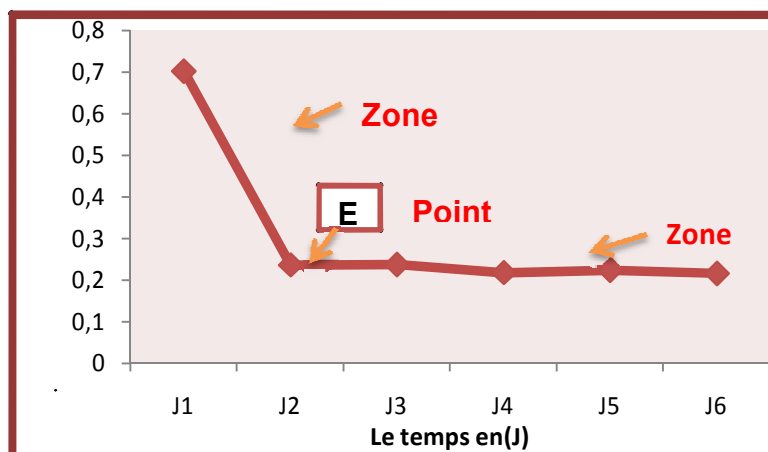


Figure 3.14: Evolution de la masse en (g) en fonction du temps en jours (J)

3.3.1.2. Taux d'humidité de la poudre sèche

L' analyse de l' échantillon de poudre sèche des feuilles de *Mentha rotundifolia* L. montre un taux d'humidité de **9.51% ± 0.09**. Ce taux est inférieur à 10% ce qui est conforme aux normes de la pharmacopée européenne.

3.3.2. Détermination de la teneur des cendres

La teneur des cendres de *Mentha rotundifolia* L. est de **12.61 % ± 0.60**. Elles sont de couleur claire à blanchâtres (tableau 3.2 et figure 3.15). Nos résultats sont conformes à ceux signalés par la pharmacopée européenne.

Tableau 3.2: Teneur des cendres

Prise d'essai (g) Plante fraîche	Poids des cendres Totale en (g)	Teneur des cendres en % de poids sec	Matière organique
2.00043±0.0004	0,252±0.012	<u>12.61 %± 0.60</u>	87.38 %

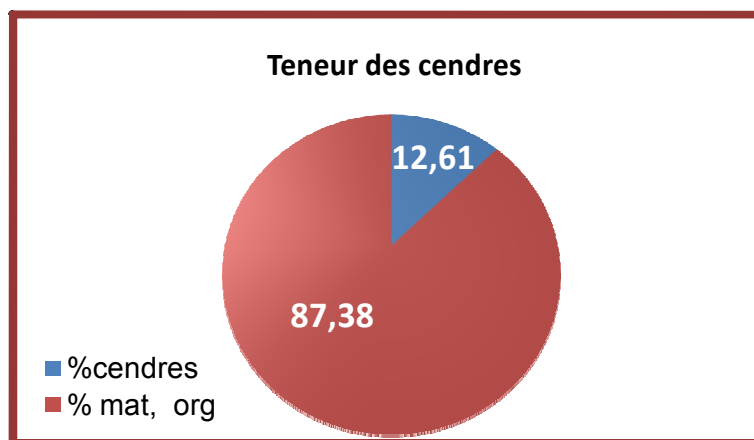


Figure 3.15: Pourcentages en cendres et matière organique.

3.3.3. Screening phytochimique

Dans le but de rechercher dans les extraits de feuilles de *Mentha rotundifolia* L. les différentes classes de substances secondaires à savoir les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les anthocyanes, nous avons effectué un screening phytochimique [123]. Les résultats (tableau 3.3) sont classés en fonction des différents critères d'observation :

Réaction positive (+)

Réaction négative (-)

Les résultats mettent en évidence la présence de composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes (Annexe C).

- Les flavonoïdes sont présents sous leur forme libre (flavones) , absence de Leuco anthocyanes (flavonols et flavanones). Absence de dérivés anthracéniques libres, ils sont présents sous leurs formes combinés (Les O-hétérosides : anthranols, anthranones, anthranonones) et (C-hétérosides).

On reconnaît principalement le rôle veino-actif des flavonoïdes traduit par une diminution de la perméabilité des capillaires sanguins et un renforcement de leur résistance [27]. En effet on leur attribue également un grand rôle dans les activités antioxydante et anti-inflammatoire [26], agissent aussi positivement sur le traitement des maladies cardiovasculaires [47].

Dans certains cas les Flavonoïdes sont connus pour leur effet antiviral et anti tumoral [27].

Tableau 3.3: Résultats du screening phytochimique

Les tanins	Tanins catéchiques	—
	Tanins galliques (Réaction de stiasny)	+
Les flavonoïdes	Les flavones	+
	Les flavonols et les flavanones	—
	Les catéchines, chalcones, dihydrochalcones et isovlavones	—
	Les leucoanthocyanes	—
	Les dérivés anthracéniques libres	—
Les dèrivés anthracéniques Combinés	Les O- hétérosides	+
	Les O-hétérosides à génines réduites, (anthranoles, anthranonones ou anthranones)	+
	Les c- hétérosides	+
	Les saponosides	+
	Les alcaloïdes	+
	Hétérosides cardiotoniques	+

- En ce qui concerne les tanins, ils sont présents sous leur forme gallique, les tanins catéchiques sont absents.

Les feuilles riches en tanins galliques sont conçues pour le traitement des maladies respiratoires et la toux. Leurs propriétés antiseptiques et antibactériennes et antifongiques sont clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et dermatites [123]. En tenant compte de ces résultats, les feuilles de *Mentha rotundifolia L.* peuvent être prescrites comme anti diarrhéique ou régulateurs des fonctions gastro-intestinale.

- Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux, ils sont caractérisés par leur propriétés tensioactifs ces

dernière sont moyennement marquées dans les feuilles de *Mentha rotundifolia* L. son indice de mousse est de :

$$I_m = 111.1 > 100$$

Plusieurs plantes connues et utilisées pour leur effet anti-inflammatoire et anti-œdémateux, doivent ces propriétés aux saponines, tel est le cas pour la racine de la réglisse, la graine de Marronnier d'Inde et le Buplenrum (Apiaceae) utilisée en médecine traditionnelle chinoise [143].

La présence d'alcaloïdes peut aussi prévoir une éventuelle utilisation de la plante dans certaines maladies [144].

Les résultats obtenus corroborent avec ceux de ZEKRI et al. (2013) [145].

En effet les résultats de notre étude confirment probablement les vertus thérapeutiques de *Mentha rotundifolia* L. et sa large utilisation dans la médecine traditionnelle.

3.3.4. Dosage de certains principes actifs de *Mentha rotundifolia* L.

3.3.4.1. Composés non volatiles polaires et non polaires

Le rendement est de **$5.2\% \pm 0.01$** pour les substances non volatiles miscibles dans les solvants apolaires est **15.78 ± 0.01** pour les substances volatiles miscibles dans les solvants polaires (figure 3.16).

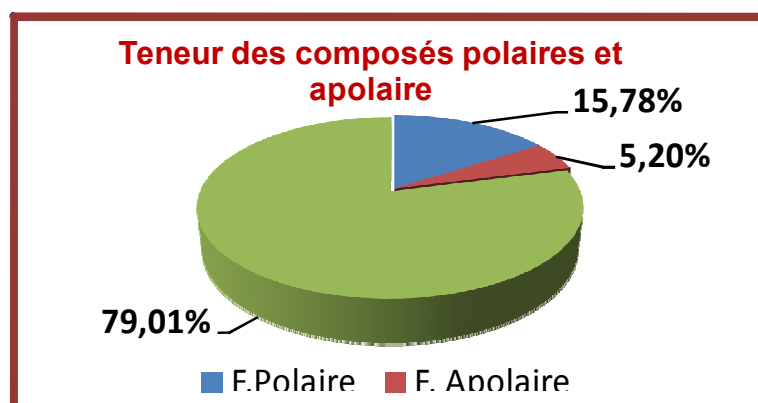


Figure 3.16: Pourcentages de la fraction polaire et apolaire de *Mentha rotundifolia* L.

3.3.4.2. Dosage des composés phénoliques

Le spectrophotomètre a permis de quantifier le taux de polyphénols dans l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L.

Une étude comparative avec des teneurs en phénols totaux a été faite grâce une à courbe d'étalonnage réalisée sur l'acide gallique à différentes concentrations (figure 3.17).

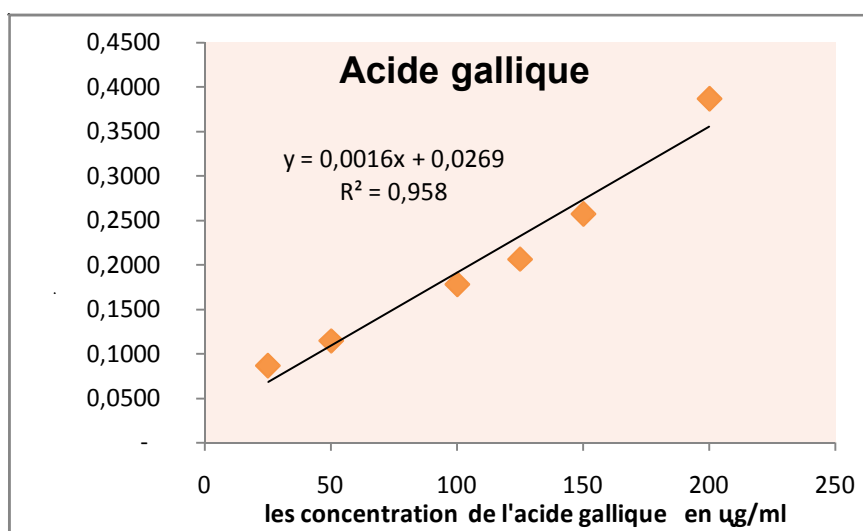


Figure 3.17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

La teneur en phénols totaux est rapportée en mg équivalent acide gallique par g d'extrait de plante sèche (mg EAG/g) (tableau 3.4).

Tableau 3.4: Teneur des phénols de l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L.

Plante	Teneur en phénols totaux (mg EAG/g de MS) Extrait méthanolique
<i>Mentha rotundifolia</i> L.	<u>111.21± 4.90 mg EAG/g de MS</u>

(Moyenne de 3 mesures ± écart type).

Le résultat obtenu en polyphénols (**111,21± 4,90 mg EAG /g de MS**) est nettement supérieure à celui obtenue pour l'extrait chlorofomique de *Mentha*

pulegium (2.968 mg EAG/g de MS), espèce de la même famille que *Mentha rotundifolia* L. [146].

D'autre part SAADAOUI *et al.*, [147] ont montré que la teneur phénolique de l'extrait méthanolique de quelques plantes appartenant à différentes familles telles que : *Punica granatum*, *Retama raetam*, *Thymus capitatus*, *Rosmarinus Officinalis*, *Ruta chalapensis*, *Ajuga iva* varie entre 1.68 à 11.07 mg EAG/ g de matière sèche. Ceci donne une certaine originalité à notre résultat. Nos résultats sont comparés avec ceux des espèces de la même famille que *Mentha rotundifolia* L (tableau 3.5).

Tableau 3.5: Teneurs en polyphénols de quelques espèces de la famille des Lamiaceae.

Espèces	Extrait	Valeurs (mg EAG/g de MS)	Références
<i>Mentha pipérta</i>	M- OH	0.166mg/g	[148]
<i>Salvia officinalis</i>	M-OH	0.0957 mg/g	[148]
<i>Teucrium polium</i>	M –OH	3.47mg/g	[149]
<i>Mentha pulegium</i>	M- OH	0.338 mg/g	
<i>Mentha microphylla</i> . <i>C.Koch</i>	Extrait éthanolique	315 mg/g	[150]
	Extrait aqueux	274.5 mg/g	
Résultat obtenu pour notre plante <i>Mentha rotundifolia</i> L.	M- OH	<u>111,21 mg /g</u>	

Selon W .U *et al.*, [151] la différence des teneurs en polyphénols peut être due aux conditions biotiques et abiotiques, la localisation géographique et les conditions expérimentales qui ne donnent pas une composition quantitative des extraits.

La teneur phénolique dépend également d'un certains nombre de facteurs extrinsèques (Génétiques). La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques rudes (les températures hautes, exposition solaire sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires, tels que les polyphénols [152].

3.3.4.3. Dosage des flavonoïdes

Des dosages spectrophotométriques ont été effectuées à partir d'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia*. L, afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes une courbe d'étalonnage (figure 3.18) a été réalisée avec un extrait de Quercétine à une longueur d'onde de 415nm.

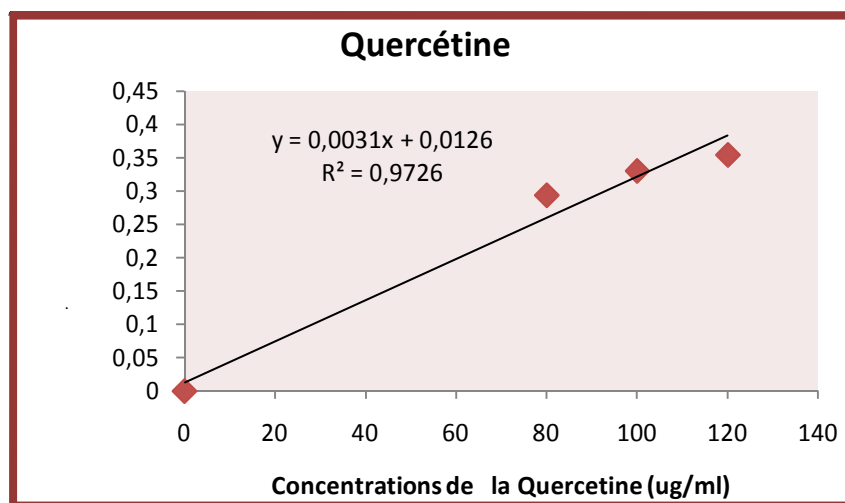


Figure 3.18: Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

La quantité de flavonoïdes correspondante à l'espèce étudiée a été rapportée en mg équivalent Quercétine/ g de matière sèche (MS). Cette teneur est de **6.68 ± 0.88 mg E Quercétine/g de MS** (Tableau 3.6).

Tableau 3.6: Teneur en flavonoïdes (mg E Quercétine/ g de MS (Moyenne des 3 Valeurs ± Ecart type)

Plante	Teneur en flavonoïdes (mg Quercetine/g de MS) Extrait méthanolique (1mg/ml)
<i>Mentha rotundifolia</i> . (L)	<u>6.68 ± 0.88 mg E Quercetine/ g de MS</u>

Cette valeur est nettement supérieure à celle retrouvée chez *Mentha piperita* (0.0632mg/g) [153].

La valeur la plus élevée a été observée chez *Mentha pulegium* (28.6mg/g) [(154)]. Les valeurs en flavonoïdes les plus faibles chez les espèces de la même famille que *Mentha rotundifolia* L. sont enregistrées dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7: Teneurs des flavonoïdes chez d'autres espèces de Menthes.

Espèces	Valeur en mg/g de MS	Références
<i>Mentha spicata</i>	0.004mg/ g	[155]
<i>Mentha piperita</i>	0.0088mg/ g	
<i>Mentha longifolia</i>	0.83mg/g	
<i>Melissa officinalis</i> Subsp. <i>Officinalis</i>	0.0046mg/g	
<i>Mentha officinalis</i> Subsp <i>altissima</i>	0.0029mg/ g	
<i>Mentha pulegium</i>	0.0598mg/g	[146]
Extrait M-OH		
E. chloroformique	0.0195 mg/g	
E. acétate éthyle	0.117mg/g	
Résultat pour notre plante <i>Mentha rotundifolia</i> L.	<u>6.68 mg / g</u>	

3.3.4.4. Etude des composés volatils

3.3.4.4.1. Extraction et rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles que nous avons obtenu est de **0.689 %** (g d'huile essentielle/ 100 g de matière végétale) (tableau 3.8).

Tableau 3.8: Rendement des HE de *Mentha rotundifolia*. L

Poids de la plante (feuilles) en (g) moyenne± écart type	Poids de HE en (g) Moyenne± Ecart type	Rendement(%) (m)% ± Ecart type
110.167 ±9.751	0.762 ± 0.102	<u>0.689 ± 0.037</u>

Le rendement obtenu (0.689 %) se rapproche de celui rapporté par BRADA et al. (0.7% et 0.9%) extrait de la menthe située au nord de l'Algérie [156] et celui rapporté par BOUGHADAD et al., (0.73%) [157].

Le rendement le plus important (4.33%) est celui de *Mentha rotundifolia* du Maroc [103], néanmoins des teneurs très faibles ont été rapportées sur *Mentha rotundifolia* de Corse (0.08%- 0.1%) [108]

Cette faible valeur obtenue peut être attribuée à la période de récolte avant floraison (Mars- Avril), au lieu de récolte et aux conditions climatiques. Il faut noter que le rendement et la composition chimique des huiles essentielles peuvent dépendre de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques à savoir : l'espèce, le milieu, la période de récolte, et les techniques d'extractions.

3.3.4.4.2. Contrôle organoleptique

Les huiles essentielles sont caractérisées par des propriétés organoleptiques telles que : l'odeur, la couleur et l'aspect.

Les résultats obtenus pour notre échantillon sont présentés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9: Propriétés organoleptiques de *Mentha rotundifolia* L.

Caractéristiques	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Mentha rotundifolia</i> .L	Liquide	Jaune foncée	Odeur puissante (pomme) propre à la matière végétale.

Le tableau 3.9 montre que l'huile essentielle est d'aspect liquide de couleur jaune foncée et son odeur est forte et persistante.

Les mêmes caractères organoleptiques ont été rapportés sur *Mentha rotundifolia* L. de la région de Sendja (Sud de Chlef) [158].

3.3.4.4.3. Etude qualitative des huiles essentielles

3.3.4.4.3.1. Composition de l'huile essentielle

De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier les composés chimiques des huiles essentielles responsables de leurs activités biologiques, (antimicrobiennes, antioxydants, antifongiques et insecticides).

L'analyse qualitative et semi quantitative des essences extraites par hydrodistillation a été réalisée grâce à un couplage GC/MS et par comparaison des spectres de masse de références. L'injection des n- alcanes sous les mêmes conditions opératoires, nous a permis de calculer les indices de retentions de tous les pics (tableau 3.10 et figure 3.19).

L'étude des HE par CG/MS a permis la mise en évidence de 21 composés représentant (69.241%) de la composition totale, constituée majoritairement par de l'oxyde de Pipériténone (30.373 %), oxyde de Pipéritone (23.78%).

Des composés minoritaires de faibles teneurs : Carvone (3.732%), Borneole (2.579), Y -Terpinène (2.619%), Terpinène-4-ol (1.274%). Le reste des composés sont sous forme de traces.

Les compositions dominées par l'oxyde de pipériténone ont été décrites au Maroc et au Japon [159], [160], L'oxyde de Pipéritone a été rapporté comme constituant majoritaire de l'HE de *Mentha rotundifolia* de Grèce [107].

Tableau 3.10: Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L

N°	Temps de retention	Composé	%	Indices de retention(IR)
1	13.820	α -pinène	0.083	937
2	14.485	Camphène	0.032	952
3	18.440	Sabinène	0.059	979
4	18.78	β -pinène	0.169	981
5	19.451	Octan-3-ol	0.296	1004
6	24.876	β -ocimene	0.339	1049
7	25.964	γ -terpinène	2.619	1065
8	28.330	1-octen-3-y acétate	0.267	1117
9	33.292	Bornéole	2.579	1166
10	34.187	Terpinène-4-ol	1.274	1179
11	39.762	Carvone	3.732	1254
12	40.718	NI	0.169	NI
13	42.500	Piperitone oxide	23.78	1274
14	46.396	Thymol	0.896	1299
15	46.863	Dihydrocarvyl acetate	0.215	1328
16	47.287	Piperitenone oxide	30.373	1374
17	48.525	NI	21.334	1392
18	50.209	Transcaryophllène	1.048	1419
19	51.910	α -humulène	0.258	1453
20	60.168	Oxyde de caryophyllène	0.879	15.83
21	60.823h	Viridiflorol	0.383	1591

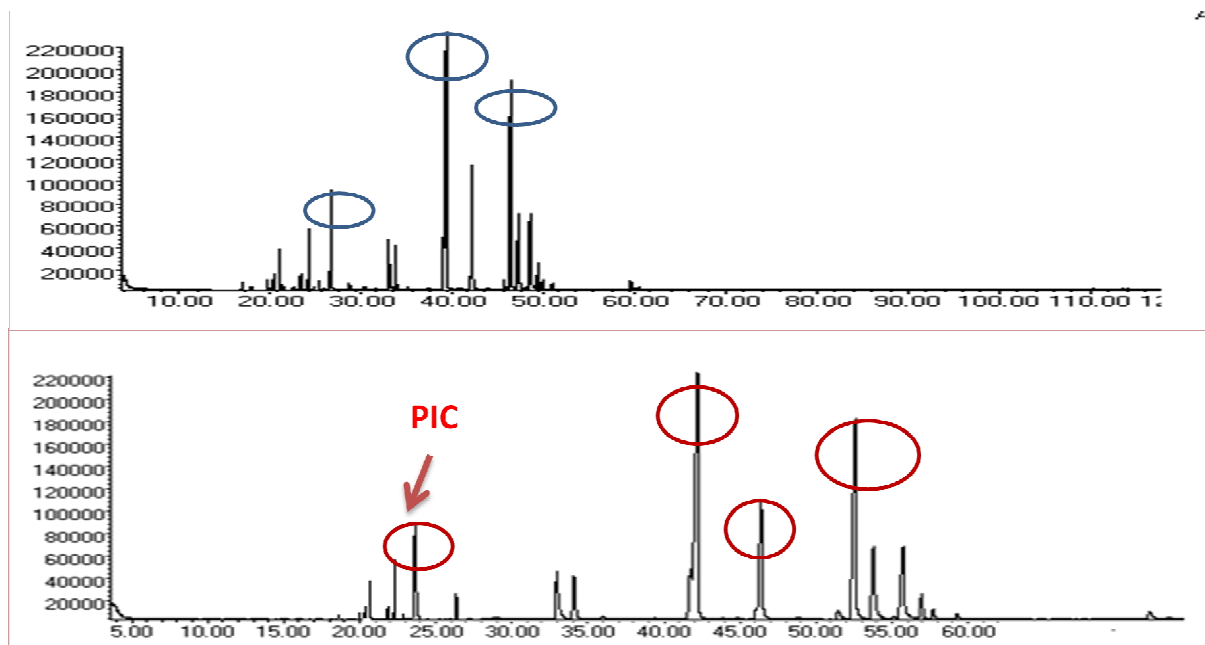


Figure 3.19: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. par GC/MS.

La composition en pourcentages des principales classes de familles de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. révèle qu'elle est riche en Ethers oxydes (55.032%) suivi par les alcools (5.388%) puis les cétones (3.732%) et enfin les sesquiterpènes (1.3%) alors que les esters n'excèdent les 1%, (tableau 3.11 et figure 3.20)

Tableau 3.11: % d'identification des familles chimiques de *Mentha rotundifolia* L.

Les familles chimiques	% d'identification
Monoterpènes hydrocarbonés	3.301%
Sesquiterpènes hydrocarbonés	1.306%
Cétones	3.732%
Alcools	5.388%
Ethers oxydes	55.032%
Esters	0.482%
% globale	69.241%

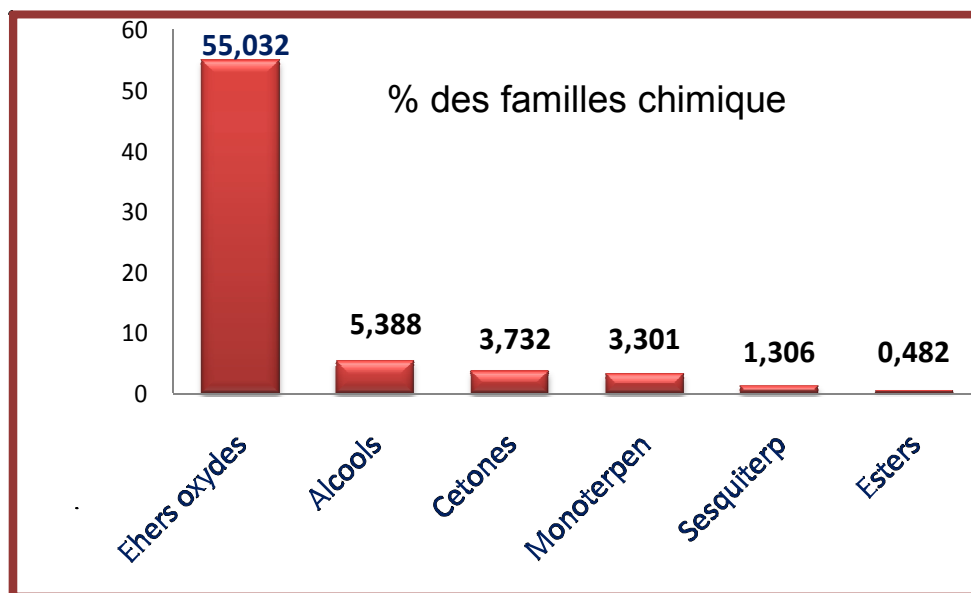


Figure 3.20: Composition en pourcentages des principales classes des familles de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L.

La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. est très variable. De nombreux composés ainsi que leurs associations sont à l'origine d'une grande diversité de compositions chimiques.

Les travaux de recherches montrent que dans la majorité des cas les constituants largement majoritaires sont des mono terpènes oxygénés [108], tels que : La Pulégone (50%) au Maroc, La Carvone (62.3%,) en Finlande, (40.3%) en Argentine [161] [162]; L'oxyde de Pipériténone (87.3%) au Japon et L'Oxyde de Transpipéritone (, 40.5% en Italie) [162].

L'analyse par CG et CG / MS de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du nord Algérien [156] a révélé l'existence de deux chémotypes caractérisés par des teneurs différentes en Oxyde de Pipéritone , l'Oxyde de Pipériténone et le Ppériténone. D'autres travaux [109] effectués sur *Mentha rotundifolia* de l'Uruguay montre également la présence des chémotypes avec différents composés majoritaires (80.8 % pour l'Oxyde de Pipériténone ,2 % pour Z Hydrate de Sabinéne).

En conclusion nos résultats corroborent avec ceux obtenus par HAMDANE et BENZAOUZ, [21] qui montrent une richesse en oxyde de Pipéritone (25.06 %) et l'oxyde de Pipériténone (8.92 %).

La différence de composition constatée des huiles essentielles est à mettre en rapport avec les facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des plantes, les facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol.

3.3.5. Activités biologiques

3.3.5.1. L'activité anti radicalaire (antioxydante) des extraits

L'activité antioxydante des extraits (HE et l'extrait méthanolique) de *Mentha rotundifolia* L. vis à vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm.

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de deux standards Quercétine et Rutine des courbes d'étalonnages ont été tracées.

3.3.5.1.1. Résultats de l'extrait méthanolique

Les résultats des pourcentages CR en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L. sont résumés dans les figure 3.21 et Figure 3. 22.

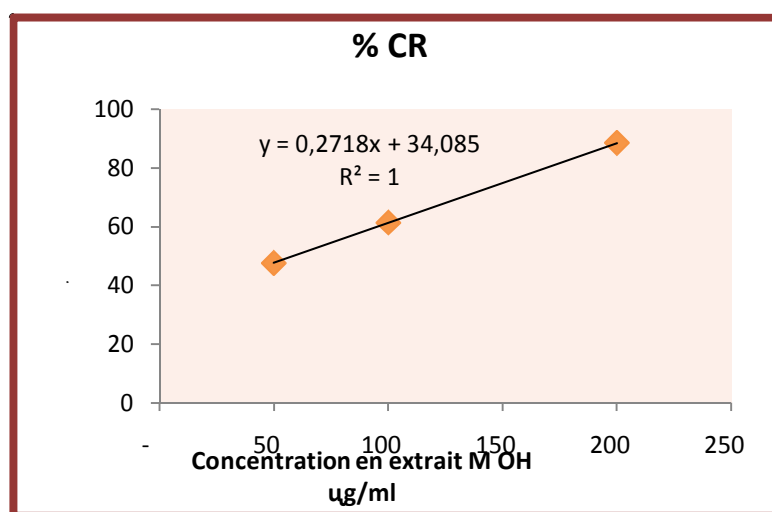


Figure 3.21: Courbe de régression linéaire : le pourcentage CR en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique en µg/ml. (Moyenne des 3 Valeurs ± Ecart type)

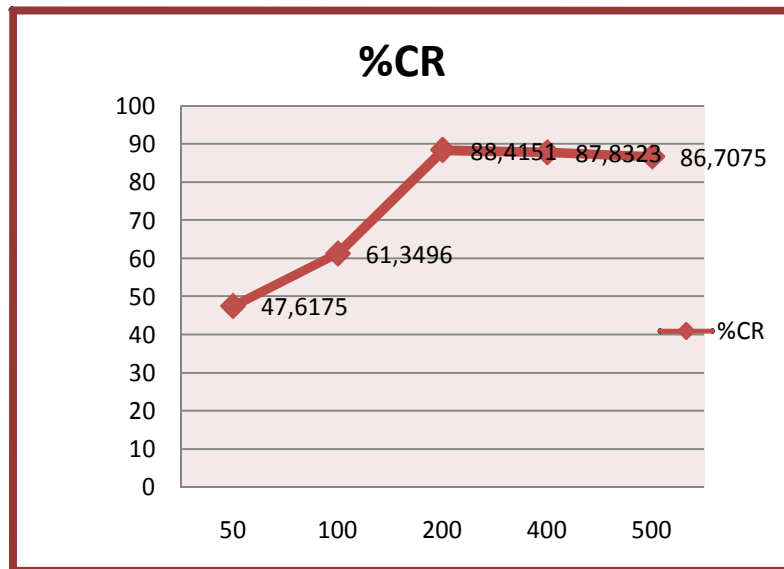


Figure 3. 22: Pourcentage CR en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L. (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type)

- Afin de comparer notre extrait méthanolique avec les standards de références (Quercétine et Rutine), on a tracé les courbes exprimant les pourcentages CR en fonction de leur concentrations, (figure 3.23 et Figure 3.24).

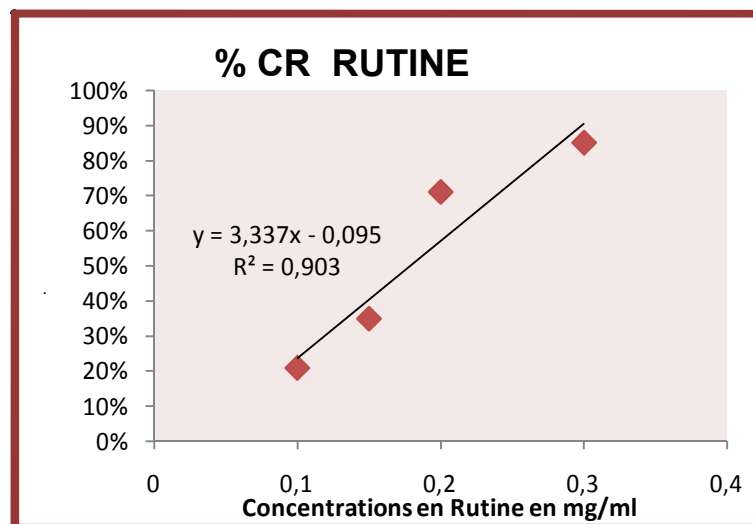


Figure 3.23: Courbe d'étalonnage de la Rutine. (Moyenne des 3 Valeurs \pm Ecart type)

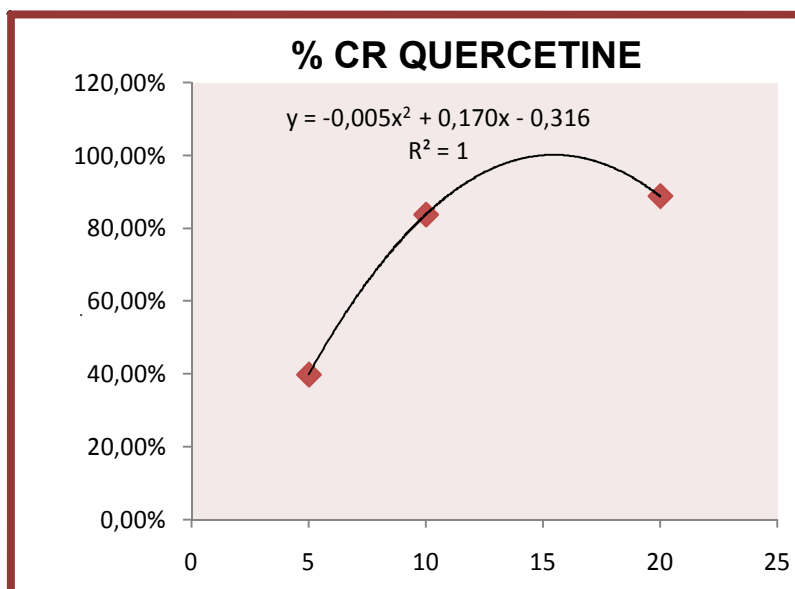


Figure 3.24: Courbe d'étalonnage de la Quercétine (Moyenne des 3 Valeurs ± Ecart type).

- Les résultats des IC₅₀ de l'extrait méthanolique, quercétine et rutine sont regroupées dans le tableau 3.12.

Tableau 3.12: Activité antioxydante (méthode DPPH) de l'extrait méthanolique exprimé en pourcentage de capture du radical (% CR).

Paramètres	Extrait M-OH	Quercétine	Rutine
Equation	Y=0.2718x+34.085	Y=-0.55516X ² +17.049x - 31.58	Y=3.337x-0.0957
R ²	1	1	0.9037
<u>IC₅₀</u> <u>(mg/ml)</u>	<u>0.0585±0.0003</u>	<u>0.0039±0.0000360</u>	<u>0.161±0.001</u>
%CR	47.675	////	////
APR	17.09	185.87	6.211

% CR : Le pourcentage de capture du radical DPPH.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice minimale qui réduit le DPPH de 50%

Y= % CR et x : concentration de l'extrait.

Pour des fins comparatives la Quercétine a montré une activité anti radicalaire puissante avec une IC50 de l'ordre de 0.0039 mg/ml.

Concernant la rutine, elle a présentée une activité anti-radicalaire moins marquée (0.161mg/ml) que celle de la Quercétine.

L'extrait MOH a montré une activité anti radicalaire ayant une IC50 de l'ordre de 0.0585 mg/ml selon les résultats enregistrés des extraits M-OH, Quercétine et Rutine, On constate que l'extrait M-OH est doté d'un pouvoir antioxydant modéré (Annexe F), son IC50 est relativement faible que celle du standard (Quercétine) contrairement à la Rutine qui définit un pouvoir anti-radicalaire plus faible que l'extrait. M-OH (figure 3.25).

Une étude comparative des IC50 de l'extrait méthanolique de de *Mentha rotundifolia* L. avec les IC50 d'autres espèces appartenant à la même famille des Lamiaceae (tableau 3.13) montre que notre valeur IC50 (0.0585mg/ml) est inférieure à celle de *Salvia pisdica* (4.88mg/ml) [163], de *Satureja calaminta* (2.075mg/ml) , de *Ajuga Iva* (6.36mg/ml) [88] et enfin de *Coleus aromaticus* (0.210mg/ml) [164]. Elle se rapproche légèrement de celle de *Nepeta flavida* (0.063mg/ml) [165], et supérieure à celle de *Teucrium polium* (0.0202mg/ml) [166]. Notre valeur IC50 est identique avec celle obtenue pour l'extrait M OH de *Calamintha sylvatica Bromf sub sp ascendens* (0.058mg/ml) [167].

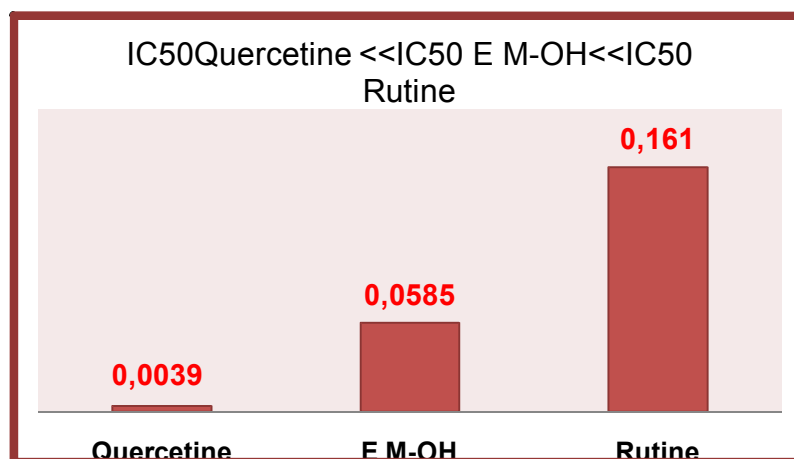


Figure 3.25: Comparaison des IC50 de l'extrait M-OH de M.r et du standard (Quercétine, rutine)

Tableau 3.13: Comparaison des IC50 des différentes espèces de la famille des Lamiaceae

Espèces	Extraits	IC50 (mg/ml)	Références bibliographiques
<i>Coleus aromaticus</i>	Aqueux	0.210	[164]
<i>Nepeta flavida</i>	MOH	0.063	[165]
<i>Teucrium polium</i>	M -OH	0.0202	[166]
<i>Calamintha sylvatica</i> <i>Bromf sub sp</i> <i>Ascendens</i>	M -OH	0.058	[167]
<i>Salvia pisidica</i>	M-OH	4.88	[163]
<i>Satureja calaminta</i>	M-OH	2.075	[88]
<i>Ajuga iva</i>	M-OH	6.36	
Résultat pour notre plante étudiée <i>Mentha rotundifolia</i> L.	M-OH	<u>0.0585</u>	

3.3.5.1.2. Résultats de l'huile essentielle

- Les résultats de l'activité anti radicalaire (appendice B) de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. sont représentés dans les figure 3.26 et Figure 3.27, et les résultats des IC50 des huiles essentielles dans le tableau 3.14.

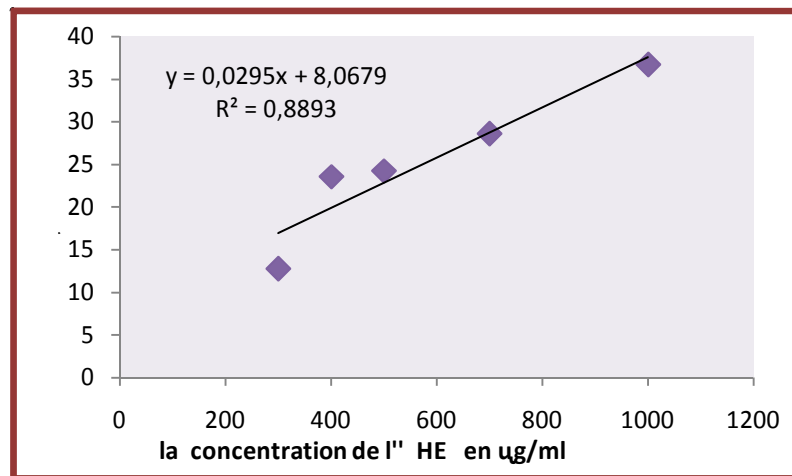


Figure 3.26: Pourcentage de capture du radical DPPH de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia L.*

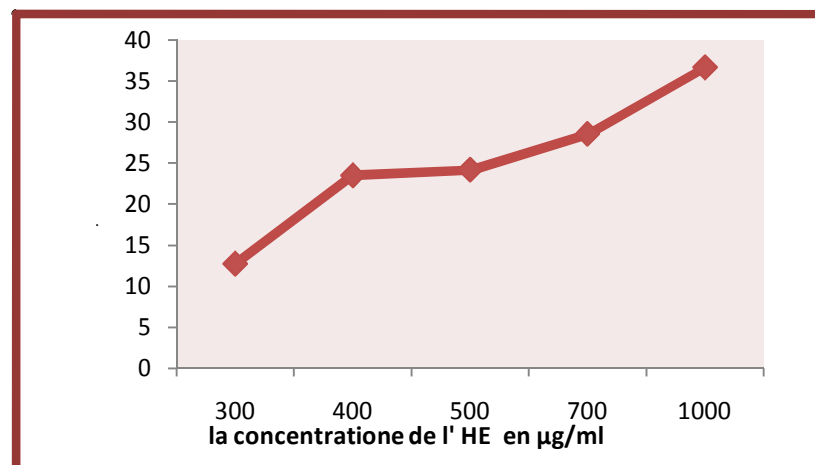


Figure 3.27: Pourcentage CR en fonction de la concentration de l'huile essentielle en µg/ml

Tel rapporté dans le tableau 3.14, les huiles essentielles de *Mentha rotundifolia L.* sont dotées d'un pouvoir antioxydant mais qui reste d'une efficacité très distante (IC50 1.421 mg/ml) comparé à la Quercétine (IC50 0.0039mg/ml) et à la Rutine (0.161mg/ml).

Tableau 3.14: Activité antioxydante (méthode DPPH) de l'huile essentielle exprimée en pourcentage de capture du radical (% CR).

Paramètres	Huile essentielle	Quercétine	Rutine
Equation	$Y = 0.0295x + 8.0679$	$Y = -0.55516X^2 + 17.049x + 31.58$	$Y = 3.337x + 0.0957$
R ²	0.8893	1	0.9037
% CR	9.5429	////	////
<u>IC50 (mg/ml)</u>	<u>1.421±0.04</u>	<u>0.0039±0.000036</u>	<u>0.161±0.001</u>
APR (1/IC50)	0.703	185.87	6.211

Nos résultats sont comparés ceux enregistrés dans d'autres espèces du même genre, qui ont manifesté une activité puissante de l'ordre de quelques milligrammes (tableau 3.15).

Tableau 3.15: Activité antioxydante des HE de quelques espèces de Menthes.

Espèces	IC50 (mg/ml)	Références bibliographiques
<i>M. rotundifolia</i>	0.02611	[168]
Tunisie(Bizerte, Beja)	0.02952	
<i>M. piperita</i> du Maroc	0.0536	[169]
<i>M. piperita</i> de l'Inde	0.273	[170]
<i>M. pulegium</i>	0.00057	[171]
<i>M. piperita</i>	0.01332	[172]
<i>M. longifolia</i>	0.0240	
<i>M. spicata</i>	0.00114	
L'Huile de notre plante El Hamdania (Cherkia)	<u>1.421</u>	

L'activité Antioxydante des HE peut être attribuée à leur composition chimique [169]. Elle est déterminée par le génotype et influencée par les conditions environnementales. [91]. Cependant la relation entre l'activité antioxydante et la composition des HE a été largement étudiée dans des travaux antérieurs [173]. Généralement, l'activité antioxydante des huiles est accordée à ces composés majoritaires [168].

Concernant la plante étudiée *Mentha rotundifolia* L. le degré et le niveau du pouvoir radicalaire peut être due à ces composés majoritaires: Oxyde de piperitone (23.70%) et oxyde de pipéritenone (30.373). Pour *Mentha rotundifolia* de Tunisie, l'activité antioxydante a été rapprochée à ses 2 composés majoritaires (Pulegone et oxyde de Pipèriténone), ceci a été confirmé par les travaux de RUBERTO et BARATTA, 2000 [174]. En effet, il a été rapportée que ces composés à très grand pouvoir anti radicalaire étaient des cétones.

Il est difficile de conférer le rôle anti radicalaire des HE à un seul ou quelques composés actifs mais c'est une interaction et un effet synergique de tous les composés majoritaires et minoritaires ou sous forme de traces constituant l'huile essentielle.

3.3.5.1.3. Comparaison entre l'huile essentielle et l'extrait M- OH

Le Tableau 3.16 regroupe les valeurs des IC50 et les valeurs du rapport anti-radicalaire de l'extrait méthanolique, l'huile essentielle, Quercétine et Rutine.

Tableau 3.16: Comparaison entre activité Antioxydante de HE et celle de l'Extrait

Les extraits et standards	M-OH	
	<u>IC50 (mg/ml)</u>	ARP (1/ IC50)
Huile essentielle	<u>1.421</u>	0.702
Extrait M OH	<u>0.058</u>	17.24
Quercétine	<u>0.0039</u>	185.87
Rutine	<u>0.161</u>	6.211

D'après ces résultats, la Quercétine s'avère avoir un pouvoir anti radicalaire puissant (0.0039mg/ml) comparée à celle de l'extrait M-OH (IC50=0.058mg/ml, ARP 17.24) et l'huile essentielle (IC50=1.421mg/ml, ARP 0.702)

La rutine par contre a un effet anti radicalaire (0.161mg/ml) plus faible que l'extrait méthanolique (0.058 mg/ml), cette dernière montre également un effet anti radicalaire plus élevée que l'huile essentielle (1.42 mg/ml).

La comparaison des standards (Quercétine et Rutine) par rapport aux extraits (HE et extrait M OH) nous a permis de classer leur pouvoir anti radicalaire en fonction des valeurs de leur IC50 (figure 3.28).

Quercétine > extrait M OH > Rutine > huile essentielle

Nous pouvons donc déduire que l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L présente une capacité de neutraliser le radical libre DPPH très puissante en comparaison à l'huile essentielle.

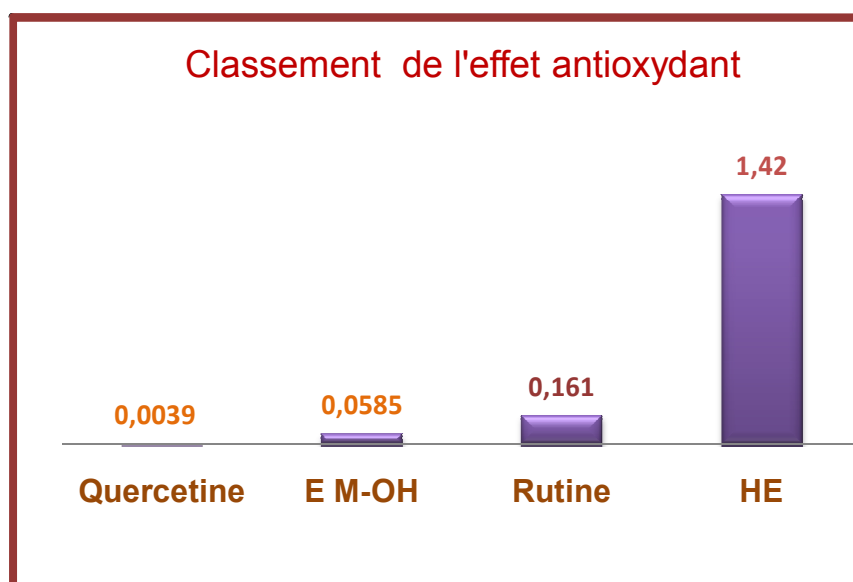


Figure 3.28: Classement du pouvoir anti radicalaire en fonction des IC50

3.3.5.1.4. Etude statistique

Le test de Kruskal- Wallis (Tests non paramétriques) montre que la différence est significative ($p= 0.0156 < 0.05$), ceci explique qu'il ya différence

d'activité antioxydante entre les standards de références (Quercétine, Rutine) et les extraits (huile essentielle et extrait méthanolique) (appendice D).

3.3.5.2. Activité antimicrobienne

Lors de notre étude, nous avons testé les huiles essentielles et l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L. vis-à-vis des souches microbiennes citées précédemment (tableau 2.1). Nous avons testé cette activité par la méthode de diffusion par disques.

3.3.5.2.1. Sensibilité vis-à-vis des antibiotiques

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé trois antibiotiques: Chloramphénicol, 30µg et Acide Pipémidique, 20µg (PI), Acide Fucidique, 10µg (FA).

Les résultats des mesures des zones d'inhibitions figurent dans le tableau 3.17

Tableau 3.17: Résultats de l'antibiogramme (diamètres moyens des zones d'inhibitions ± écarts types en mm). CHL (Chloramphénicol 30µg), PI (acide Pipémidique 20µg), FA (Acide Fucidique 10µg).

	Chlo DZI (mm)= (m±Et)	PI DZI (mm)= (m±Et)	FA DZI (mm)= (m±Et)
<i>Staphylococcus aureus</i>	26.45±0.015	9.86 ±0.01	29.88±0.05
<i>Salmonella. typhimurium</i>	26.93 ±0.015	22.1± 0.1	6.15 ±0.02
<i>Citrobacter. freundii</i>	26.1± 0.1	23.85± 0.05	7.95 ±0.005
<i>Escherichia. coli</i>	27.53 ± 0.01	23.7 ±0.17	7.96± 0.01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25.49 ± 0.34	17.13± 0.05	6.5±0.005
<i>Candida albicans</i>	6.1±0.1	7.45 ± 0.05	7.11 ± 0.09

D'après les diamètres d'inhibitions, on constate que la plupart des souches bactériennes ont montré une sensibilité vis-à-vis des 2 antibiotiques (PI et chloramphénicol) (figure 3. 29).

Le chloramphénicol est actif sur *S. aureus* (26.45mm), *S. typhimurium* (26.93mm), *C. freundii* (26.1mm), *E. coli* (27.53mm), *K. Pneumonia* (25.49mm).

L'acide Pilémidique (PI) est très actif sur *S. typhimurium* (22.1mm), *C. freundii* (23.85mm), *E. coli* (23.7mm), moyennement actif sur *K. Pneumoniae* (17.13mm), et très faiblement actif sur *S. aureus* (9.86mm) L'acide Fucidique (FA) a été fortement actif seulement sur une seule bactérie *Staphylococcus aureus* (29.88mm), et sans aucun effet vis-à-vis des autres bactéries étudiées ().

Concernant la levure *Candida albicans*, les (3) ATB n'ont présenté aucun effet sur cette dernière.

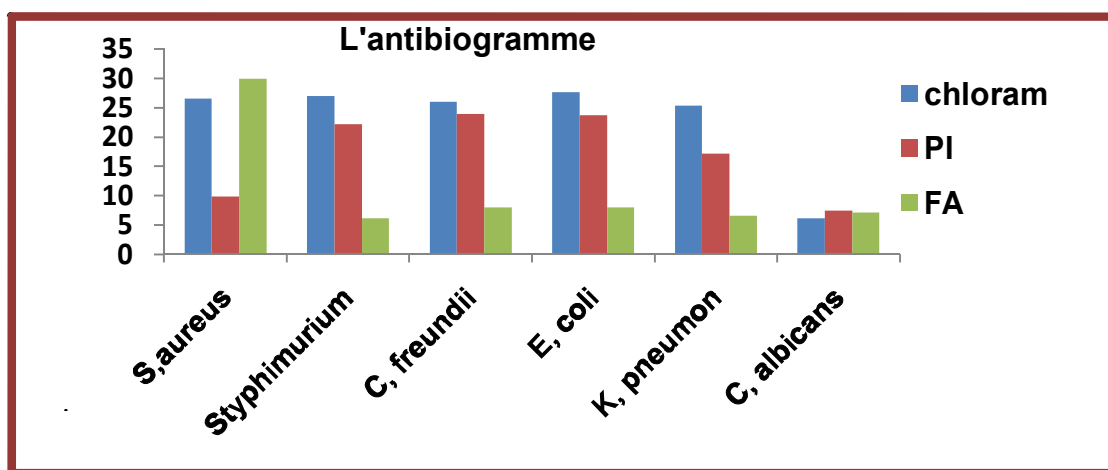


Figure 3. 29: Histogramme des diamètres des zones d'inhibitions des souches vis-à-vis des ATB.

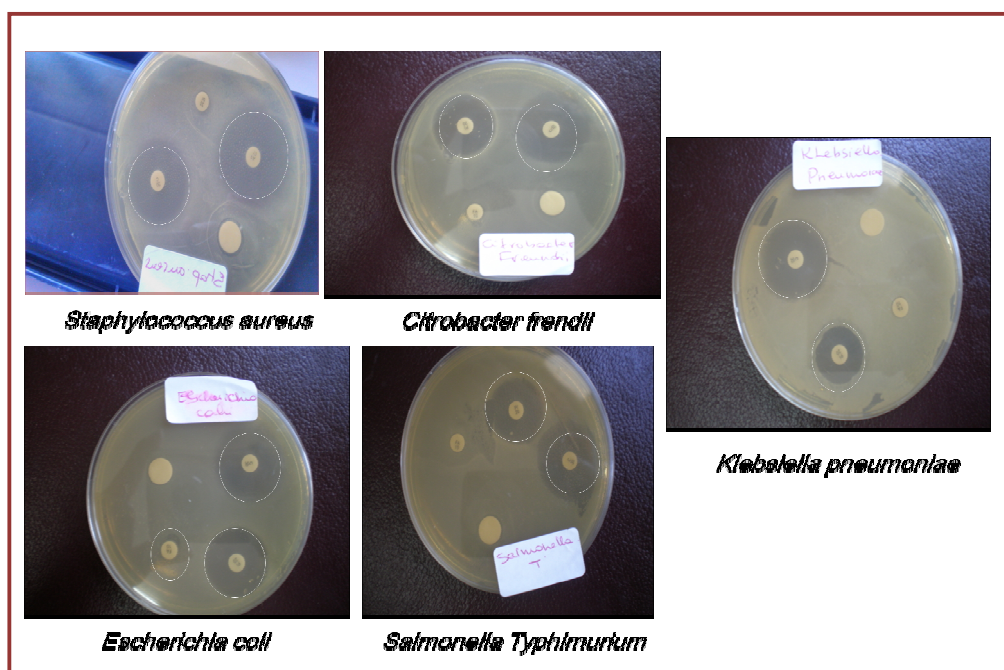


Figure 3. 30: Effet des antibiotiques sur les souches bactériennes

3.3.5.2.2. Détermination de l'activité antibactérienne et antifongique des HE et des extraits M-OH par méthode de diffusion par disques (aromatogramme)

L'aromatogramme est une méthode qualitative simple, appliquée à toute bactérie considérée comme pathogène. Les résultats sont rapportés dans le tableau 3.18 (les diamètres des zones d'inhibitions des HE et les extraits M-OH de *Mentha rotundifolia L.* relatifs aux souches microbiennes testées).

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis des HE et extrait M-OH est classée selon leur diamètres et selon les critères suivants :

- Non sensible (—) pour un diamètre inférieur à 9mm.
- Sensible (+) pour un diamètre y compris entre 9-14 mm.
- Très sensible (++) pour des diamètres y compris entre 15-19 mm
- Extrêmement sensibles (++++) pour des diamètres supérieurs à 20mm. [175].

Les résultats du degré de sensibilité des souches vis-à-vis des extraits M-OH et HE sont réunis dans le tableau 3.19.

Tableau 3.18: Moyennes des diamètres de zones d'inhibitions en (mm) des HE et l'extraits M-OH Vis-à-vis des souches testées.

Les souches (ATCC)	Les diamètres (mm) ± E type Extrait méthanolique	Les diamètres (mm) ± E type L'huile essentielle	Les diamètres (mm)± E type Témoin négatif (DMSO)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.16± 0.28	26.26± 0.25	—
<i>Salmonella typhimurium</i>	24.16± 0.15	14.16±0.15	—
<i>Escherichia coli</i>	20.3± 0.26	14.23 ± 0.20	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	18.23 ± 0.25	18.23 ±0.20	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24.1± 0.1	14.33 ± 0.28	—
<i>Candida albicans</i>	11.25± 0.25	12.4± 0.4	—

Tableau 3.19: Degré de sensibilité des souches vis-à-vis des extraits M-OH et HE (175).

Les souches (ATCC)	Degré de sensibilité Extrait méthanolique	Degré de sensibilité L'huile essentielle
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++++
<i>Salmonella typhimurium</i>	++++	+
<i>Escherichia coli</i>	++++	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—
<i>Citrobacter freundii</i>	++	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++++	+
<i>Candida albicans</i>	+	+

3.3.5.2.2.1. Discussion des résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

Selon les diamètres d'inhibitions l'huile essentielle est plus active sur *S. aureus* (26.26mm) et *Citrobacter freundii* (18mm), moyennement active sur *S. typhimurium* (14.16mm), *E. coli* (14.23mm), *K. Pneumoniae* (14.33mm) (Figure 3. 31).

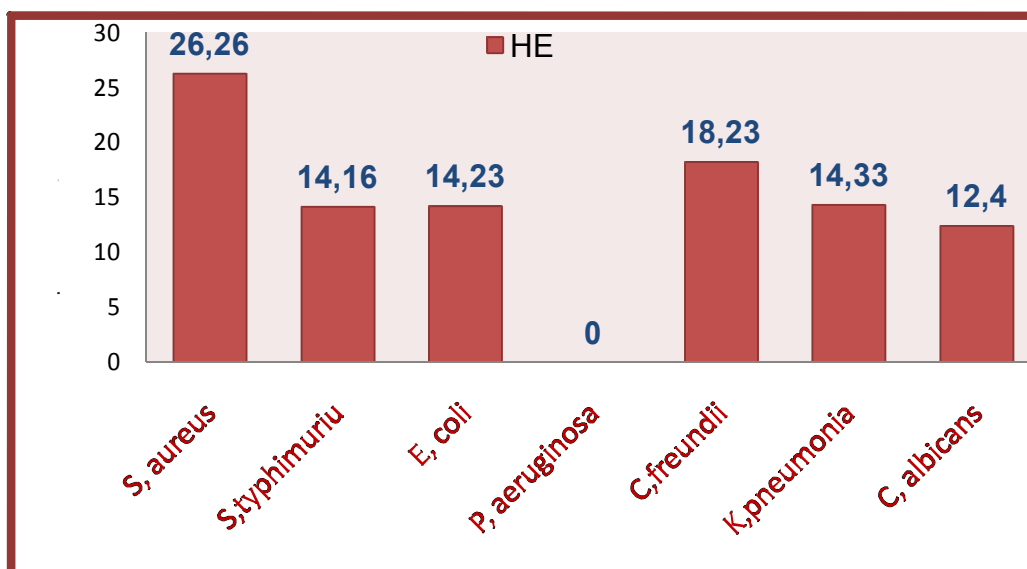
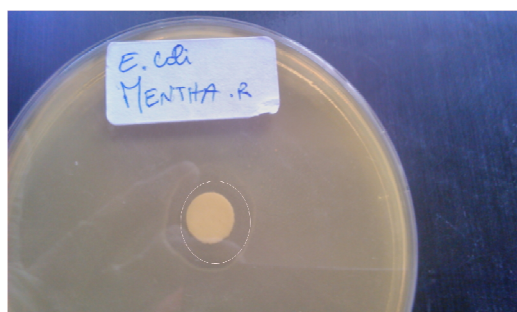


Figure 3. 31: Effet de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* sur quelques souches microbiennes (DZI : diamètres des zones d'inhibitions en mm).

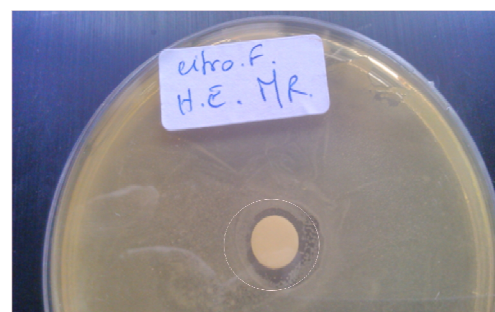
La souche *Pseudomonas aeruginosa* est particulièrement résistante à l'huile essentielle, les souches *Pseudomonas* ont toujours présentées une résistance vis à vis des HE à composé majoritaire (Pulégone) [176].

Il n'est pas de même pour notre espèce de Menthe puisque ses huiles essentielles sont riches en Oxydes d'éthers (55.032%), dont le composé majoritaire est l'Oxyde de Pipériténone (30.37%). A partir de ces constatations, la résistance de cette souche n'est probablement pas reliée avec la composition chimique des HE mais elle peut être due à la structure et la composition de la paroi de cette souche ; qui fait sa résistance.

La faible activité de l'huile vis-à-vis de des souches (*E. coli* et *K. pneumoniae*) (figure 3.32) n'est pas surprenante puisque ces bactéries Gram⁻ possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, cette dernière est en relation avec la nature de la membrane externe qui est composée de lipopolysaccharides, c'est une couche imperméable aux composés hydrophobes [177].



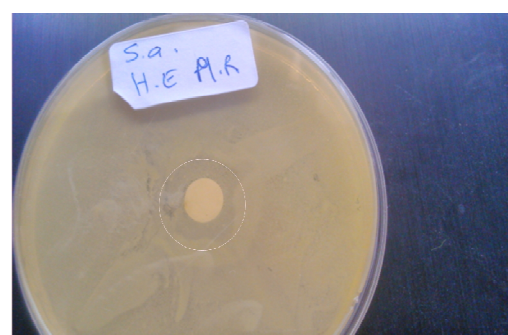
Escherichia coli
HE



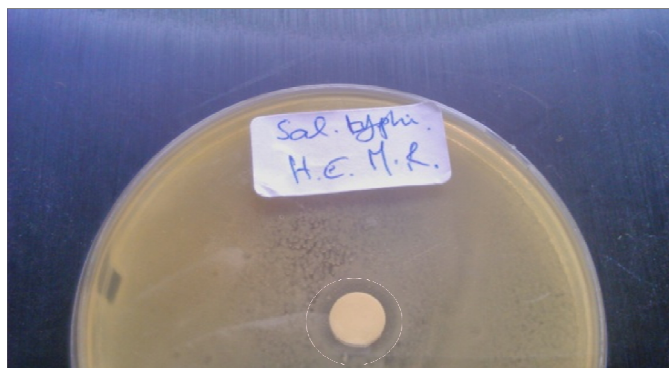
Citrobacter freundii
HE



Klebsiella pneumoniae
HE



Staphylococcus aureus
HE



Salmonella typhimurium

HE

Figure 3.32: Aromatogramme des huiles essentielles vis à vis de certaines souches bactériennes.

Par ailleurs, on remarque que l'espèce *Staphylococcus aureus* (Gram+) est la plus sensible à l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L.

En effet la plupart des études rapportent que les bactéries à Gram+ sont généralement plus sensibles que celles à Gram – [178].

Concernant *Candida albicans*, l'huile essentielle est faiblement active sur cette souche avec un diamètre de (11.25mm). Des travaux antérieurs [179] [180] ont démontré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a présenté une très faible activité antifongique malgré sa forte teneur en pulégone.

Il est intéressant de noter que l'huile essentielle et l'extrait M-OH de *Mentha rotundifolia* L. sont efficaces contre *S. typhimurium* (14.16mm et 24.16mm), il a été démontré que cette espèce microbienne manifeste une très grande résistance aux agents antimicrobiens [178].

Les travaux de MILOUDA EL ARCH et al., [181] sur *Mentha rotundifolia* ont montré que les HE de cette espèce exercent une forte activité sur *Staphylococcus aureus* et moyennement forte sur *Escherichia coli*, quand aux champignons, ces derniers présentent une résistance et sont moins vulnérables que les bactéries. Cette forte activité a été attribuée à la forte teneur en pulégone,

Le même résultat a été obtenu pour notre espèce mais pour une huile essentielle riche en oxyde Pipériténone (30.32%).

3.3.5.2.2. L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique se comporte différemment par rapport à l'huile essentielle, Il est fortement actif sur *Citrobacter freundii* (18.23mm), *Salmonella typhimurium* (24.16mm), *Escherichia coli* (20.3mm) et *Klebsiella pneumoniae* (24.1mm), moyennement actif sur *Staphylococcus aureus* (14.16mm) (figure 3.33 et Figure 3.34). La souche *Pseudomonas aeruginosa* semble être également très résistante à l'extrait méthanolique.

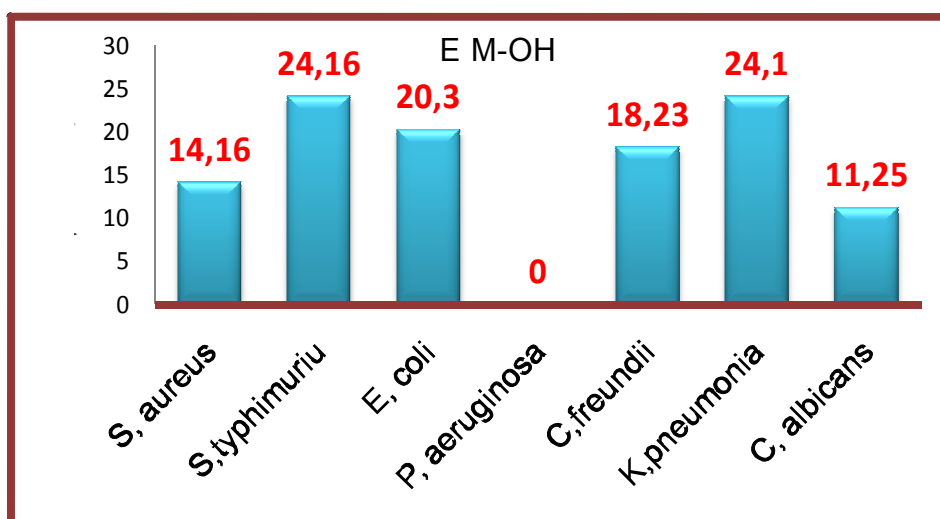
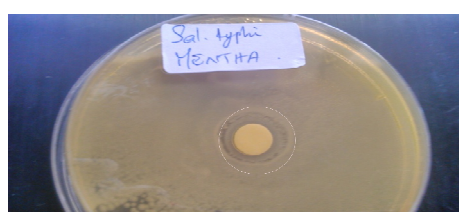


Figure 3.33: Effet de l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* sur quelques souches microbiennes (DZI : diamètres des zones d'inhibitions en mm)



Salmonella typhimurium
EMOH



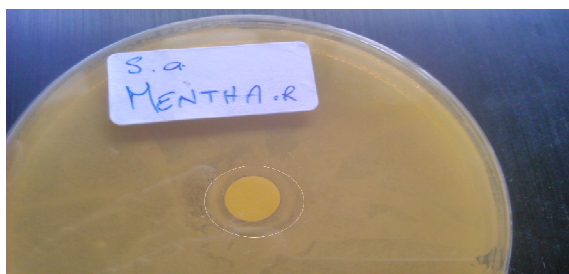
Escherichia coli
EMOH



Citrobacter freundii
EMOH



Klebsiella pneumoniae
EMOH



Staphylococcus aureus
M-OH

Figure 3.34: Aromatogramme de l'extrait méthanolique vis-à-vis de certaines souches bactériennes.

3.3.5.2.2.3. Comparaison de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique

D'après les résultats obtenus (tableau 3.19), nous remarquons que l'huile essentielle et l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia L.* agissent de façon active sur la majorité des bactéries testées et faiblement actifs sur *Candida albicans* à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui est particulièrement résistante.

Par comparaison des deux extraits (HE et extrait M-OH), on estime que l'extrait méthanolique est plus actif que l'huile essentielle vis-à-vis des souches étudiées (figure 3.35).

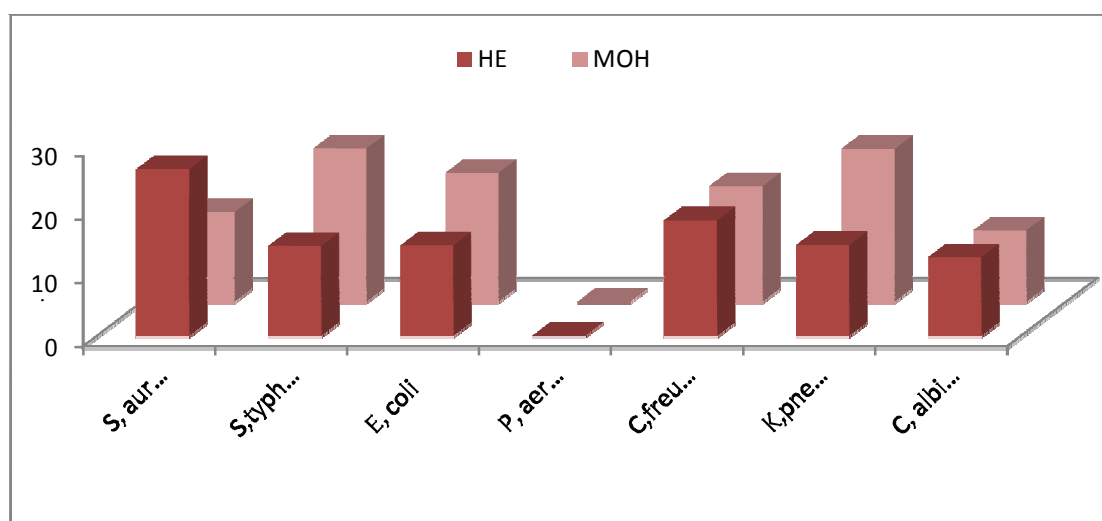


Figure 3.35: Etude comparative de l'effet antimicrobien de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle de '*Mentha rotundifolia L.* vis-à-vis de quelques souches microbiennes.

La différence d'activité antimicrobienne au sein du même genre et la même espèce peut être attribuée à la composition chimique de son huile essentielle. Cela est dû soit à une action unique de son composé majoritaire ou à une action synergique de tous ses constituants.

Selon DURAFFOURD *et al.*, [182] il est probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique, de cette façon la valeur d'une HE tient à son totum c'est-à-dire l'intégralité de ces composants.

En résumé, l'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires et les possibles effets synergique de ces constituants [182]

CONCLUSION

Cette étude est une contribution à la connaissance phytochimique et une évaluation des potentialités bioactives des huiles essentielles et des extraits méthanolique d'une plante médicinale : *Mentha rotundifolia* L. très utilisée en Algérie.

L'examen macroscopique et microscopique des tiges et feuilles de *Mentha rotundifolia* L. a permis de localiser les sites de sécrétion des huiles essentielles constituées par les glandes sécrétrices.

L'utilisation des procédés d'extraction, tel que l'hydrodistillation (Clevenger), le Soxhlet a permis de séparer et de quantifier les molécules volatiles et non volatiles .et un dosage des composés phénoliques totaux et les flavonoïdes.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires où nous avons constaté la présence des flavonoïdes (flavones), des tanins galliques des saponosides , des alcaloïdes et les hétérosides cardiotoniques.

L'analyse des essences par chromatographie gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse (CG/MS) a permis la mis en évidence de 21 composés représentant (69.241%) de la composition totale, constituée majoritairement par de l'oxyde de Pipériténone (30.373 %), oxyde de Pipéritone (23.78%)

La composition en pourcentages des principales classes de familles de L'huile essentielle de cette plante révèle qu'elle est riche en Ethers Oxydes (55.032%) suivi par les Alcools (5.388%) puis les Cétones (3.732%) et enfin les Sesquiterpènes (1.3%) alors que les Esters n'excèdent les 1%.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle et l'extrait méthanolique de *Mentha rotundifolia* L a été également étudiée par le test du radical libre DPPH ou la Rutine et la Quercétine ont été les molécules standards de références. la Quercétine s'avère avoir un pouvoir anti radicalaire puissant (0.0039mg/ml) comparée à celle de l'extrait M-OH (IC50=0.058mg/ml, ARP=17.24) et l'huile essentielle (IC50=1.421mg/ml, ARP =0.702)

La rutine par contre montre un effet antiradicalaire (0.161mg/ml) plus faible que celui de l'extrait méthanolique (0.058 mg/ml), cette dernière montre également un effet antiradicalaire plus élevée que l'huile essentielle (1.42 mg/ml). L'extrait méthanolique est doté d'une activité antiradicalaire meilleure est plus significative que l'huile essentielle.

L'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique vis-à-vis des souches bactériennes de références semble être plus intéressante et plus importante que l'huile essentielle. Pour l'activité antifongique, l'huile essentielle et l'extrait méthanolique n'ont aucun effet vis à vis de *Candida albicans*.

Perspectives

Pour la suite et la continuité de notre recherche et dans le but d'approfondir les connaissances vis-à-vis de notre plante *Mentha rotundifolia* L. on doit :

- Elargir l'étude des huiles essentielles de cette plante, dans d'autres régions d'Algérie.
- Suivre la variation de la composition des huiles essentielles en fonction des périodes de croissance des plantes.
- Isolement des composés actifs.
- Evaluer et tester les différentes molécules in vivo sur différents modèles biologiques en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques.
- On peut également approfondir notre étude à l'échelle moléculaire par extraction et purification des gènes responsable de ces activités biologiques.

REFERENCES

1. Wichtl, M., Anton, R., « Plantes thérapeutiques », Ed. Tec et Doc, (1999).p. 4-14
2. ISERIN, P., « Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins ».Edition, Larousse, (2001), pp : 15, 16,68.
3. Verdrager, J., « les médicaments qui nous viennent des plantes ». Edition Maloine.SA, (1978) .pp :12
4. Nacoullma, O.G., «Plantes médicinales et pratiques médicinales aux Burkina Faso », Thèse de doctorat d'état .Université de Ouagadougou, Burkina-Faso , (1996).
5. Robinson, M.M., Zhang, X.. “ World Health organisation”, Genève, (2011).
6. Ghanmi, M., Badr, Satrani, Aberchane,. M., « Plantes aromatiques et médicinales au Maroc, les milles et une vertu », Centre de recherche Forestière pp : 9
7. Baba Aissa, I., « Encyclopédie des plantes utiles » Edition. Edas. (1999), pp III, 12, 27, 48, 56.
8. Haan., J.H., Sisten, J., Vas, Buren., « les médicaments et leur utilisations » (éd). (1981), pp : 23-24.
9. LIEN <http://www.afssaaps.fr/activités/pharmacopée>.
10. LIEN www.wikiphyto.org/wiki/pharmacopée.

11. Sebai, M., Boudali, M., « La phytothérapie entre confiance et méfiance », Mémoire (2012).
12. Fluck., H., « petit guide panoramique des herbes médicinales : Description simple avec des indications de leurs principes actifs, leurs actions, leurs emplois, leur récoltes et leur cultures ». Edition de Lachauet Niestlé. SA, Neuchâtel, Paris 3^{ème} édition, (1977), P 165.
13. Encyclopédie encarta, « la phytothérapie », (2004).
14. Roger, J.L., « 250 Tisanes pour la santé », Paris : France Empire, (1987).
15. Ticli, B., « Votre herbier-160 plante médicinales », (2006), 218p.
16. Cecchini, T., avec la collaboration de Ticli. B, « Encyclopédie des plantes médicinales » Edition de vecchi .SA, Paris, (2003), 351P.
17. Anglade, S., Vivant, .A.C., « [http://quasimodo-versailles .Intra.fr/inapg/reat def/const/met secon.htm](http://quasimodo-versailles.intra.fr/inapg/reatdef/const/met%20secon.htm) », (2006).
18. Guignard, J.L., “ Biochimie végétale “ Masson, Paris, (1996), 255 P.
19. Brunetton, J., « pharmacognosie-phytochimie, plantes médicinales », 3eme Édition, techniques et documentations, (1999) ,1120 pages.
20. Kief, S., « Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (Troglodytes Schweinfurthii) », (2003).
21. Benazouz, .A., Hamdane, . A, « Etude et analyse des plantes médicinales : *Mentha pulegium*, *Mentha rotundifolia* et *Mentha spicata* L. », (2012), Mémoire de Master, Chimie Pharmaceutique.

22. Manallah, A., « Activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. », Mémoire de Magister, spécialité Biochimie appliquée (2012).
23. Bhorun, T., « Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement, potentielles. » Food and agriculture's research, council, réduit, Mauritius, (1997), pp 83-94.
24. Barbar Ali, M., Han, E.J., Park, K..Y., « Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng, bioreactor roots suspension cultures molecules », (2007), 12: pp (607-621).
25. Falleh, H., Ksouri, R., Chaib, K., Karray- Bourraoui, N., Trabelsi. N., Boulaaba, M., Abdelly, E., "Phenols composition of *Cynara cardunculus*.L organs and biological activities "C.R.Biology, 331 (2008),: pp 372-379.
26. Gomez, Caravaca, A.M., Gomez-Romero.M, Arraez- roman. D, Segura-Carretero.A, Fernandez- Guttierrez.A, "Advances in analysis of phenolic compounds in the products derived from bees" J . Pharmaceutical and biomedical analysis.H1, (2006), pp 1220-1234.
27. Martin, Andrian tsitohaina, " Mécanismes de protection cardiaques et vasculaires des poly phénols au niveau de l'endothélium » annale de cardiologie et d'angiologie, S1, (2002), pp 304-315.
28. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., « Bactériologie clinique» 3^{ème} édition ellipses (Ed), Paris, (2000), 274 P
29. Harborne, J.B., « plants phenolics » In bell EA, charwood BV, (eds), Encyclopaedia of plant physiology, Volume 2, secondary plant products, Springer- Verlag ,Berlin, New York, (1980), pp 329-395.

30. Dacosta, Y., "les phytonutriments bioactifs" Edition: Yves Dacosta, Paris. (2003) 133 P.
31. Gamet- Payraastre, .L, Manenti, S., Gratacap, M.P., Tuliez, J., Chap, H., Payraastre, B., "flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3 kinase "general pharmacology: 32; (1999), pp 279-286.
32. Harborne, J.B., "The flavonoids, recent advance in plants piments" Goodwin.TW, Academic press Londre, 1988, pp 229-313.
33. Haslam, .E, "Shikimic acids, metabolism and metabolits", John.w, sons, (1993).
34. Haslam, E., "Vegetable tannins" lessons of photochemical lifetimes "photochemistry, Volume 68,(2007), pp 2713-2721.
35. Cooper, Driver, A.G., "contribution of Jeffery Harborne and co-workers to study of anthocyanins "photochemistry, N^o 56,(2001) ,pp 229-239.
36. Hodek, P., Trefoil, P., Stiborova, M., "Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450." , Chemical-Biologic, (2000).
37. Boudiaf, K., « Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. », Mémoire magister (2006), Sétif.
38. Hollman, P.C.H., Vanrijp, J.M.P., Michel., M.C.P., Buysman, Martine, S. , .V.D, Gaag, Mengelers, M.J.B., De Vries, j.h.m., Katan, M.b., "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoids quercetin from various foods in man", FEBS Lett, (1997), pp152—156.
39. Kebieche, M., « Activité biochimique des extraits flavonoidiques de la plante *ranunculus repens* L. : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité. », Thèse de doctorat es Sciences Biochimiques. (2009).

40. Gonny, N., Bradesi, P., Casanova, J., "Identification of compounds of the essentials oils from wild Corsican *Daucus datura*" ,using 13.C, J-19, NMR. (2004).
41. Sosa, M.E., et Tonn, C.E., « Plants secondary métabolites from argentinean semi arid lands : Bioactivity against insects » ,phytochem Rev, ,(2006) , ,in Mémoire de magister,(2009) "contribution à la mise en évidence de principes actifs de plantes *Teucrium polium* provenant de Geyrii, région de Tamanrasset »..
42. Kebbas, S., « Extraction, caractérisation et identification de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante à caractères thérapeutique : *Spergularia rubra.L* et effet antibactérien », Mémoire de magister en biotechnologie végétale(2009).
43. Binnet, P., et Brunel, J.P., « physiologie végétale » Tome 2, édition Doin, (1967).
44. Porter, N., « Essentials oils and their productions. " Crop and Food research, (2001), Number 39.
45. Scharma, S., Sangwan, N.S, Sangwan, R.S, "Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in Menthol mint" Current Sciences, 84(4-25), (2003), pp 541-550.
46. Garnero, J., « les huiles essentielles, leur obtentions, leur analyse et leur normalisation » Edition Techniques- encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France. Phytothérapie et aromathérapie, (1991), C-2, pp 2-20.
47. Judd, W.S., et Campbell, C., "Botanique systématique, une perspective physiologique « Boeck, universités, (2002), Paris.

48. Paris, R., Hurabelle, M., "Abrégé de matière médicale, pharmacognosie », Tome 1, Edition Masson, (1980) Paris.
49. Debuigne, G., Couplan, F., Vignes, D., « Petit Larousse des plantes médicinales » Larousse, Editeur de qualité depuis 1852 Edition, (2009), Paris.
50. Bergougnot, V., « Biosynthèse et sécrétion du parfum chez Rosa x hybride » thèse de doctorat, (2005), université de Jean Monnet, Lyon.
51. Delaquis, P.J., Stanich, K., Gerard, B., Mazza, G., "Antimicrobial activity of individual and mixed fixation of dill cilantro coriander and eucalyptus essentials oils "Inst. J, Food microbial.74, (2002), pp 101-109.
52. Gonny, M., Guillemot, D., Ferrech,H., "National compaigns to improve antibiotic".
53. Kemba, D., Thiem, D., "Essentials oils, their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect an intestinal cell, toxical in vitro" (2004), 20, pp 1435-1445.
54. Tomi, F., Bradesi, P., Casanova, J., "Computer aided identification of individual components of essentials oils "using carbon-13 NMR spectroscopy. J. Magn. Reson. Anal, 1, (1995), 234 p.
55. Kurkin, V.A., "Bioactive Molecules and Medicinal plants", Chem., Nat, compounds. (2003).
56. Senator, F., "Influence of harvesting time on yield and composition of essentials oils of thyme (*Thymus pulegioides*.L) growing wild in Campania southern Italy" .J.Agric.Food chem, 44, (1996), pp 1327-1332.
57. Modzelewska, A.. Sur, S., Kumar, K.S., Khan, S.R., "Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth". Curr. Med. Chem. - Anti-cancer Agents, (2005), 5, pp 477-499.

58. Svoboda, K.P., Et Hampson, J.B., "Bioactivity of essentials oils selecte tomporate, aromatic plants: antibacrobial, antioxidant, anti inflammatory and others realted pharmacological activities." Plants, Biology, department .SAC. Auch incruive.Ayr, (1999).
59. C. Viollon, J.P., Chaumont, "Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. », *Mycopathologia*, (1994),128 (3), pp 151-153.
60. Vasconcelos, Silva, M.G., Craveiro, A..A., Abreu Matos, F.J., Machado, M.I.L., Alencar, J.W., «Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Occimum gratissimum*." *Fitoterapia*, 70, (1999)., pp 32-34.
61. Benhabib,C.,- Bekhech, " Analyse d'huiles essentielles d'*Ammoides verticilata* (Nunkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien » thèse de Magister, (2001), faculté des sciences biologiques, université Abou Bekr Belkaid.
62. Vila, R., Mundina, M., Tomi, F., Fursan, R., Zacchino, S., Casanova, J., Canigüreal, S.,"Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chalenpensis*" *Planta med.*68, (2002), pp 164-167.
63. .Pellecuer, J, Roussel. J.L, Andary J.L, « Recherche du pouvoir antifongique de quelques Huiles essentielles. ». *Rivista Italiano Essenzo* (1980).
64. Chaumont, J.P., Leger, D., « Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure –activité. » *Plant Med. Phyto.* 23(2), (1989), pp 124-126.
65. Karioti, A., Vrahimi-Hadjilouca, T., Droushiotis, D., Rancic, A., Hadjipavlou-Litina, D., Skaltsa, H., "Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity". *Planta Med.* 72, (2006), 1330-133

66. Mantle, D., Anderson, J.G., Barnes, M., Jones, P., Perry, K., "Methods for determination of total antioxidant status, application to analysis of Medicinal plant essential oils", *Comp. Biochem. Physiol. B, Mol. Biol*, 121, (1998), pp 385-391.
67. Siani, A.C., Ramos, M.F., Menezes-de-Lima, O.Jr., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez-Ferreira E., Soares, R.O., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimaraes, AC, Dordevic. S, Petrovic. S, Dobric S, Milenkovic. M, Vucicevic. D., Zizic, S., Kukic, J., "Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil." *J. Ethnopharmacol.* 109, (2007), 458-463.
68. Léon Raul- Hernandez Ochoa, " Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine solvant/ actif d'origine végétale. » Thèse en école doctorale, (2005), spécialité : Sciences des agro ressources.
69. Barel, S., Segal, R., Yashphe, J., 1991" The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*." *J. Ethnopharmacologie.* 33, (2005), 187-191
70. Unlu, M., Daferera, D., Donmez, E., Polissiou, M., Tepe, B., Sokmen, A., "Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae)" *J. Ethnopharmacologie.* 83, (2002), 117-121.
71. Candan, F., Unlu, M., Tepee, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., Akpulat, H.A., "Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae)." *J. Ethnopharmacologie.* 87, (2003), 215-220.

72. Zambonelli. A. D'Aurelio. A.Z., , Severi. A, Benvenuti. E, Maggi. A, Bianchi. L, "Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L." *J. Essent. Oil Res* 16(1), (2004), 69-74.
73. Fabian, D., Sabol, M., Domaracka, K., Bujnakova, D., « Essentials oils- their antimicrobial activity against *Escherichia coli*: and effect an intestinal cell, variability, toxical in vitro” , (2006), 20, 1435-1445.
74. Pauli, .A. « Antimicrobial properties of essentials oils, constituents “a review.int.J.Food microbial. 94, (2001) , 223-253.
75. Mangena, T., Muyima, N.Y.O.m.” Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains” . *Lett. Appli. Microbiol.* 28(4), (1999), 291-296.
76. Mbarek. L.A, Mouse. H.A, Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dala. L. A., Zyad,. A., , “Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) Extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts.” *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40, (2007), pp 839-847.
77. De Sousa, A.C., Alviano, D.S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S., Gattass, C.R., “*Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities.” *J. Pharm. Pharmacol.* 56, (2004), pp 677-681
78. Jafri, M.A., Farah, Javed.. K, Singh. S, “Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb).” *J. Ethnopharmacol.* 75, (2001), pp 89-94
79. Monti, D., Chetoni, P., Burgalassi, S., Najarro. M., Sactton , M.F., Boldrini., E. , “Effect of different terpenes-containing essential oils on permeation of

estradiol through hairless mouse skin” . *Int. J. Pharm.* 237, (2002), pp 209-214

80. Umezu, T., “Anticonflict effects of plant-derived essential oils.” *Pharmacology. Biochem. Behav.* 64, (1999), pp 35-400.
81. Zhao, R.J., Koo, B.S., Kim, G.W., Jang, E.Y., Lee, J.R., Kim, M.R., Kim, S.C., Kwon, Y.K., Kim, KJ, Huh, T.L., Kim, D.H., Shim, I., Yang, C..H., “The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI Suppresses nicotine sensitization.” *Biol. Pharm. Bull.* 28, , (2005), pp 2323-2326.
82. Rakotomalala, H., « Etude des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei*, caractérisation des constituants – activités biologiques » Thèse de doctorat sciences, la Réunion : Université de la Réunion, (2004), PP 15-16.
83. Nair achour, Khaled., « Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces D'eucalyptus poussant dans la région de Tizi ouzou », Mémoire de Magister, (2012), p .39
84. Lucches, M., « Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles », Mémoire de magister, (2005).
85. Guba, R., « Toxicity myths essentiels oils and their carcinogenic potential », international journal aromatherapy, 11, (2001), pp76-83.
86. Porrut, B., “ Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba* » , Thèse de l'obtention du diplôme de doctorat, institut Nationale polytechnique de l'université de Toulouse, spécialité enco toxicologie, (2008).

87. Fabies, A., « Le stress oxydatif, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladie et le potentiel thérapeutique », l'actualité chimique. 11, (2003), pp 108-115.
88. Bougandoura, N., « Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales : *Satureja Calamentha* (Nebta) et *Ajuga iva* L. Chendgoura) de l'ouest algérien » Mémoire de magister, (2011).
89. Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., Luthje, S., « Possible functions of extracellulaires peroxydas in stress, induced generation and detoxification of active oxygen species”; phytochemistry reviews, 3, (2004), pp 173-193.
90. Mariam., .Cheikh Traore, “Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali », Mémoire de magister, (2006).
91. Burt, S., “Essentials oils, their antibacterial properties and application in foods” a review, inst. J Food- Microbial, 94, (2004), pp 233-253.
92. Guerrin et Carret, “ L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt, limites. » Journées nationales, GTV- INRA, (1999), pp 5-12.
93. Tharib, S. M., Veitch, G. B. A., « Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia compestris* » J. Food, pro, 46. (1983), pp 681- 685.
94. Eymard, S., « Mise en évidence de l'oxydation des lipides au cours de la conversion et la transformation du chinchard (*Trachinus Trachinus*), choix des procédés » Thèse de doctorat en génie des procédés, spécialité Biochimie, Nantes, France, (2003).
95. Robert de Muet. S, « Méthodes de dilutions, et antibiogrammes », (1995) pp 131-137, Montréal, Canada.

96. Pibiri., M.C., « Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles» Thèse de doctorat, polytechnique, (2005), Fédérale de Lausanne.
97. Mann, C.M, et Markham, J.L., « A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils "Journal of Applied Microbiology: 84, (1998), pp 358-544.
98. Haddouche, F., et Benmansour, A., « Huiles essentielles et activités biologiques, application à deux plantes aromatiques » Article de synthèse, Journal, biotechnologie des laboratoires N° 8, (2009)
99. Nauciel, C., « Bactériologie médicale " Masson (ed), (2000), Paris. 276 P.
100. [www. AC- Orléans – Tours. fr/.../entérobactéries2 .jpg](http://www.AC-Orléans-Tours.fr/.../entérobactéries2.jpg).
101. Mouliner, C., "Parasitologie et mycologie, éléments de morphologie» EM inter (éd), (2003), 796 P.
102. Siegesthaler, W., luthy, R., « Current chemotherapy proceeding roth » International congres of chemotherapy 2 Washington. DL, AM. Soc Microbiol, (1978).
103. Benayad, N., "Utilisation des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaine comme insecticides pour lutter contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées (Blé, Mais, Riz) » Rapport d'activités, Faculté des sciences, Rabat,(Maroc),(2008), 63 P..
104. Jahandiez, Marie., R., « Catalogues des plantes du Maroc, spermatophytes et ptéridophytes.» Tome III ; P., (1934), Le chevalier, librairie Tournon, Paris.

105. Hadouche, N., « Etude et analyse des plantes algériennes *Artemisia campestris* et *Mentha rotundifolia*. » Mémoire d'ingénieur d'état en génie des procédés,(2011).
106. IL Idrissi, A., « Etude des huiles essentielles de quelques Espèces *Salvia*, *Lavandula* et *Mentha* du Maroc » Thèse de troisième cycle, (1982), Faculté des Sciences de Rabat.
107. Kokkini, S., Papageorgiou., V.P., “Constituents of Essential Oils from *Mentha rotundifolia* Growing Wild in Greece_” *Planta Med.* 38, (1988), pp. 166–167.
108. Sylvain, Sutour., « Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de Menthes de corses et de Kumquats » Thèse de doctorat en chimie organique et analytique, (2010).
109. Lorenzo, D., Paz., D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila ,R., Canigueral S. « Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay.”, *Bras Arch. Boil. Technol.* 45 (4), (2002). p. 519–524.
110. Hendriks, H., Vans os, F.H.L., “Essentials oils of two chemotypes of *Mentha suaveolens* during ontogenesis”, *phytochemistry* 15, (1976), P. 1127-1130.
111. Benchabane, A., « L'utilisation de quelques labiées dans la médecine traditionnelle chez les berbères de l'assif l'Erdouz (haut atlas du Maroc) » *Rev .fac . .Mar .5*, (1991), pp 82, 94.
112. Page, M., et w. T., Stearn., « plantes aromatiques ». (Ed), Bornemann, (1990), Paris.
113. Beauquesne, B., Pinkas, M., Torik et Tortin, F., « plantes médicinales des régions tempérées » Ed, (1980), Maloine.
114. Ounissi, M.S., « Dictionnaire chaoui » francais – arabe, 121p.

115. Le père G. Huyghe, « Dictionnaire chaouia, arabe, kabyle, français », (1907), P 225.
116. Doutté et Gautier, « enquête sur la dispersion de la langue berbère en Algérie », (1913), pp 14-15.
117. Ghania TAIL « perspectives d'utilisation des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*, L. dans la lutte contre le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (ferskal ,1775) ».
118. El Rhaffari,R., Lallaoui, K.H., Benhssein et K.H., Sellam., « Valorisation des plantes aromatiques et médicinales ».
119. M'hamsadji, N., « Usages et rites alimentaire d'Algérie », Annales de l'institut d'études orientales Alger, (1956), page268.
120. ISERIN, Masson, J.P., Restellini., « Encyclopédie des plantes médicinales .identification, préparation, soins », Larousse, Bordas, (1997).
121. Zerrad, W., Hillali, S., Mataoui, M., El antris, B.S., et Hmeyan, A., « Etude biochimique des mécanismes moléculaires des résistances au stress hydrique de deux variétés de blé dure» Laboratoire de Biochime, d'environnement, Maroc, (2006).
122. Martin, P.P., Gagnard, J., Gautier, P., Drouineau, G., « L'analyse variétale de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales » Lavoisier, Paris, (1984) 1P.
123. Diallo, D., « Ethno pharmacological Survey of medicinal plants in Mali and photochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Azoaceae),*Diopyros abyssimica* (Ebenaceae), *Entada Africana*

- (mimosacea), *Trichillia emetica*, (Meliaceae)” Thèse de doctorat de recherche, facultè des sciences de l’université. De Lausanne, Suisse, (2006).
124. Mamadou, Badiaga., « Etude ethnobotanique et phytochimique de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali » thèse de cotutelle pour l’obtention de grade de Docteur d’Université, (2012)
125. Amrani, O., “Valeur nutritive du chardon marie *Sylibum marianum* » Mémoire de magister agronomie, (2000), université de Batna.
126. <http://de.wikipedia.org/wiki/Soxhlet>.
127. Chebaki , R., « Etude photochimique de *Scrophularia saharae* , deserti coss » mémoire de magister en chimie université de Batna , (2006).p .46
128. Boizot, N., et Charpentier, J.P., « Méthode rapide d’évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d’un arbre forestier. » Le cahier des techniques de l’Inra, (2006), pp 9-82. cited in Djemai Zoueglache S, (2008).
129. Semih, Otles., et Bucket., Yalcin., « Phenolic compounds analysis of root stalk and leaves of nettle” Food Engineering, Department, (2011).
130. Mahmoudi, S., Khali, M., et Mahmoudi, N., « Etude de l’extraction des composés phénoliques de toutes les parties de la fleur d’artichaut (*Cynara scolymus*. L. Nature et technologie, (2013).
131. Normes AFNOR, « Recueil des normes françaises, huiles essentielles » AFNOR, Paris, (1992).
132. Pharmacopée européenne 1, « Conseil de l’Europe, », Maisonneuve, S.A édition sainte Ruffine , (1996.).

133. El Aib, A., « Valorisation des terpènes naturels issus de plantes Marocaines par transformation catalytique » Thèse de Doctorat, Universités de Toulouse, (2011).
134. Caree., P., « Précis de technologie et de chimie industrielle », édition Ballière , J , B et fils Tome 3,(1953), 170p.
135. Demaak F., et Sablier, « Couplages chromatographiques avec spectrométrie de masse », techniques de l'ingénieur, traité, analyse et caractérisation, (1997), pp 2614.
136. Rouessac, F., « Analyse chimique- Méthodes et techniques instrumentales modernes», Edition Dunod 5^{ème} édition, 2006, p, 219.
137. Mohammedi, Z., " Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen » thèse de magister en Biologie faculté des sciences, Département de Biologie, Université de Abou Bakr Belkaid, (2008), pp 13.
138. Leitao et al, « Quick preparative, separation of natural Naphtopyranones with antioxidant activity by high- speed counter-current chromatograph" Z. Nature. Food, (2002). pp 105-1055.
139. Chen, G.N., Wang, M.S., Wu, C.L., Lin, J.K., « Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis inductions in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources", CAM 1(2), (2004), pp 175-185.
140. Razafindrakoto, A.R.," Caractérisation physicochimiques et biologiques de l'huile essentielle de feuilles d'*Ocotea laevis*. Kist (Lauracées) « Mémoire de DEA en Biochimie appliquée en sciences médicales, (2010).
141. Wang, G., Mazza, G., « Effect of anthocynins and others phenolic compounds, on the production of Tumor necrosis α . LSP/ IFN-Y- activated

- RAW 264.7 Macrophage" J. Agric. Food. Chem. 50, (2002), pp 4381-4383
142. Sonago, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C, Bougoudougou, F., 2006 « Activité antimicrobienne et antalgique de 2 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali » Ed Mali, Médical. T XXI. N° 1, (2006), PP, 18-23.
143. Ikegami, F., Sumino, M., Fudji, Y., « Pharmacology and Toxicology of Bupleurum root- containing kompo medicines in clinical use » Hum. Exp.Toxicol. 25, (2006), pp481-494.
144. Guessan, N., Kadja, N.G., Zihiri, D., Traoré et Akessi, L., "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales Ivoiriennes, utilisées en pays Krobou (Agboville, cote d'Ivoire) » Sciences et Natures (1) (2009), pp 1-15.
145. Zekri, N., Amalich, S., Boughdadm, A., Alaoui, el Belghiti, Zair, T., « Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. From Morocco against *Sitophilus oryzae*", Mediter. Journal of chemistry: 2 (4), (2013), pp 604-619.
146. Bencheikh, D., " Polyphenols and antioxidant properties of extracts from *Mentha pulegium* and *Matricaria camomilla*" Mémoire de Magister en Biochimie, (2012).
147. Saadaoui, B., Bekir, J., Ammar, S., Mahdjoub, A., Mars, M., " Etude de la composition et du pouvoir antioxidant des composés Phénoliques de quelques espèces végétales de l'aride Tunisien » Revue des régions arides (2007), 1, pp 87-92.
148. Khelreddine, H., « Comprimés de poudre de datte comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie » Mémoire de Magister,(2012).

149. Ghezghazi, H., Ouadhi, A., Maaroufi. Chada. A, Hasnaoui. B, « Comparaison des contenus en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits méthanolique de 4 plantes collectées au Nord de Tunisie. », (2013).
150. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., « Evaluation of antioxydant activity and photochemistry analysis of *Mentha microphylla*. C. Koch extracts. “. (2003).
151. Wu, Y., Beecher, G., Holden, R., Haytowitz, M., Guebherdt., S.E., Prior, S.L., “Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of common foods in the United States.” Agriculture and food. Chem, 52, (2004), pp 4026-4037.
152. Podsedek, Romy, N., “Activity- guided isolation of antiplasmodial dihydroxychalcones and flavonones from *Piper hostmannium*- var *berbisens*. “ Phytochemistry, 68 (9),(2007), pp 1312- 1320.
153. Olennikov, D., Tankhaeva, N., “Quantitative determination of phenolics compounds in *Mentha piperita* leaves. “ Chemistry of National compounds: V. 46, (2010), pp 22-27.
154. Bentaleb, A., Moudjahed, N., Ksouri, R., “Secondary compounds characterisation in some autochtonous species from a North- eastern, region of Tunisia.”, (2012).
155. Fialova, S., Tekelova, D., Mirlianova, D., Gracai, D., “The determination of phenolics compounds and antioxidant activity of Mints and Balms cultivated in Slovakia.” Acta facultatis Pharmaceutics, (2008).
156. Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier. A., et Lognay, G., « Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du nord de l'Algérie. » Biotechnology, Agro, Soc, Envir, 11 (1), (2007), pp 3-7.

157. Boughdad, R., El Kasimi et Kherchafi, U., « Activité insecticide des huiles essentielles de *Mentha* sur *Collobrochus maculatus* (Coleoptera, Bruchidea » AFPP- 9^{ème} conférence Internationale sur les ravageurs en Agriculture, (2011).
158. Benbouali, M., « Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de *Mentha rotundifolia* L. et de *Thymus vulgaris*. » Mémoire de Magister, Université de Hassiba Benbouali, Chlef, (2006).
159. Ouzmil, S., Ghouli, M., Radjaoui, A., Elidrissi, S., Fekih – Tetouami, M., Faid, A., Bendjaouad., “ Activite antibacterienne et antifongique des huiles essentielles de *Mentha suaveolens*” *Phytother. Res.* 16, (2002), pp, 727-731.
160. Handa, K.L., Smith, D.M., Nigam, I.C., Levi, L.,” Essentials oils and their constituent’s xxxiii chemotaxonomy of the genus *Mentha* “, *Journal. Phrm. Sci.* 53, (1964), pp 1407-1409.
161. Galombosi, B., Aflatuni, A., Sorvari, K., “Effect of cultivation techniques on Mint oils in northern Finland.” *Perfum. Flavor.*23, (1998), pp 27-31.
162. Lawrence, B.M., “Mint, the genus *Mentha*, medicinal and aromatic plants, industrial profiles.”CRC. Press/ Taylor et Francis, (2007).
163. Ozkan, G., Sagdic, O., Gokturk, R.S., Unal, O., Albayrak, S., 2010, “Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica*.” *Food Science and Technology*, 43, (2008), pp 186–190.
164. Kumaran, A., karunakaran, R.J., « Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*.” *Food Chemistry*, 97, (2006), pp 109–114.

165. Tepe, B., Daferera, D., Tepe, A..S., Polissiou, M., Sokmen A.,”. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepetaflavida* Hub.-Mor. From Turkey. *Food Chemistry*, 103,(2007), pp 1358–1364.
166. Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M.; “Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L” .*Food Chemistry*, 112, (2009) , pp 885-888
167. Lopez, V., Akerreta, S., Casanova, E., Garcia-mina, J.M., Yolanda, Caverro.,R., Calvo Maria., “In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of lamiaceae herbal extracts. “ *Plant Foods for for Human Nutrition*, 62, (2007), pp 151-155.
168. Riahi, L., El Ferchichi, H., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., Chegrani, H. Zaoual, Y., Zoghlami, N., Mliki, A., « *Phytochemistry, antioxydant and antimicrobial activities of essentials oils of *Mentha rotundifolia* L.in Tunisia.* “ *Journal. Industrial crops and products*, 49,(2013), pp 883-889.
169. Derwich, E., Chabir, R.,Touil, R., Senhadji, O., « *In vitro- antioxydant activity and GC/MS studies on the leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco*” *Int. J. Pharm.sci. drug resp.* 3 (2), (2011),pp130-136.
170. Samarth, R., Meenakshi, P., Manish, K., Anil, S., Madhu, K., Ashok, K., “*Evaluation of antioxidant and radical scavenging activities of certains radio protective- plant extracts.*” *Food. Chem.* 106, (2008), pp 868-873.
171. Souri, E., Gholamreza, A., Dehmobed- Sharifabeth, A., Atefeh. N, Farsam. H, “*Antioxydative activity of sixty plants from Iran.*” *J. Pharm. Resp*23, (2004), pp 55-59.
172. Souri, E., Gholamreza, A., Farsam, H., Jalalizadeh, H., Barezi, S., “*Screening of thirteen medicinal plant extracts for antioxidant.* “ *Iran. J. Pharm. Resp*, 7 (2), (2003), pp 149-154.

173. Boudjouref, M., « Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. » Mémoire de Magister, Spécialité : Biochimie appliquée, (2011).
174. Ruberto, G., Baratta, M., "Antioxidant activity of selected essential oils components in two lipid systems." *Food Chem.* 69, (2000), pp167-174.
175. Ponce, A.G., Fritz, R., Delvalle, C.E., Roura, S.I., " Antimicrobial activity of essential oils on native microbial population of organic Swiss chard. " *LWT.* 36, (2003), pp 679-684.
176. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., "Antimicrobial activity of mint essential oils." *J Agric. Food Chem.*, 43, (1995), pp 2384 - 2388.
177. Prat, R., " Expérimentation en Biologie végétale, 300 Manipulations. »
Edition QUAF, HERMAN Editor, Paris, (2007), pp 56.
178. Mimica-Dukić, N., Boin, B., Soković, M., Mihajlović, B., Matavulj, M., "Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils." *Planta Medica*, 69, (2003), pp 413-419.
179. Arras, G., Usai, M., "Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* L. Hoffing. Oil, effect in sub atmospheric pressure conditions." *J of Food Protection*, 64, (2001), 1025 - 1029. 181.
180. Chebli, B., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M., Hmamouchi, M., "Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*" *J. Ethnopharmacology*, Vol 89 , (2003) pp 165-169.

181. El arch, M., Satrani, B., Farah, A., Bennani, L., Boriky, D., Fechtal, M., Blagnen, M., Talbi, M., " Composition et activité antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* du Maroc. » Acta. Bot.Gallica150, (2003), pp 267-274.

182. Duraffourd, C., Lapraz., « Traité de phytothérapie chimique. » Elsevier, Masson, Paris, (2002), pp 115-138.

APPENDICE A

Liste des abréviations, symboles et conventions

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American. Type Culture Collection

Cm : Centimètre

CG/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse

g: Gramme

µg : Microgramme

C°: Degré Celsius

HE: Huile Essentielle

ml : Millilitre

ME-OH : Méthanol

mg E Q/ g : Milligramme Equivalent Quercétine par gramme

mg E R/g : Milligramme Equivalent Rutine par gramme

mg E AG/g : Milligramme Equivalent Acide Gallique par gramme

IC50 : Concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution

% CR: Le pourcentage de capture du radical DPPH.

DMS : Diméthyle sulfoxyde.

APPENDICE B

Appareillages, verreries, réactifs et milieux de culture utilisés

B1- Liste des appareillages

- Balance de précision
- Plaque chauffante
- Chauffe ballon
- Bain marie
- Evaporateur rotatif
- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Loupe binoculaire
- Microscope photonique
- micropipette de 10 μ l, 100 μ l et 100 μ l.
- Chromatographe en phase gazeuse couplé au spectrophotomètre de masse
- Hydrodistillateur type clevenger
- Spectrophotomètre UV

B2- Liste de la verrerie

- Béchers (50ml, 100ml, 250ml)
- Erlens Meyer (100ml, 250ml)
- Ballon à fond plat rodé

- Pipettes pasteur, pipettes graduées stériles
- Pincés, anses de platines, lames en verre, lamelles
- Ecouillons et boites de pétri stériles
- Disques d'antibiotiques de 6mm de diamètre
- Spatule en inox
- Lames de rasoir
- Papier filtre Whatman
- Bec Bunsen
- Disques vierges de 9mm de diamètre.

B 3- Milieux de cultures et réactifs utilisés

a. Milieux de culture utilisés

- Gélose Mueller Hinton
- Gélose de Sabouraud.
- Gélose Nutritive
- Eau physiologique stériles

b. Liste des solutions et réactifs utilisés

- Ether de pétrole
- Chloroforme
- Perchlorure ferrique Fe Cl_3
- Méthanol
- Réactif de Stiasny
- Alcool chlorhydrique (Ethanol à 95% + Hcl à 50 %)

-Alcool isoamylique

- Copeaux de Magnésium

-Acide Sulfurique (H₂SO₄)

.NH₄OH

-Réactif de Mayer (Tétra iodo Mercure de Potassium)

Composition : -Chlorure de Mercure 1.36g

-Iodure de Potassium 5g

- Eau distillée 100ml

-Folin Ciocalteu (Acide Phosphotungstique + Acide Phosphomolybdique)

-Carbonate de sodium (Na₂ CO₃)

-Chlorure d'Aluminium (AL CL₃)

-Acétate de Sodium.

-DMSO (diméthyle sulfoxyde).

-DPPH (2-2 Diphényle -1-Picrylhydrazyl, C₁₈H₁₂N₅O₆)

- Vert de méthyle.

-Rouge Congo.

-Acide acétique.

-Eau de javel.

Appareillages et extraits

Les appareils utilisés



Evaporateur rotatif



Etuve



Balance de précision



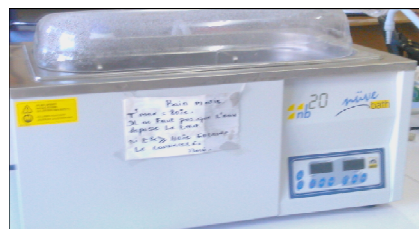
CG/MS



Les extraits secs de *Mentha rotundifolia*



Les cendres de *Mentha rotundifolia*



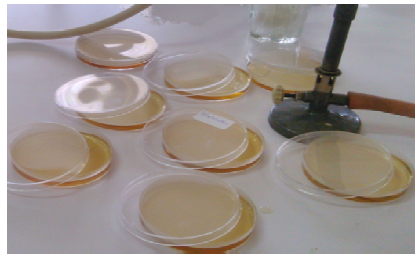
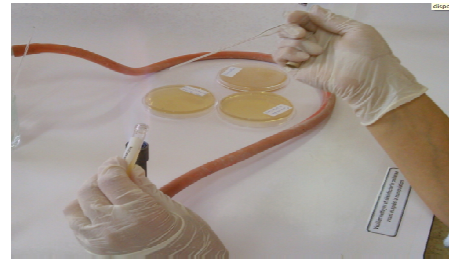
Le bain marie



L'autoclave

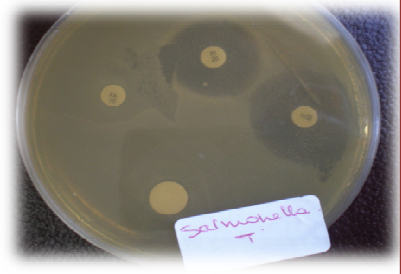
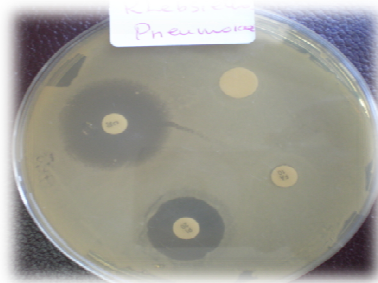
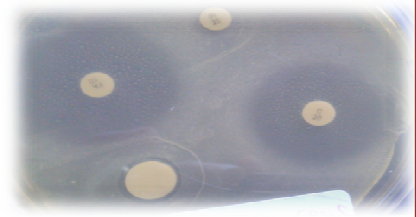
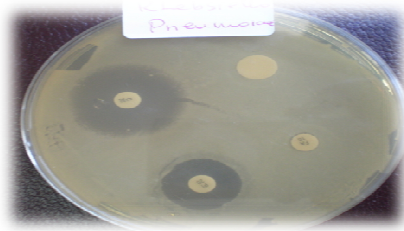
Les étapes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne

Les étapes suivies dans la partie microbiologique



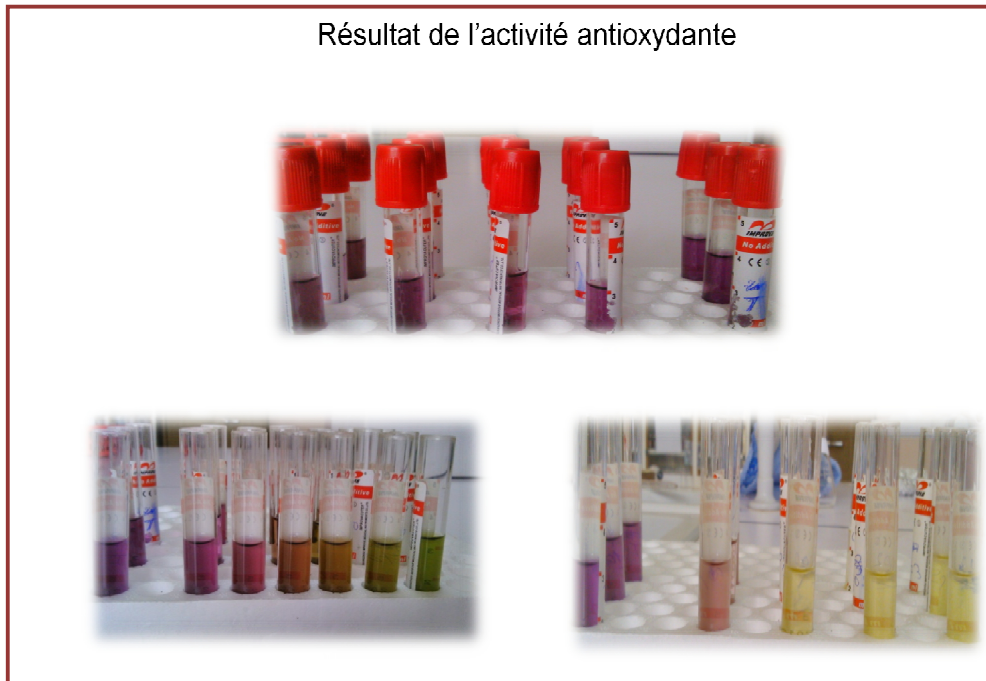
Résultats de l'activité antimicrobienne

Antibiogramme



Résultats de l'activité antiradicallaire

Résultat de l'activité antioxydante



Les résultats du screening phytochimique



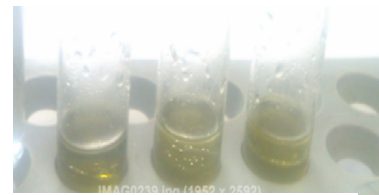
Les tanins galliques (+)



Les saponosides, R(+)



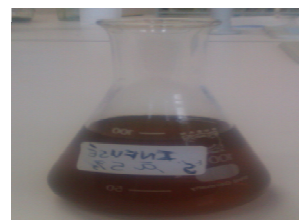
Les dérivés anthracéniques
Combinés, R(+)



Les dérivés anthracéniques
libres, R(-)



Flavonoides (les flavones ,R +)



L'infusé

APPENDICE C

Glossaire

Analgésique: apaise ou supprime la douleur.

Anthocyane: composé hétérocyclique oxygéné lié à deux noyaux benzéniques.

Antispasmodique: cesse les spasmes, contractions involontaires des muscles et des organes,

Analgesique : Synonyme d' antalgique, substance qui previent ou diminue la sensation de douleur.

Addiction : C'est une dépendance à certaines substances (addiction à la caféine ou certaines drogues).

Antithrombotique : Molécule s'opposant à la thrombose.

Anticarcinogène : Synonyme d'anti cancérigène.

Alcane : c'est un hydrocarbure dont la molécule est constituée d'une chaine continue d'atomes de carbone de formule C_nH_{2n+2} .

Bradycardie : C'est u trouble du rythme cardiaque.

Concrète : Produits et extraits pâteux obtenus à partir d'une matière première fraîche.

Chemotype : C'est les constituants biochimiques majoritaires ou caractéristiques présents dans une huile essentielle.

Collutoire : C'est une préparation médicamenteuse d'appoint qui doit être appliquée dans la bouche.

Gastro-entérite : C'est une inflammation de la muqueuse de l'estomac, du colon et de l'intestin grêle.

Laxatif : C'est un médicament préconisé dans le cas de constipation passagère ou chronique.

Miscible : Désigne usuellement la capacité de divers liquides de se mélanger et former des substances homogènes.

Monographie : C'est des traités ou livres qui développent des programmes de collectes systématiques.

Sédatif : C'est une substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central et entraîne un apaisement et une relaxation.

Sessile : Organes qui se fixent directement sur le corps d'un organisme sans éléments intermédiaires. :

Saprophyte : Végétal ou microorganisme vivant au dépens des matières organiques inertes.

Stérol : alcool secondaire de structure tétracyclique caractéristique formé à partir de cyclopentane et du phénanthrène hydrogéné.

Sesquiterpène : constituant à quinze atomes de carbone.

Saponine : substance hétérosidique moussante agissant sur la perméabilité des membranes.

Transdermique : C'est un moyen de diffusion d'un médicament au travers de la peau.

Trichomes : C'est des poils qui tapissent la surface d'un organe végétal.

Vasodilatateur : C'est l'augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins par dilatation des fibres musculaires.

APPENDICE D

Etude statistique

F1- Activité antioxydante de *Mentha rotundifolia* L.

1- Statistique descriptive

Extrait	valeurs Moyennes	valeurs N	valeurs Ec-Type
meoh	0,058533	3	0,000115
HE	1,421000	3	0,001000
rutine	0,161000	3	0,000000
quercetine	0,003950	3	0,000036
TsGrpes	0,411121	12	0,611821

2- Test de Kruskal-Wallis (non paramétrique)

Depend.: Valeurs	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Valeurs (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Extrait Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =,0156		
	Code	Valid N	Sum of Ranks
Ext MeOH	1	3	15,00000
HE	2	3	33,00000
Rutine	3	3	24,00000
Quercétine	4	3	6,00000

Dependent: Valeurs	Median Test, Overall Median = ,109715; Valeurs (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Extrait(<i>Mentha rotundifolia</i> L.) Chi-Square = 12,00000 df = 3 p = ,0074				
	Ext MeOH	HE	Rutine	Quercétine	Total
<= Median: observed	3,00000	0,00000	0,00000	3,00000	6,00000
expected	1,50000	1,50000	1,50000	1,50000	
obs.-exp.	1,50000	-1,50000	-1,50000	1,50000	
> Median: observed	0,00000	3,00000	3,00000	0,00000	6,00000
expected	1,50000	1,50000	1,50000	1,50000	
obs.-exp.	-1,50000	1,50000	1,50000	-1,50000	
Total: observec	3,00000	3,00000	3,00000	3,00000	12,00000

Depend.: Valeurs	Multiple Comparisons p values (2-tailed); Valeurs (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Extrait(<i>Mentha rotundifolia</i> L.) Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =,0156			
	Ext MeOH	HE	Rutine	Quercétine
Ext MeOH	R:5,0000	R:11,000	R:8,0000	R:2,0000
HE		0,249240	1,000000	1,000000
Rutine	0,249240		1,000000	0,013407
Quercétine	1,000000	1,000000		0,249240
	1,000000	0,013407	0,249240	

Depend.: Valeurs	Multiple Comparisons z' values; Valeurs (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Extrait(<i>Mentha rotundifolia</i> L.) Kruskal-Wallis test: H (3, N= 12) =10,38462 p =,0156			
	Ext MeOH	HE	Rutine	Quercétine
Ext MeOH	R:5,0000	R:11,000	R:8,0000	R:2,0000
HE		2,038099	1,019049	1,019049
Rutine	2,038099		1,019049	3,057148
Quercétine	1,019049	1,019049		2,038099
	1,019049	3,057148	2,038099	

F2 - Activité antimicrobienne

Statistiques descriptives

Variable	Statistiques Descriptives (act antimicrobienne)				
	N Actifs	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
Souches	54	106,1667	101,0000	111,0000	3,750472
Extraits	54	2,0000	1,0000	3,0000	0,824163
Valeurs, diametres (mm)	54	19,4900	6,0000	27,5400	6,495798