



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCCEN
Faculté des Sciences - Département de Chimie
Laboratoire des substances naturelles, et molécules bioactives
(LASNABIO)



Mémoire

En vue de l'obtention du MASTER EN CHIMIE
Option: Molécules Bioactives, Synthèse et Application

Thème

**CARACTERISATION CHIMIQUE ET ACTIVITES
BIOLOGIQUES DES VOLATILS DE *Mentha aquatica*L.
(DOMRANE) DE L'OUEST ALGERIEN**

Présenté par : ***Melle Fatima Zahra BENOMARI***

Soutenu le 27/05/14 devant le comité du jury composé de :

Présidents	Boufeldja TABTI	Professeur	Université de Tlemcen
	Saïd GHALEM	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs	Hocine ALLALI	Professeur	Université de Tlemcen
	Mourad BENDAHOU	Professeur	Université de Tlemcen
	Meriem MERAD	MCA	Université de Tlemcen
	Nouria MERAD	MCA	Université de Tlemcen
	Mohamed El AmineDIB	MCA	Université de Tlemcen
Invité	Alain MUSELLI	Dr.HDR	Université de Corse (France)

Sous l'encadrement du : Dr.Nassim DJABOU

Année Universitaire **2013/2014**

REMERCIEMENTS

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage, la patience et la foi qui nous a donné pour mener à bien ce travail.

Ce travail est le fruit de nombreuses collaborations pluridisciplinaires, il se situe à la frontière entre la chimie et la biologie ayant une finalité thérapeutique. Mes chaleureux remerciements à toutes les personnes qui ont soutenus ce mémoire.

*Le présent travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO), pour cela je tiens à remercier son directeur **Pr. Saïd GHALEM** ainsi que le chef de l'équipe des huiles essentielles le **Pr. Boufeldja TABTI** pour toute l'aide et les conseils qui nous ont apportés.*

*Ce mémoire a été réalisé sous l'encadrement du **Dr. Nassim DJABOU**. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour avoir encadré et veillé au bon déroulement de ce travail. Merci d'avoir toujours été disponible et pour m'avoir guidé par vos conseils et orientations. Merci infiniment pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit*

*J'exprime ma profonde reconnaissance au responsable du Master MBSA le **Dr. Mohamed el Amine DIB** de m'avoir accueilli dans ce Master. Si ce travail est présentable aujourd'hui, c'est grâce à ses efforts inlassables, et surtout à son aide et sa disponibilité*

*J'adresse également mes sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN) de l'Université de Corse (France) et plus particulièrement à son directeur le **Pr. Jean COSTA**, ainsi qu'au **Dr. Alain MUSELLI** qui nous a aidés à réaliser les analyses chromatographiques.*

*J'exprime mes sincères remerciements au **Pr. Mourad BENDAHOU**, membre du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) ainsi qu' son doctorant **Mr. Abd el Mounaim KHADIR** pour la réalisation des tests des activités antimicrobiennes.*

*Je veux aussi remercier les membres du Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels et son directeur le **Pr. Nouri BENABADJI** pour l'identification botanique de la plante.*

*Mes vifs remerciements vont également aux : **Pr. Saïd GHALEM, Pr. Boufeldja TABTI, Dr. Meriem MERAD, Dr. Nouria MERAD, Pr .Hocine ALLALI, Pr. Mourad BENDAHOU, Dr. Mohamed el Amine DIB** et notre invité le **Dr. Alain MUSELI** pour avoir acceptés de faire partie de mon jury de soutenance.*

*Je remercie vivement **Dr. Nawel MELIANI** et **Mme. Leila TABTI** pour l'aide qu'elles nous ont apportée pour la réalisation des activités antioxydantes et antifongique in-vivo.*

*Un grand merci à tous les collègues de la promotion du Master MBSA, et plus particulièrement à mes amis **Rania** et **Ali**. Je vous remercie tout simplement d'être vous-même et pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble, ainsi que l'ambiance particulière qui nous a aidés à bien mener le cheminement de notre travail. Merci infiniment.*

Qui me soit permis d'exprimer ma gratitude à mes chers parents qui m'ont soutenue et qui étaient présent avec moi a tout moment, je vous remercie pour votre patience votre bienveillance et vos prières qui m'ont aidée à réaliser ce travail. Je ne peux oublier mon entourage, famille et amis pour leur travail invisible dans cette longue tache ainsi qu'à tout les gens que j'aime et qui m'aiment.

Dédicaces

A mes chers parents

De m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mon parcours

De m'avoir laissé libre dans mes choix

D'avoir prié pour moi

A mes frères

Ryad

Adel (Adilou)

A ma sœur Asma

A mon beau frère

A mon neveu Djawed et ma perle Ibtihel

A mes grands-parents (Rebiykhelikoumlina)

A mes oncles et cousins

A mes chères amies :

Sarah (la maman), Zoubyda (zouzou), Sarah (Sarita)

LISTES DES FIGURES

- Figure 1** : Aire de répartitions de la menthe par le monde
- Figure 2**: Representation shematique et photo de la Menthe aquatique
- Figure 3** : Montages d' Hydrodiffusion et Entrainement à la vapeur d'eau
- Figure 4** : Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger
- Figure 5** : Identification des constituants de mélanges complexes de volatils par combinaison les techniques CPG et CPG/SM.
- Figure 6** : Analyses complémentaires mises en œuvre pour l'identification des constituants d'une huile essentielle.
- Figure 7** : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *M. aquatica*.
- Figure 8** : Révélation de l'activité antioxydante par CCM.
- Figure 9** : Pourcentage d'inhibition H.E
- Figure 10** : Pourcentage d'inhibition BHT
- Figure 11** : Pourcentage d'inhibition hydrolat
- Figure 12** : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP
- Figure 13** : Résultats du test de la méthode de FRAP
- Figure 14** : Effet inhibiteur de l'H.E, l'H.Y, et les fractions oxygénées sur différentes souche.
- Figure 15** : Oranges contaminés avec les souches (B, C, E, I) non traités par l'hydrolat (témoins)
- Figure 16** : Oranges traités par l'hydrolat et contaminés par les souches (B, C, E, I) maintenus pendant 15 jours à la température de 25°C.
- Figure 17** : Situations géographique des sites étudiés de la wilaya de Tlemcen.
- Figure 18**: Montage Soxhlet
- Figure 19**: Montage d'hydrodistillation type Clevenger
- Figure 20** : Fractionnement de l'huile essentielle par colonne chromatographique
- Figure 21** : Cuve chromathographique
- Figure 22** : Revelateur UV visible.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etude bibliographique de la *Menthe aquatique*

Tableau 2 : Résultats des tests phytochimiques

Tableau 3 : Stations de récolte de la *Menthe aquatique* L.

Tableau 4 : Composition chimique de la *Menthe aquatique* L.

Tableau 5 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* après 30 min

Tableau 6 : Pourcentage d'inhibition de l'hydrolat après 30 minutes

Tableau 7 : Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP.

Tableau 8 : Résultats du test de blanchissement du β -carotène

Tableau 9 : Résultats des activités antimicrobiennes sur l'extrait d'hydrolat, l'huile essentielle et ses fractions de *M. aquatica*.

Table des matières

I.	INTRODUCTION.....	1
II.	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1	LE GENRE MENTHA.....	4
II.1.1	Présentation botanique du genre <i>Mentha</i>	4
II.1.2	Utilisations des menthes dans la pharmacopée traditionnelle :	5
II.2	LA MENTHE AQUATIQUE : <i>Mentha aquatica</i> L.....	6
II.2.1	Introduction.....	6
II.2.2	L'huile essentielle de la <i>Menthe aquatica</i> L :.....	7
II.2.3	Activités biologique des huiles essentielles de la Menthe aquatique :	8
III.	ANALYSES DES MELANGES COMPLEXES DES VOLATILS	9
III.1	LES VOLATILS DES PLANTES :	9
III.2	LES METHODES DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON	10
III.2.1	L'entraînement à la vapeur d'eau :.....	10
III.2.2	L'hydrodiffusion :.....	11
III.2.3	L'hydrodistillation :	11
III.3	LES METHODES D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES MELANGES COMPLEXES DES VOLATILS DES PLANTES.....	12
III.3.1	La Chromatographie Phase Gazeuse CPG :.....	13
III.3.2	Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :..	14
III.3.3	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :.....	14
III.4	Méthodologie d'analyse :	14
IV.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	20
IV.1	RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES :.....	20
IV.2	ETUDE DE LA PARTIE VOLATILE DE <i>M. aquatica</i> :.....	21
IV.2.1	Pourcentage en eau :.....	21
IV.2.2	Préparation de l'échantillon	22
IV.2.3	Analyse des huiles essentielles :.....	23
IV.3	L'hydrolat :.....	25
IV.4	Fractionnement de l'huile essentielle :.....	26
IV.5	ACTIVITES BIOLOGIQUES :.....	27
IV.5.1	Activité anti-radicalaire et antioxydante :.....	28
IV.5.2	Activité antimicrobienne :.....	34
IV.5.3	Tests <i>in-vivo</i> (Activité antifongique):	36
V.	CONCLUSIONS	37
VI.	MATERIELS ET METHODES	1

VI.1	PREPARATION DE L'ECHANTILLON :	1
VI.2	TESTS PHYTOCHIMIQUES :	2
VI.2.1	Préparation de l'échantillon :	2
VI.2.2	Détections des familles présentes dans les extraits :	3
VI.2.3	PROCEDE D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES :	6
VI.2.4	REALISATIONS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES :	9

I. INTRODUCTION

De part sa situation géographique, sa végétation, son climat, son relief et sa structure, la forêt Algérienne est typiquement méditerranéenne. Elle présente une grande affinité avec les autres forêts méditerranéennes notamment dans sa structure et sa dynamique. Sa flore est réputée pour sa diversité et son endémisme. L'étude floristique de l'ouest Algérien reste relativement satisfaisante, et plus particulièrement les Monts de Tlemcen qui dans leurs ensemble offrent des paysages botaniques très diversifiés liés à diverses conditions climatiques, pédologiques et topographiques propres à la région, qui s'étend du littoral aux hauts plateaux de l'Atlas Tellien [1].

La richesse floristique de la région est très appréciable sur le plan quantitatif. La flore de la zone d'étude compte environ 326 espèces soit 11% de la flore Algérienne [2]. Le patrimoine forestier de cette région, à l'instar des autres zones méditerranéennes, nous permis de recenser un grand nombre d'espèces aromatiques susceptibles de fournir une multitude de métabolites secondaires qui rassemblent de nombreuses familles tel que : les alcaloïdes, les saponosides, les polyphénols, les coumarines,...etc., et les huiles essentielles qui font l'objet de notre intérêt.

La problématique générale de notre thème de recherche concerne la caractérisation et la valorisation des substances naturelles d'origine végétale et plus particulièrement celles présentes dans les Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales, (PPAM). Ce secteur connaît dans le monde, mais aussi en Algérie, une nette croissance. Une centaine d'espèces est cultivée mais de nombreuses espèces spontanées sont aussi récoltées en l'absence de mise en culture [3]. Ce secteur concerne majoritairement des marchés tels que la parfumerie, la cosmétique, l'aromathérapie et l'agro-alimentaire spécifiquement la partie volatile de ces plantes qui englobe deux matrices importantes : les Huiles essentielles (HE) et les Hydrolats (HY).

Dans un premier temps on s'est intéressés aux huiles essentielles, qui depuis quelques années, leurs valorisation est devenue un facteur de développement économique. Cependant La diversification de la production des huiles essentielles ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation. Ainsi, l'accès à des données complètes et fiables constitue un des objectifs prioritaires car les substances végétales se présentent, pratiquement toujours, sous forme de mélanges complexes de molécules volatiles, constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées.

La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier leurs valeurs marchandes, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité. Cette analyse nécessite généralement la mise en œuvre de diverses techniques pour l'identification des constituants de ces mélanges complexes : la méthode la plus couramment utilisée est le couplage d'une technique chromatographique (Chromatographie en Phase Gazeuse : CPG) à une technique spectroscopique (en général la Spectrométrie de Masse : SM). Toutefois, la mise en œuvre de techniques d'analyses complémentaires telle que la RMN du Carbone 13, est recommandée pour l'étude de la composition chimique d'une huile essentielle [3].

Le chercheur doit aussi étudier l'activité des plantes médicinales et de leurs extraits et donc, tenter de plus en plus de sélectionner les plantes en fonction de leurs activités biologiques, ensuite se préoccuper de garantir à l'utilisateur une source permanente et suffisante de principes actifs, sans détruire les gîtes naturels productifs. Les huiles essentielles quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Égypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'HE, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'HE étaient les principes actifs qu'on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l'utilisation des huiles essentielles dans l'aromathérapie laisse entrevoir une perspective d'alternative aux médicaments de synthèse [4].

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

- * Fongistatique
- * Insecticide
- * Nématocide
- * Herbicide
- * Bactériostatique
- * Antioxydante

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens.

Notre but était de faire un criblage des genres connus pour leurs richesses en plantes aromatiques, pouvant présenter un intérêt économique, présent dans l'ouest algérien, présentant des plantes endémiques très peu ou pas étudiées. Ainsi nous nous sommes intéressés à un genre qui appartient à la famille des lamiacées qui est le genre des menthes.

D'un point de vue appliqué, nous nous sommes proposé d'étudier la composition chimique des huiles essentielles de menthes poussant à l'état spontané dans la région de Tlemcen. Cette étude, qui prend en compte plusieurs facteurs (aspects botaniques, mode d'extraction, variabilité chimique) est indispensable dans une démarche de diversification de la gamme de produits. Nous nous sommes aussi intéressés aux hydrolats qui font l'objet depuis quelques années d'un intérêt croissant. La caractérisation de cette phase aqueuse chargée en composés hydrosolubles qui est un coproduit de l'huile essentielle s'inscrit aussi dans une démarche de production plus écologique en valorisant une phase jusqu'alors considérée comme un effluent. Pour cela nous avons concentré nos efforts sur une plante aromatique poussant à l'état spontané dans notre région qui est localement abondante et dont la valorisation et encore peu développée ; il s'agit de la *Menthe aquatique* L.

Ainsi nous nous proposons :

- D'extraire les huiles essentielles (HE) et de récupérer l'hydrolat (HY) obtenu par hydrodistillation ;
- De réaliser les analyses par CPG et CPG/SM ;
- Et de fractionner l'huile essentielle à l'aide d'une colonne à gel de silice.
- Parallèlement nous nous proposons une valorisation de ces deux matrices par une étude des activités biologiques sur l'huile essentielle collective, l'extrait d'hydrolat et l'hydrolat et qui vont nous servir comme un appui de base pour la confirmation de la qualité de notre huile essentielle et de l'importance de la composition chimique que procure nos échantillons.

II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 LE GENRE MENTHA :

II.1.1 Présentation botanique du genre *Mentha* :

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, font partie des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *Lamiacées* ou *Labiacées*, formée de près de 3500 espèces réparties sur 8 sous-familles [5]. Près de la moitié (47 %) des *Lamiaceae* sont regroupées dans la sous-famille des *Nepetoideae*. Au sein de la sous-famille des *Nepetoideae*, le genre *Mentha* est représenté par 18 espèces et environ 11 hybrides. L'hybridation intra spécifique est relativement aisée et rend la taxonomie particulièrement délicate [6]. Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans les utilisations thérapeutiques. Elles fortifient tout le système des nerfs, stimulant diffusible et aussi un sédatif diffusible [7].

Sur le plan des principes chimiques, la plupart des espèces de Menthes doivent leurs odeurs et activités à leurs Huiles Essentielles ou Essences de Menthe; ces essences très odoriférantes ont un intérêt industriel important ; elles sont souvent extraites des plantes de la race cultivée avec de bons rendements. La Menthe se rencontre dans presque toutes les régions soit à l'état spontané ou cultivé [7].

Autant les Menthes sont faciles à reconnaître à leurs odeurs tout à fait caractéristiques, autant elles sont difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires, d'origine hybride, qui les relie. Parmi toutes les labiées, les Menthes se reconnaissent, en plus de leurs odeurs spéciales, à leurs fleurs très petites, à leurs corolles presque régulières à quatre lobes presque égaux et leurs quatre étamines également presque égales [8]. On en connaît environ 20 espèces, dont les plus répandues sont la menthe aquatique, qui a pour nom scientifique *Mentha aquatica*, la menthe poivrée, *Mentha piperita*, et la menthe verte, *Mentha spicata*. Ces différentes espèces sont toutes caractérisées par une tige carrée et des feuilles opposées et dentées, très odoriférantes en raison de l'huile essentielle qu'elles contiennent [8]. La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents (**Figure 1**) [6].

thérapeutiques qu'elle possède sont commune car : elle stimule la sécrétion des sucs digestifs, limite les ballonnements et les diarrhées et stimule la sécrétion biliaire, elle est aussi efficace en cas d'inappétence et recommandée en cas de troubles gastriques et de crampes. D'un autre côté, la menthe pouliot agit en tant que produit digestif, carminatif, cholagogue et désinfectant [9].

Quant aux espèces poussant à l'état spontané en Algérie on cite: *M. pulegium*, *M. rotundifolia* et *M. aquatica* qui sont utilisées traditionnellement sous forme de tisane pour stimuler la fatigue, un traitement contre la grippe et le rhume, et aussi comme des pansements pour les maux de dents.

II.2 LA MENTHE AQUATIQUE : *Mentha aquatica* L.

II.2.1 Introduction :

Mantha aquatica L., plus connue sous le nom menthe aquatique est une Plante vivace de 30-80 cm., verte ou rougeâtre, velue-hérissée ou presque glabre, à odeur forte mais agréable ; tiges dressées ou ascendantes ; feuilles toutes assez longuement pétiolées, largement ovales ou ovales-lancéolées, dentées en scie ; fleurs roses ou blanches, en verticilles peu nombreux, tous ou les supérieurs rapprochés en têtes terminales globuleuses ou ovoïdes très obtuses ; calice tubuleux, velu, à nombreuses nervures saillantes, à gorge nue, à 5 dents lancéolées-acuminées ; corolle velue en dedans ; carpelles ovoïdes, verruqueux. Cette plante à l'odeur de berlingot fleurit de juillet à septembre. Comme les autres menthes, l'hybridation est assez fréquente et peut conduire à une variation de certaines caractéristiques botaniques [6].



Figure 2: Représentation shématique et photo de la *Menthe aquatique*

1.1. Utilisation traditionnelle de la Menthe aquatique :

Etant cité que cette plante est très utilisée dans la cuisine algérienne, le traitement à l'aide des plantes traditionnelles a procuré une bonne part à la menthe aquatique en terme d'utilisation sous forme de tisane pour le traitement des: Carminative (ballonnements, météorisme : l'action antiseptique limite les fermentations intestinales)

- ❖ Contre la grippe et le rhume
- ❖ Stomachique (colite spasmodique, crampes digestives, douleurs épigastriques)
- ❖ Relaxante : infusion dans du lait
- ❖ Antiseptique : infusion (voies respiratoires et digestives) ou broyée dans de l'huile et frottée sur les muqueuses du nez.

Elle peut être utilisée aussi comme un analgésique sous forme de compresse et comme un calmant pour les maux de dents (mâcher) [10].

II.2.2 L'huile essentielle de la *Mentha aquatica* L :

Etant considérée comme une plante qui se caractérise par sa teneur importante en huile essentielle ($\geq 1\%$), notre recherche bibliographique nous a permis de recenser 18 travaux décrivant la composition chimique de l'huile essentielle de *M. aquatica*. Les travaux réalisés sur la composition chimique de cette fraction ont montrés que le menthofurane était caractérisé comme la substance active principale avec un pourcentage majoritaire qui dépasse les ($>38\%$) en Italie, Croatie, Allemagne, USA, Iran, Japon, Turquie et en Corse [11-21].

Ce composé est présent à des teneurs plus faibles en Yougoslavie et Hollande ($<20\%$) [22-24]. La composition chimique des échantillons provenant d'Iran, de Tunisie, de Turquie et de Brésil est vraiment remarquable par l'absence totale de Menthofurane ; le 1,8-cinéole (10,3%), l'oxyde de piperiténone (25,7%) et le β -caryophyllène (22,4%) étant les constituants majoritaires [27-29].

Le **Tableau 1** recense toutes les études réalisées sur l'huile essentielles de *Mentha aquatica* dans le monde.

N°	Pays (régions)	Années	Réf.	% Composés majoritaires
1	Italie	1997	[12]	Menthofurane (38,4%), 1,8-Cinéole (16,2%) et Viridiflorol (7,6%)
2		1988	[14]	Menthofurane (55,9%), Terpinèn-4-ol (11,9%) et Limonène (5,3%)
3		1995	[13]	Menthofurane (40,0%), 1,8-Cinéole (21,6%) et Limonène (2%)
4		1986	[15]	Menthofurane (59,7%), Terpinèn-4-ol (13,4%) et 1,8-Cinéole (8,1%)
5		1985	[16]	Menthofurane (50,7%), Terpinèn-4-ol (7,5%) et 1,8-Cinéole (7,3%)
6	Corse	2010	[11]	Menthofurane (50,7%), 1,8-Cinéole (6,0%) et Limonène (5,0%)
7	Japon	1998	[17]	Menthofurane (2,8-45,5%), β -Elémol (6,2-16,3%) et Viridiflorol (4,5-11,4%)
8	Allemagne	1968	[18]	Menthofurane (70,0-89,0%) et 1,8-Cinéole (2,1-7,8%)
9	USA	1973	[19]	Menthofurane (66,4%), 1,8-Cinéole (7,7%) et (E)- β -Caryophyllène (3,5%)
10	Croatie	2001	[20]	Menthofurane (42,8%), 1,8-cinéol (18,4%) et (E)- β -Caryophyllène (11,9)
11	Iran	2008	[21]	1,8-Cinéole (27,2%), Menthofurane (23,2%) et (E)- β -Caryophyllène (12,8%)
12	Yougoslavie	2003	[22]	Menthofurane (16,9%), 1,8-Cinéole (14,2%) et (E)- β -Caryophyllène (9,4%)
13	Hollande	1978	[23]	1,8-Cinéole (23,5%) et Menthofurane (8,1%)
14		1974	[24]	Limonene, Caryophyllène et Germacrène D
15	Brésil	2008	[25]	Menthone (80%) et Pulégone (14,0%)
16	Turquie	2005	[26]	1,8-Cineole (55.3%), Carvacrol (9.3%) et Sabinene (6.7%)
17	Tunisie	2011	[27]	Pulégone (39,4%) et Menthone (27,7%)
18	Iran	2006	[28]	Oxyde de pipériténone (25,7%), (E)- β -Caryophyllène (22,4%) et 1,8-Cinéole (10,3%)
19	Turquie	2012	[29]	menthone, isomenthone, pulégone, menthofurane

Il est à noter qu'aucun travail n'a été réalisé sur *M. aquatica* d'Algérie.

II.2.3 Activités biologique des huiles essentielles de la Menthe aquatique :

II.2.4

De part les avantages que suscite la *Menthe Aquatique* dans le domaine de la médecine traditionnelle, on note la présence de deux travaux (Tunisie, Turquie) qui ont fait l'objet d'études des activités biologiques sur l'huile essentielle de la Menthe aquatique. ces études ont décelés une activité antioxydante importante avec une IC50 similaire à celui du Trolox [27]. Ces mêmes échantillons ont révélés que l'huile essentielle de cette plante possède une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries du genre (*Staphilococcus* *Escherichia coli* et *Bascilus*) et aussi contre des bactéries gram positif [26].

III. ANALYSES DES MELANGES COMPLEXES DES VOLATILS

De façon général le monde du vivant dans le règne végétal est caractérisé par deux types de métabolites : les métabolites primaire type acides nucléique, lipides, protéines acides aminés et carbohydrates ; et les métabolites secondaires qui sont une exclusivité chez les plantes. On classe ces métabolites secondaires suivant leurs poids moléculaire ainsi on distingue deux types : les lourds et les légers.

Les composés lourds sont classés en trois grandes classes : les composés azotés, les terpéniques et les phénoliques. Très souvent la barrière entre les lourds et les légers est dictée par les techniques d'extraction mais aussi et surtout d'analyse. Comme exemple de famille de composés lourds on cite les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les stérols et stéroïdes, les saponines... etc.

Pour ce qui nous concerne nous allons nous intéresser à la deuxième classe des métabolites secondaires, qui est la classe des légers ou aussi appelées les volatils.

III.1 LES VOLATILS DES PLANTES :

Les huiles essentielles et la fraction volatile émise par une plante aromatique constituent des mélanges complexes de volatils qui suscitent un intérêt permanent. La valorisation de ces mélanges passe nécessairement par une étape de caractérisation chimique. Pour cela, il apparaît que l'étape de préparation de l'échantillon est tout aussi fondamentale que celle de l'analyse proprement dite des constituants [30-33], pour plusieurs raisons :

- ces mélanges volatils sont généralement des mélanges complexes constitués majoritairement de molécules terpéniques (mono- et/ou sesquiterpènes et plus rarement des diterpènes), mais aussi de composés non terpéniques (chaînes linéaires, dérivés phénylpropanoïques, etc.) [34]. L'identification de ces molécules nécessite donc des techniques analytiques fiables et efficaces [33].
- la complexité de ces mélanges vient également du fait qu'ils sont constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines de composés présents à des concentrations parfois extrêmement faibles. Classiquement la concentration perceptible pour les molécules odorantes peut être inférieure au nanogramme par litre, en conséquence les procédures analytiques doivent présenter des sensibilités extrêmement élevées [35-36],
- certaines molécules odorantes présentent une instabilité chimique sous l'action de la lumière, de la température, en condition oxydante ou au cours d'une étape de transformation avant commercialisation. Ainsi, à pression atmosphérique le temps de vie d'un monoterpène soumis à une

exposition lumineuse est estimé entre moins de 5 min pour l' α -terpinène à 3 h pour l' α - et le β -pinène [32]. Les procédures de préparation des échantillons doivent être adaptées à la nature des constituants de la matrice à étudier,

- pour les composés volatils générés à partir de sources biologiques, telles que les plantes ou les animaux, des difficultés analytiques surgissent du fait de la nature dynamique de ces systèmes [37]. Le fait que la production et l'émission des composés volatils d'une plante soient affectées par des facteurs comme la lumière, la température, un stress hydrique, une activité enzymatique ou la présence de polluants, introduit des difficultés dans l'analyse.

Conformément à la problématique présentée dans notre introduction, je me propose de suivre les différentes étapes de la séquence analytique, à savoir, (i) l'étape de préparation de l'échantillon avec notamment l'extraction par l'hydrodistillation des huiles essentielles et de l'hydrolat, (ii) l'étape de séparation puis d'identification proprement dite et enfin (iii) l'étape de valorisation au travers d'une approche pluridisciplinaire chimie/activités biologiques qui met en évidence le potentiel antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles analysées.

III.2 LES METHODES DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Les méthodes de préparation des échantillons ont fait l'objet de nombreuses revues qui décrivent les potentialités et les limites des procédures généralement mises en œuvre pour l'étude des composés volatils issus des plantes [32, 38-39]. Nous distinguerons les méthodes d'extraction produisant des matrices liquides telles que les huiles essentielles et les extraits, des méthodes permettant d'échantillonner les analytes dans la phase gazeuse de matrices solides ou liquides. Je me propose de détailler les méthodes produisant des matrices liquides.

III.2.1 L'entraînement à la vapeur d'eau :

C'est l'une des méthodes reconnue par la pharmacopée pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est favorisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique. L'absence de contact

directe entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile essentielle [40].

III.2.2 L'hydrodiffusion :

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau. Dans le cas de l'hydrodiffusion le flux de la vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale [40].

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact la matière végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économisassions d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de la vapeur. La **Figure 3** illustre ces deux techniques.

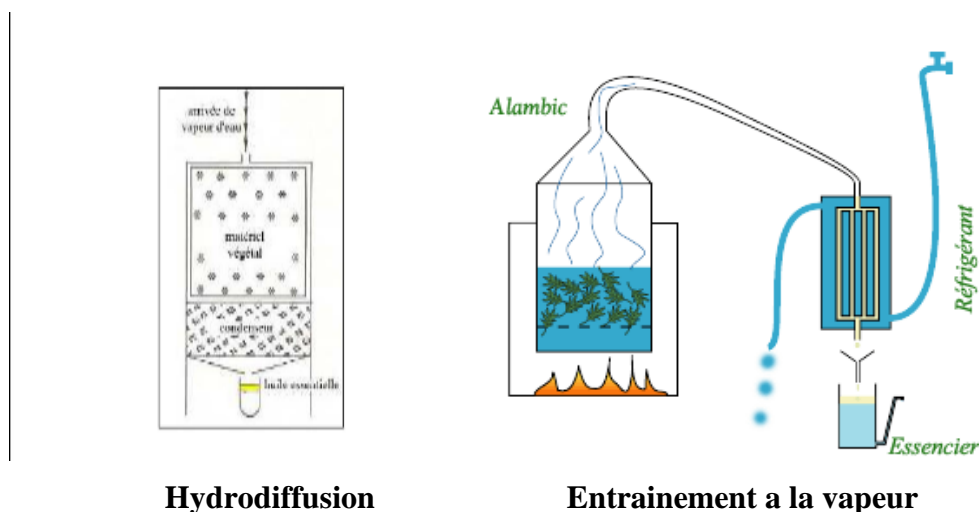


Figure 3 : Montages d' Hydrodiffusion et Entrainement à la vapeur d'eau

III.2.3 L'hydrodistillation :

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle [41], ainsi que pour le contrôle de qualité [42]. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques sont entraînées par la vapeur d'eau créée, forment avec la vapeur d'eau, un mélange azeotropique. Ces vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigèrent et l'huile essentielle se

sépare de l'hydrolat par une simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions) elle surnage au-dessus de l'hydrolat. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. A l'échelle du laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la pharmacopée européenne est le « Clevenger » [43]. Le schéma de l'appareillage utilisé au cours de nos travaux est donné ci-dessous.



Figure 4 : Montage d'un hydrodistillateur type Clevenger

III.3 LES METHODES D'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES MELANGES COMPLEXES DES VOLATILS DES PLANTES :

Les huiles essentielles sont des matières premières pour les secteurs de l'industrie pharmaceutique, de l'agroalimentaire et de la cosmétique. La connaissance parfaite de la composition chimique de ces substances permettrait aux professionnels des secteurs précités de pouvoir contrôler leur qualité et de les valorisées. L'identification des composants d'une huile essentielle reste une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques qui sont dans certains cas complémentaires [44]. La technique incontournable pour individualiser les constituants d'un mélange reste la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Son couplage a un

détecteur à ionisation de flamme (FID) permet la quantification des constituants et le calcul de leurs indices de retentions.

La CPG est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale, généralement la Spectrométrie de Masse (SM) ou la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier. Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN du carbone-13 permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable.

III.3.1 La Chromatographie Phase Gazeuse CPG :

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (SM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60% [45]. En effet, le squelette et surtout la composition élémentaire des constituants organiques influent sur le facteur de réponse. Ainsi des méthodes de quantifications réelles avec étalons interne et externe qui sont quasiment les seuls utilisés aujourd'hui et développées pour répondre aux exigences de la pharmacie, la cosmétique, l'agro-alimentaire et surtout le domaine de la recherche scientifique [45].

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc.).

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention, mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention.

La CPG est préférentiellement utilisée dans le cas des molécules volatiles comme celles qui sont présentes dans les huiles essentielles (mono et sesquiterpènes, certains diterpènes, phénylpropanoïdes, molécules linéaires...).

Bien que la CPG reste l'une des techniques d'analyses les plus utilisées, l'identification des constituants d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet, le temps de rétention, propre à chaque composé qui dépend des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

III.3.2 Couplage Chromatographie Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatiques.

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG/SM en mode impact électronique (IE), dit CPG/SM-(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales [46].

III.3.3 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) :

C'est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. Dans cette optique les données de la littérature constituent une base intéressante permettant la comparaison avec les valeurs des déplacements chimiques du carbone 13 des composés absents de nos bibliothèques de données, mais aussi elles proposent les valeurs de déplacements chimiques de molécules « modèles » à partir desquelles des reconstitutions de spectres sont possibles. Pour le cas des travaux de recherche sur les volatils des plantes, la RMN du carbone 13 est devenue une méthode complémentaire à l'analyse par CPG et CPG/SM.

III.4 Méthodologie d'analyse :

Le Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN) de l'Université de Corse, avec lequel nous avons une collaboration et développant nos travaux en commun, a mis en place une méthodologie d'analyse des volatils considérée comme l'une des plus performante dans le secteur. Ainsi l'identification des constituants d'une huile essentielle ou de la fraction volatile extraite d'une matrice d'origine végétale est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles. Celle-ci est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG/Ir et de la CPG/SM-IE.

Le mélange complexe des volatils (fractionné ou non dans le cas des huiles essentielles) est analysé simultanément par CPG/Ir et CPG/SM-IE. Le calcul des Ir, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG/Ir. L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui, à l'aide d'un logiciel, sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, dont une élaborée au laboratoire et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées (Jennings et Shibamoto [47], Joulain [48,49], Wiley [50-51], Adams [52] et Nist [53]) Afin de rendre performante l'identification, il est préconisé de posséder une bibliothèque riche mais surtout adaptée au domaine d'investigation [31]. La bibliothèque « Arômes » construite au laboratoire, est élaborée à partir de spectres de masse enregistrés dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour l'analyse des mélanges complexes, assurant ainsi une fiabilité accrue dans l'identification. Elle contient actuellement les indices de rétention sur deux colonnes de polarité différentes et les spectres de masse de plus de 1100 composés volatils dont plus de 800 molécules terpéniques. Cette bibliothèque a été constituée à partir de molécules disponibles dans le commerce et elle est enrichie continuellement par des molécules isolées par fractionnement à partir des huiles essentielles ou encore obtenues par hémi-synthèse et dans tous les cas, identifiées par RMN.

Chaque proposition du logiciel de comparaison des spectres de masse est assortie d'une note de concordance qui reflète la validité de la structure proposée. Si la note de concordance est correcte, les indices de rétention du constituant proposé sont comparés à ceux présents dans la bibliothèque élaborée au laboratoire, ou dans les bibliothèques commerciales (Jennings ([47] Joulain [48, 49], Adams [52]) ou encore répertoriés dans la littérature. Toutefois, se limiter à la note de concordance n'est pas suffisant; il faut systématiquement procéder à l'examen du spectre de masse du composé recherché afin d'en tirer les principales informations : masse de l'ion moléculaire, fragmentations caractéristiques ou encore mise en évidence de co-élutions. A ce stade, trois approches différentes (**a**, **b**, et **c**) sont envisagées (**Figures 5 et 6**) :

- (**a**), le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé présent dans la bibliothèque élaborée au laboratoire. L'identification du constituant est réalisée sans ambiguïté. Cette démarche est systématiquement mise en œuvre quelque soit la nature du mélange complexe (huile essentielle, extrait au solvant ou fraction volatile extraite par MEPS).
- (**b**), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé de la bibliothèque du laboratoire mais correspondent à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques commerciales (ou dans la littérature). Dans ce cas nous vérifions, par l'étude des fragmentations principales, si le spectre de masse du produit proposé est bien en accord avec la

structure de ce dernier. Cette approche mécanistique peut être complétée, lorsque cela s'avère possible, soit par une étape d'hémi-synthèse suivie de l'exploitation de l'analyse du composé synthétisé, soit par le recours à la RMN ^{13}C dans le cas de l'analyse d'une huile essentielle

- (c), les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à ceux d'aucun composé d'aucune bibliothèque. Dans ce cas deux stratégies, uniquement envisageables pour l'analyse des constituants d'une huile essentielle, sont imaginables :

- Soit le composé est présent dans les bibliothèques RMN ^{13}C (auquel cas il est identifié sans ambiguïté),

- Soit le composé est absent des bibliothèques RMN ^{13}C , auquel cas nous n'avons d'autre ressource que le schéma classique de purification du constituant dans l'optique d'une étude structurale.

Afin de pallier les limites analytiques du couplage CPG/SM-IE, l'ionisation chimique a été utilisée pour l'identification des constituants des huiles essentielles[54-55] Il s'agit d'un mode d'ionisation plus doux que l'impact électronique dans lequel il est recherché des réactions ions-molécules entre les molécules de l'échantillon en phase gazeuse et les ions d'un plasma obtenus à partir d'un gaz réactant. La réaction plasma/molécule produit des ions positifs ou négatifs qui sont repérés sur des spectres de masse plus simples et surtout plus informatifs que ceux obtenus en IE [56-57]. L'ionisation peut se faire par transfert de proton, réactions d'association ou formation d'adduits, perte ou abstraction d'un hydrure ou échange de charge [58-55]. La contribution à chacune de ces réactions d'ionisation dépend de la nature de la substance à analyser et du gaz réactant.

Le grand avantage de cette technique est sa flexibilité. En effet, en faisant varier les conditions expérimentales, à savoir la nature du gaz réactant, la pression et la température de la source, il est possible d'observer l'ion quasi-moléculaire des molécules [56]. La faible quantité d'énergie transférée lors de l'ionisation limite les fragmentations et permet ainsi une meilleure différenciation des isomères [61-59]. De plus, la sensibilité de l'IC peut être particulièrement affectée par le choix du gaz réactant, phénomène qui peut permettre de résoudre des problèmes de co-élutions observés en CPG/SM-IE lors d'analyse de mélanges complexes [60].

Figure 5 : Identification des constituants de mélanges complexes de volatils par combinaison les techniques CPG et CPG/SM

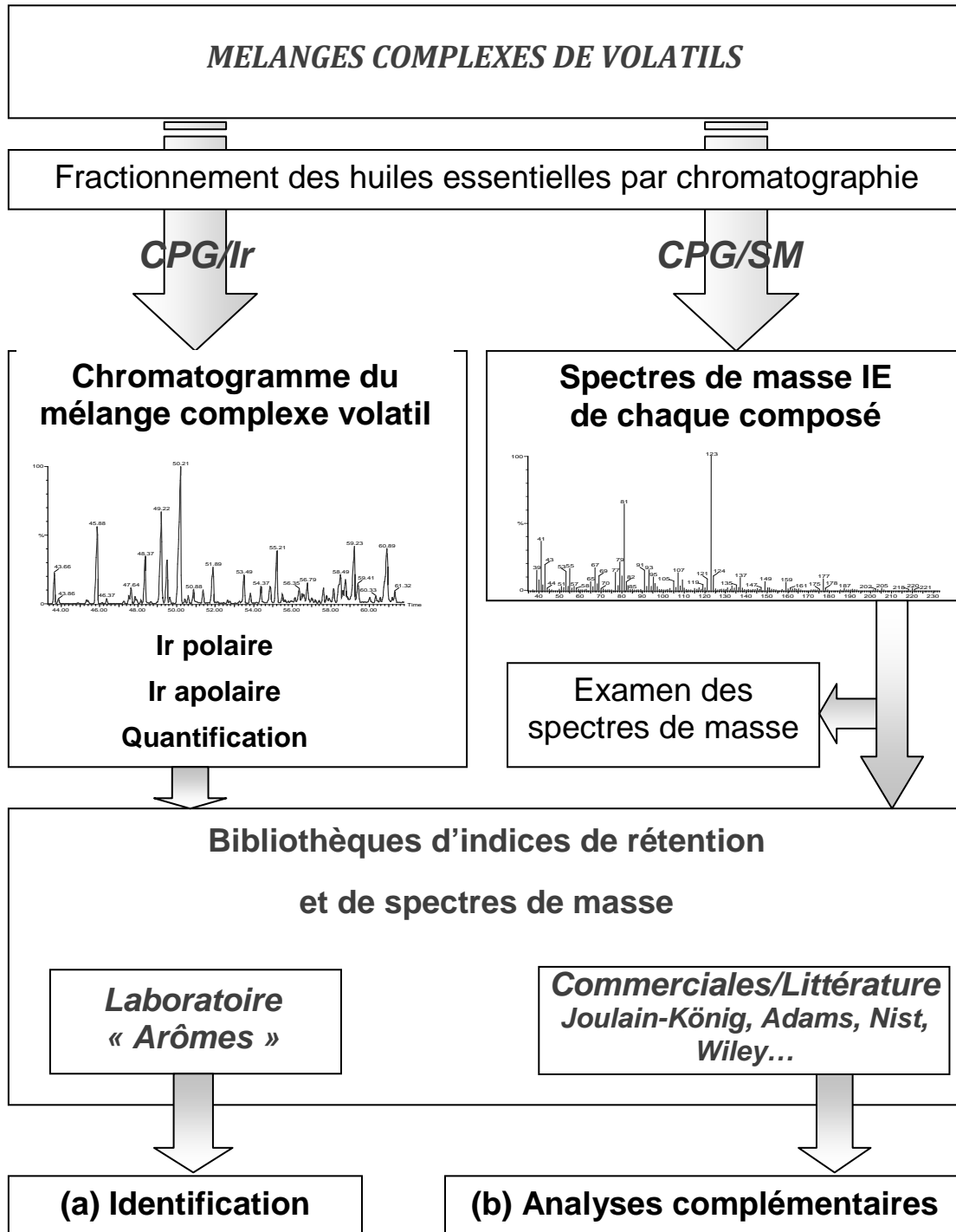
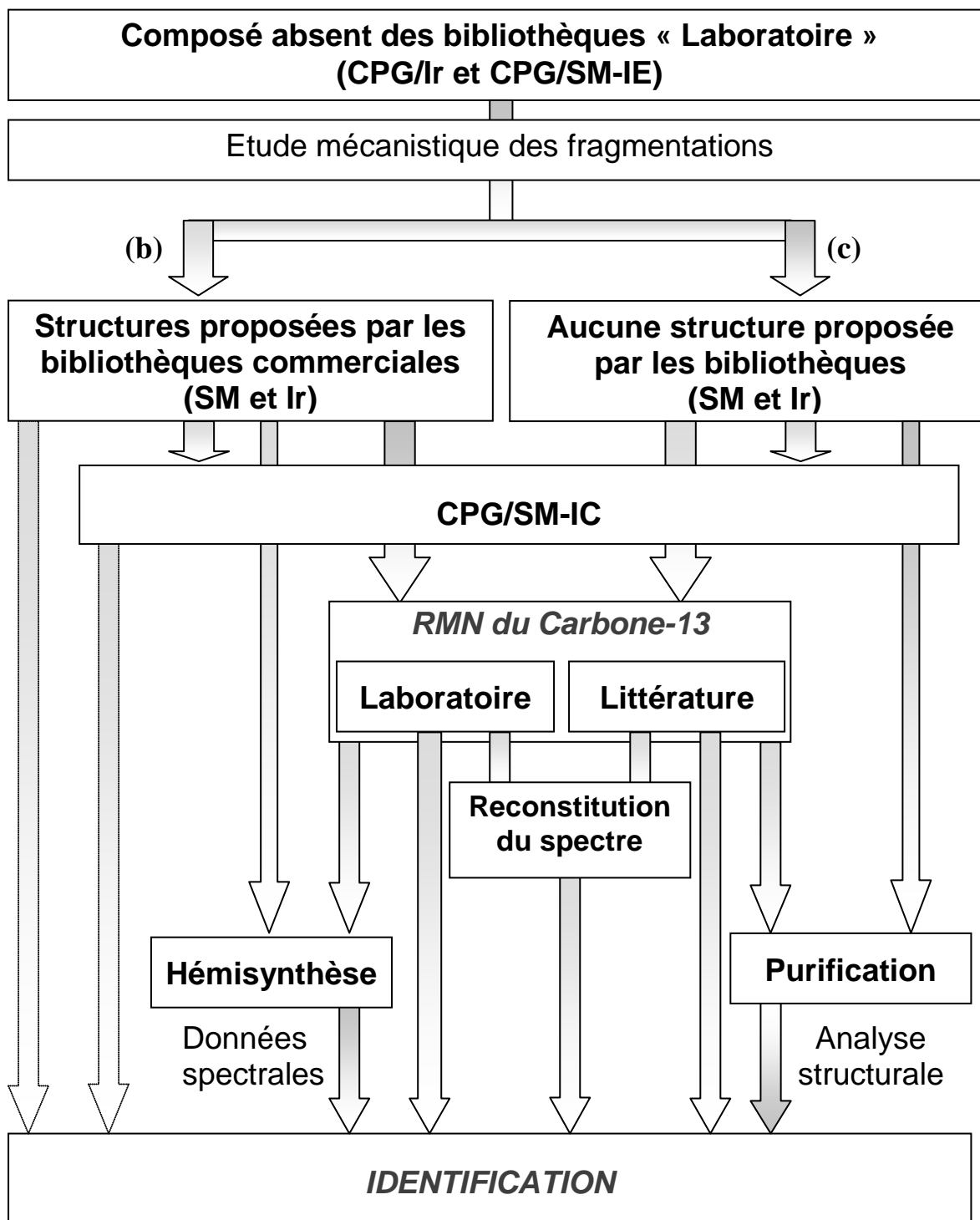


Figure 6 : Analyses complémentaires mises en œuvre pour l'identification des constituants d'une huile essentielle.



C'est cette méthodologie que nous avons utilisée pour l'analyse des huiles essentielles et hydrolat de *Mentha aquatica*. Du fait de la simplicité des mélanges volatiles issus des huiles essentielles et l'hydrolat de notre menthe, nous avons pratiquement eu recours uniquement à l'analyse « de routine » qui est généralement réalisée pour l'étude des mélanges de volatils dont l'identification des constituants ne présente pas de difficultés majeures. Elle est réalisée conjointement par CPG et CPG/SM sans fractionnement sur colonne pour les huiles essentielles. L'identification des constituants du mélange est réalisée, pour la plupart d'entre eux, à partir des données spectrales présentes dans la bibliothèque d'indices de rétention et de spectres de masses « Arômes » construite au laboratoire. Le plus souvent cette méthode est plus dédiée au suivi de la qualité des huiles essentielles commerciales.

L'analyse par combinaison des techniques associe le pouvoir de séparation des techniques chromatographiques (CLC, CPG) à la puissance d'identification des techniques spectroscopiques (SM et RMN) dans le but d'optimiser la performance de notre méthodologie d'analyse. Cette combinaison est généralement mise en œuvre pour l'analyse des huiles essentielles dont l'identification des constituants est difficile, notamment lorsque les limites d'identification de la bibliothèque du laboratoire sont atteintes.

Pour ce qui nous concerne nous avons procédé à un fractionnement de notre huile essentielle spécialement pour réaliser les activités biologiques sur nos fractions. Ce procédé s'appelle un fractionnement bio-guidé.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1 RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES :

Avant d'étudier la partie volatile de *M. aquatica*, nous avons procédé aux tests phytochimiques afin d'avoir une idée globale sur les différents métabolites secondaires présents dans cette plante.

Le but final de l'étude des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante. De ce point de vue, les techniques générales de screening phytochimique peuvent être d'un grand secours. Ces techniques permettent de détecter, dans la plante, la présence des produits appartenant à des classes de composés physiologiquement actifs. Le nombre de ces classes est important et il est difficile de vérifier la présence de chacune. Il faut choisir les classes reconnues comme les plus actives mais aussi les plus faciles à détecter compte tenu des ressources techniques disponibles.

Parmi les méthodes les plus utilisées par les chercheurs, il est retrouvé dans la littérature :

- La C.C.M: chromatographie sur couche mince.
- La Spectrophotométrie aux rayons ultra-violets

Le screening phytochimique de la *Menthe aquatique* a été effectué sur différents extraits en utilisant des solvants à polarités différentes (Ethanol, Hexane, et Eau) et cela a pour but d'extraire la totalité des métabolites secondaires dans une plante. L'extraction a été réalisée à l'aide d'un montage de Soxhlet jusqu'à épuisement de la matière végétale. Les résultats sont regroupés dans le suivant.

Tableau 2 : Résultats des tests phytochimiques

Solvant	Eau	Hexane	Ethanol
Familles			
Alcaloïdes	/	/	+
Alcaloïdes sels	-	/	/
Flavonoïdes	-	/	-
Tanins	+++	/	+++
Composés réducteurs	-	/	-
Coumarine	+++		+++
Anthocyane	+	/	+
Stérol et stéroïdes	+++	/	++
Amidon	-	/	/
Huile essentielle	/	+	/
Acides gras	/	+	/

/ : Non testé

- : absence

+ : présence en faible quantité

++ : Présence en quantité moyenne

+++ : présence a une quantité importante

Ces résultats ont permis de mettre en évidence que :

- La plante à une teneur importante en stérols et stéroïdes, tanins et coumarine.
- Les anthocyanes ont aussi marqués leurs présences dans les deux extraits testés (éthanolique et aqueux).
- L'utilisation de l'extrait hexanique dans ces tests a mis en évidence la présence d'acides gras ainsi qu'un résidu arôme indiquant la présence de molécule volatiles.

IV.2 ETUDE DE LA PARTIE VOLATILE DE *M. aquatica* :

IV.2.1 Pourcentage en eau :

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour ce fait, nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans les parties aériennes sèches de notre plante. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'abri de la lumière. Les résultats de cette analyse ont révélé un taux de 79,39%, ce qui offre à la plante un caractère humide très puissant.

IV.2.2 Préparation de l'échantillon

De nombreux travaux ont montrés l'importance des opérations de broyage et de laminage en prétraitement de la distillation ou de l'extraction des composés volatils, ces opérations de destruction du tissu cellulaire de la matière végétale, permettent une meilleure diffusion du solvant au sein de celle-ci et l'accroissement de la vitesse d'extraction.

L'hydrodistillation est conduite pendant 3h, elle s'opère sur la partie aérienne de la *M. aquatica*, à l'aide d'un montage de type « Clevenger », dont les conditions opératoires ont été décrites dans le chapitre C. Le tableau 3 regroupe les informations liées au site de récolte, à la date de récolte ainsi qu'aux rendements de l'hydrodistillation.

Tableau 3 : Stations de récolte de la *Menthe aquatique* L.

Numéros	Zones (stations)	Dates des récoltes	Masse de la plante(g)	Rendements %
1 S1	Ain el houte	29/10/2013	248	0,3724
2 S2	El attar 1	29/10/2013	550,52	0,3813
3 S2 Feuilles	El attar 1	29/10/2013	272,97	0,7940
4 S2 Tiges	El attar 1	29/10/2013	133	0,1094
14 S3 Feuille	El attar 2	29/10/2013	400	1,4937
5 S4	Ain el kebira	05/11/2013	426	0,1160
6 S5	Sefssif	09/11/2013	716,93	0,1657
7 S6	Ain yousef (Boukra)	09/11/2013	610,24	0,0891
8 S7	Ouzidane	14/11/2013	433	0,1180
9 S8	Benimester	14/11/2013	640	0,1164
10 S9	Bouhlou	12/11/2013	391	0,4625
11 S10	Remchi	13/11/2013	519	0,0852
12 S11	Ouled mimoune	16/11/2013	119	0,3719
13 S12	Ouzidene 2	16/12/2013	300	0,7112
15 S13	Sefssif 2	23/12/2013	300	0,3713
16 S14	Ain kebira 2	02/01/2014	410	0,2366
17 S15	Beni snous	04/01/2014	320	0,1999
18 S16	Ain fezza	06/01/2014	260	0,5381
19 S17	Henaya (Sekak)	12/04/2014	188	0,0923
20 S18	Ouziden (Tihamamit1)	08/04/2014	118	0,2790
21 S19	Ouziden (Tihamamit2)	18/04/2014	202	0,4222
22 S20	Remchi (Ain bendimred)	27/04/2014	178	0,1889
23 S21	Chetouane	20/04/2014	248	0,3009

L'huile essentielle a été caractérisée par une couleur jaune, avec un rendement compris entre 0.0852 à 1,4937%. A noter que le rendement par type d'organe (Station El Attar 1 et 2) montre que les feuilles sont plus riches en H.E que les tiges.

Nous pouvons déjà observer une différence significative entre les rendements d'extraction de la plante étudiée issus des différentes stations.

Le rendement le plus élevée a été obtenue de la station d'EL WERRITE avec une valeur de 1,4937%.

Les différences existantes entre les rendements d'extraction obtenus pour les espèces poussant dans la région de Tlemcen peuvent être liées aux facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique), géographiques (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et génétiques (croisement naturels).

IV.2.3 Analyse des huiles essentielles :

Les échantillons des huiles essentielles collectées ont été analysés par CPG-Ir et CPG/SM-IE selon la séquence habituelle, au Laboratoire de produits Naturelles (CPN) de Corse sous la direction conjointe du Pr. Jean COSTA et Dr. Alain MUSELLI. La méthodologie du laboratoire est basée sur l'utilisation combinée de ces deux techniques complémentaires pour la quantification et l'identification des composés dans divers bibliothèques.

L'analyse préliminaire de 17 des 21 échantillons d'huile de *M. aquatica* d'Algérie a montrée des profils chromatographiques qualitativement similaires mais avec une différence dans l'abondance de leurs principaux composants. Par conséquent, afin de procéder à une analyse détaillée et plus précise, tous les échantillons des différents stations ont été regroupés en une « huile collective » appelé H.Ecoll, et analysée par CPG et CPG/SM. L'identification des différents constituants a été faite :

(i) Sur la comparaison de leurs indices de rétention en CPG (IR) sur les colonnes non polaires et polaires (Rtx1 et RtxWax), avec ceux de composés authentiques présents soit dans la bibliothèque du laboratoire CPN (la banque Arome) soit avec les données de la littératures [69].

(ii) Sur la comparaison entre les différents spectres de masse des composés authentiques présents soit dans la bibliothèque du laboratoire CPN (la banque Arome) soit avec les données de la littératures [70].

Les résultats de l'identification des constituants de notre huile essentielle, sont présentés dans le (**Tableau 4**). Ce dernier regroupe les données expérimentales suivant :

- ✓ Le nom de la molécule identifiée.
- ✓ Les indices de rétentions expérimentales et ceux de référence.
- ✓ Les concentrations relatives des différentes molécules exprimées en %.
- ✓ La méthode d'identification.

Tableau4 : composition chimique de la *Menthe aquatique* L.

N°	Noms	IR apol litt	IR apol	IR pol	% HE Coll	Identifications
1	Butyrate d'Ethyl-2-méthyle	829	829	1010	0,1	RI, MS
2	α-Thujène	922	919	1020	0,1	RI, MS
3	α-Pinène	931	927	1019	0,1	RI, MS
4	Oct-1-en-3-ol	959	957	1440	0,3	RI, MS
5	Sabinène	964	961	1120	1,2	RI, MS
6	Myrcène	976	976	1150	0,8	RI, MS
7	Acétate de 1-Hépt-3-ényle	990	993	1280	0,3	RI, MS Ref.
8	α-Terpinène	1008	1005	1171	0,4	RI, MS
9	p-Cymène	1011	1008	1262	0,2	RI, MS
10	Limonène	1020	1018	1199	1,7	RI, MS
11	(Z)-β-Ocimène	1024	1027	1225	tr	RI, MS
12	γ-Terpinène	1047	1050	1237	1,6	RI, MS
13	Terpinolène	1078	1075	1273	0,5	RI, MS
14	Linalol	1081	1080	1540	0,6	RI, MS
15	Acétate de 1-Oct-3-ényle	1090	1091	1372	5,6	RI, MS
16	Trans-p-Mentha-2,8-diène-1-ol	1105	1101	1611	0,4	RI, MS
17	Cis-p-Mentha-2,8-diène-1-ol	1115	1113	1628	0,3	RI, MS
18	Terpinèn-4-ol	1161	1160	1587	2,7	RI, MS
19	α-Terpinéol	1179	1172	1689	5,3	RI, MS
20	Décanal	1185	1197	1487	0,1	RI, MS
21	Acétate de 1-None-3-ényle	1186	1188	1475	0,3	RI, MS Ref.
22	Carvone	1219	1216	1715	4,5	RI, MS
23	Isovalérate de cis-3-Hexényle	1222	1225	1467	0,3	RI, MS
24	Acétate de néo-Menthyle	1264	1259	1522	0,4	RI, MS
25	Acétate de Menthyle	1278	1276	1859	0,2	RI, MS
26	Trans-p-Mentha-2-ène-1,6-diol	1284	1282	2171	0,2	RI, MS
27	Acétate d'α-Terpinyle	1336	1338	1684	52,1	RI, MS
28	α-Copaène	1379	1374	1486	0,7	RI, MS
29	β- Bourbonène	1385	1382	1512	1,2	RI, MS
30	(E)-β-Caryophyllène	1424	1416	1587	1,8	RI, MS
31	Germacrène D	1480	1475	1699	1,8	RI, MS
32	β- Curcumène	1509	1514	1721	0,6	RI, MS
33	7-dihydro-7-acétoxy-Carvone	1529	1532	2233	5,1	RI, MS
34	oxyde de caryophyllène	1576	1581	1960	0,7	RI, MS
	% identification totale				92,2	
	% monoterpène hydrocarboné				6,6	
	% sesquiterpène hydrocarboné				6,1	
	%monoterpène oxygénés				66,7	
	%sesquiterpène oxygénés				5,8	
	%non terpénique oxygénés				7,0	

L'analyse de l'échantillon de l'huile collective de *M. aquatica* par CPG et CPG/SM a permis l'identification de 34 composés représentant 92,2 % de la composition totale de l'huile essentielle. Tous les composés ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention et leurs spectres de masse SM-IE avec ceux dans la bibliothèque de laboratoire à l'exception de deux composés (Acétate de 1-Hépt-3-ényle et Acétate de 1-None-3-ényle) identifiés en comparant leurs spectres de masse SM-IE et leurs indices de rétention apolaires avec ceux des banques commerciales. Les composés majoritaires sont : l'acétate de l' α -terpinyle (52,03%), l'Acétate de 1-Oct-3-ényle (5,6%), l' α -Terpinéol (5,3%), le 7-dihydro-7-acétoxy-Carvone (5,1%) et la carvone (4,5%). L'huile est caractérisée par une forte teneur en composés oxygénés (79,5) spécialement des monoterpènes oxygénés (66,7%), mais aussi et surtout par une forte teneur en ester linéaire (59,3%) ce qui lui donne son odeur très agréable et ainsi une forte possibilité d'utilisation dans le domaine de la cosmétique.

L'analyse de l'huile essentielle de la *Menthe aquatique* d'Algérie a surtout révélée contrairement aux compositions chimiques des huiles essentielles données précédemment dans la partie bibliographique, l'absence totale du menthofurane ce qu'il lui vaut d'être classé parmi les rares huiles essentielles de *M. aquatica* originales par l'absence totale de ce composé, comme celle originaire de la Hollande, Brésil, Turquie, Tunisie et Iran.

Sur la base de ces résultats nous pouvons conclure que l'huile essentielle de *M. aquatica* d'Algérie présente une originalité par rapport aux autres huiles de la même espèce, mais surtout elle peut être considérée comme un nouveau chémotype d'huile vu que c'est le premier report de l'acétate de l' α -terpinyle comme composé majoritaire dans cette espèce.

IV.3 L'hydrolat :

À l'issu du processus d'extraction de l'huile essentielle de la *Menthe aquatique* par hydrodistillation, 400 ml d'hydrolat ont été récupérés. Pour extraire les composés volatils, des extractions liquide-liquide successives avec de l'éther diéthylique ont été effectuées. Après évaporation du solvant sous pression réduite, 0,9937g d'extrait d'hydrolat concentré ont été récupérés ce qui correspond à une concentration de 0,3974 g /L par rapport au volume de départ. L'hydrolat possède une odeur très forte avec un aspect huileux très visqueux. L'analyse de la composition chimique de cette fraction est en cours. En parallèle une série d'étude des activités biologiques (antioxydantes et antibactériennes) ont été réalisées.

IV.4 Fractionnement de l'huile essentielle :

Dans le cadre de la réalisation des perspectives visées au cours de ce mémoire, l'approche complémentaire qui permet de lier le domaine de la biologie à la chimie a été développée. Ainsi la valorisation des composés volatils en déterminant leurs pouvoirs actifs biologiques relativement associé à l'activité antioxydante et antimicrobienne a été mise en évidence.

Vu les rendements important en huile essentielle et vu que c'est la première fois qu'on reporte l'acétate de l' α -terpinyle comme composé majoritaire dans l'huile essentielle de *M. aquatica* nous avons choisi de réaliser un fractionnement bio-guidé de cette huile, ainsi le but était de concentrer ce composé dans une fraction avec les autres ester et de réaliser les différents tests d'activités dessus. A noter qu'en parallèle nous avons aussi réalisé ces mêmes testes sur l'huile collective.

Concernant cette étape nous avons soumis 3g d'huile essentielle à un fractionnement bio-guidé sur colonne a gel de silice fine (63-200 μ m), treize fractions ont été obtenus (**Figure 7**). Le rendement de la colonne est de 98%

A noter que ces différentes fractions seront valorisées spécialement par les activités antibactériennes.

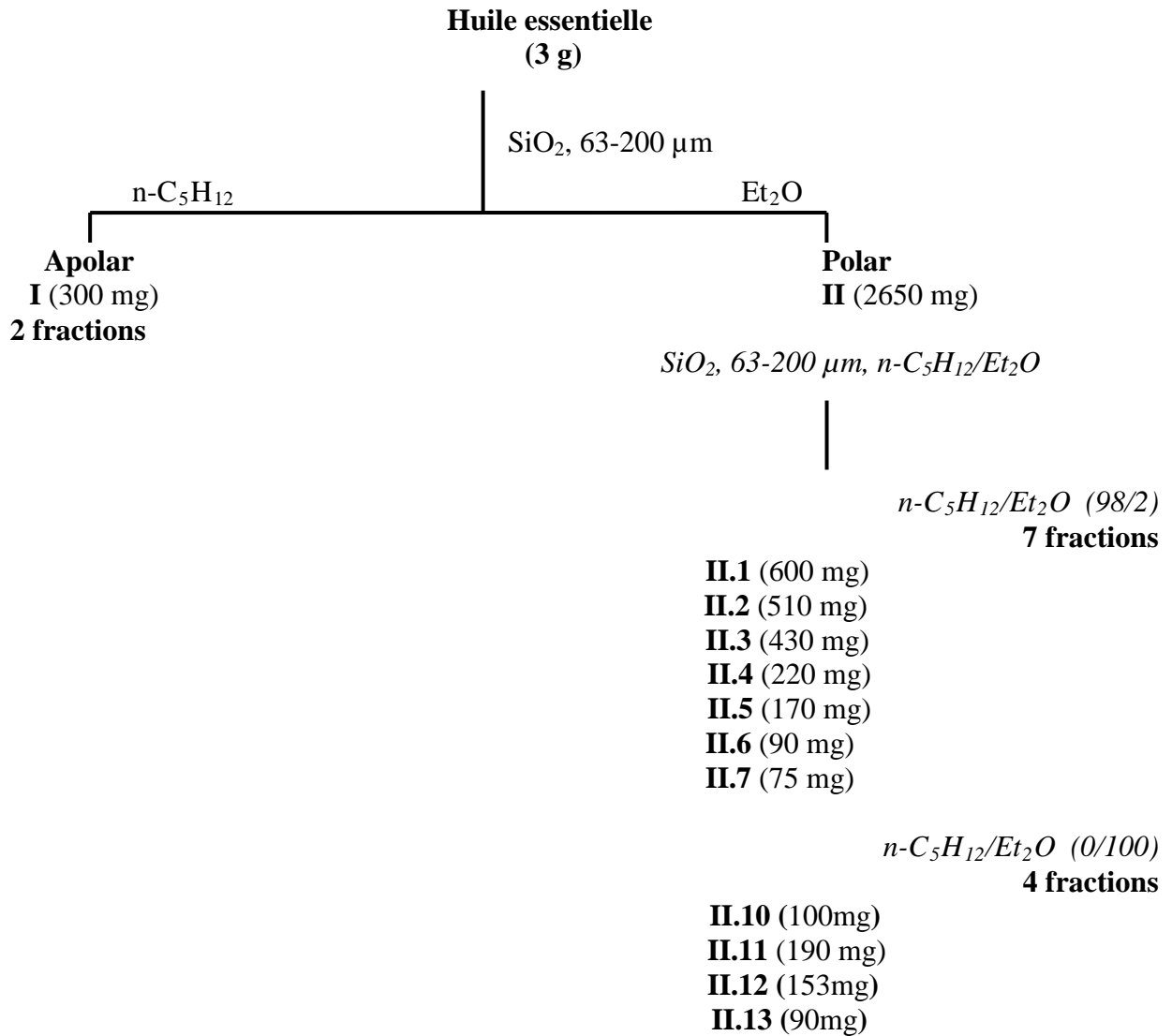


Figure 7 : Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de *M. aquatica*.

IV.5 ACTIVITES BIOLOGIQUES :

Les recherches chimiques sur les substances naturelles s'appuient sur des techniques de séparation des constituants (chromatographie) et de leur détermination structurale (spectrographie). Aujourd'hui, les multiples possibilités de chromatographie sur des supports de plus en plus différenciés permettent d'isoler sans difficultés insurmontables des produits autrefois inaccessibles. Il y a eu accroissement considérable de la puissance et de la finesse d'analyse. La détermination de structure des molécules est donc de plus en plus facile, mais elle devient aussi, et de plus en plus, l'affaire de spécialistes maîtres de tous petits créneaux techniques, et nantis d'un matériel très onéreux. Dans ce fait des études récentes ont montrés que les huiles essentielles et leurs constituants

présentent un potentiel important en tant qu'agents antioxydants et antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux.

IV.5.1 Activité anti-radicalaire et antioxydante :

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire [62].

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [62].

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes [63].

L'objectif de la présente étude est de déterminer le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *M. aquatica* ainsi que de celui de l'extrait d'hydrolat en utilisant les méthodes suivantes : chromatographie sur couche mince CCM (méthode préliminaire), méthode de FRAP, blanchissement de la β -carotène et la méthode de détermination de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl dite DPPH. La sensibilité, la rapidité, l'applicabilité ainsi que la mise en relation des résultats sont discutés.

IV.5.1.1 Dépistage de l'activité antioxydante par chromatographie sur couche mince CCM :

Utilisée comme une technique préliminaire pour la détection du pouvoir antioxydant d'une plante, la chromatographie sur couche mince représente la technique de révélation qui a été mise en évidence lors de notre criblage de l'activité antioxydante et cela en utilisant comme révélateur le

DPPH. Ce dernier donne une couleur jaunâtre en présence d'antioxydant. La (Figure 8) montre les résultats sur les différents extraits étudiés (éthanolique; hexanique et aqueux) ainsi que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat.

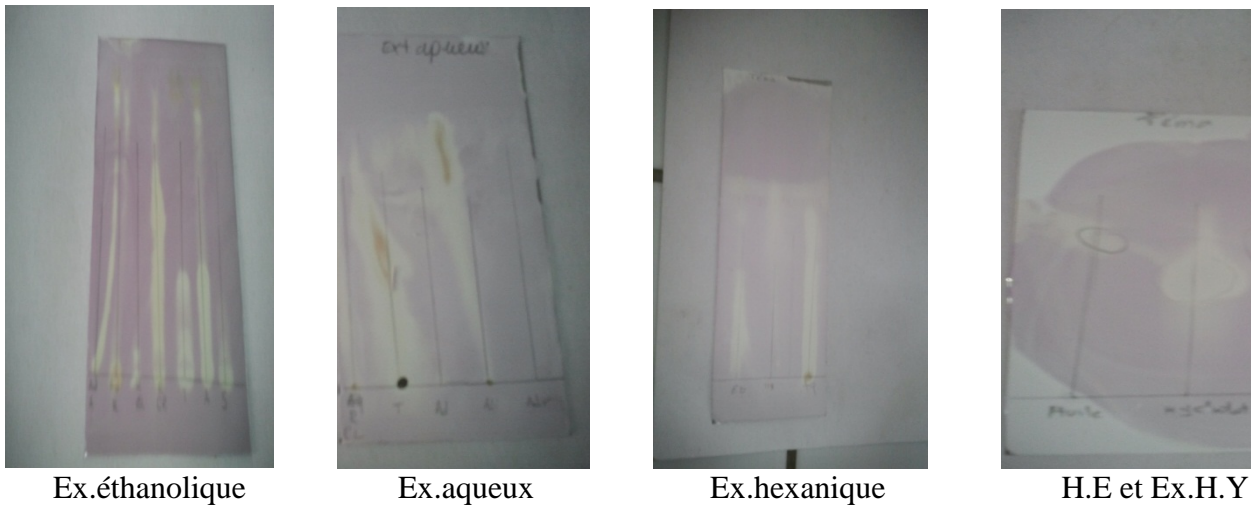


Figure 8 : révélation de l'activité antioxydante par CCM.

Comme le montre les images de la (Figure 8), le virage remarquable du violet vers le jaune nous procure la possibilité d'approfondir l'étude sur l'activité antioxydante.

Le virage notable de la couleur violette vers le jaune pour l'H.E et l'extrait d'H.Y dans une proportion d'éluant de 50/50 (acétate d'éthyle/eau) représentent un résultat prometteur pour les tests du pouvoir antioxydant qui suivent.

Compte tenu des différents grades d'élution utilisés (65/15/20) butanol/acétate d'éthyle/eau puis pour 50/50/10 les résultats du dépistage des différents extraits (aqueux et éthanoliques) étaient caractérisés par une bonne évolution sur les plaques CCM ceux qui permet d'ouvrir un bon axe d'étude de l'activité antioxydante sur les fractions lourdes de cette plante. Ce travail fera l'objet d'un de nos perspectives pour la valorisation des métabolites secondaire de cette plante. Néanmoins, et pour ce qui nous concerne dans le travail en cours, nous allons nous intéresser uniquement aux fractions volatiles (huiles essentielles et extrait d'hydrolat).

IV.5.1.2 Evaluation de l'activité anti-radicalaire :

L'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle de la *Menthe aquatique* est évaluée par la Méthode de DPPH• en le comparant à l'acide ascorbique.

Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées, en vue de déterminer les concentrations qui réduisent 50% des radicaux libres. Les IC₅₀ moyennes sont obtenues par la moyenne des IC₅₀ évaluées graphiquement et séparément à partir des régressions des trois tests (Tableau5).

i. Huile essentielle :

1^{er} essais : (Huile essentielle)

Blanc	0	0	0	0,001	0,002	0,002	0,003	%
112,5µg/ml	0,684	0,418	0,249	0,157	0,141	0,152	0,146	79.35

2^{ème} essais :

Temps		0	5	10	15	20	25	30	%
1	Blanc	0	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	
2	DPPH	0,658	0,660	0,662	0,664	0,666	0,668	0,669	
3	56,25µg/ml	0,717	0,621	0,566	0,525	0,381	0,324	0,291	56.50
4	28,12µg/ml	0,594	0,475	0,433	0,406	0,373	0,366	0,293	56.20
6	6,97µg/ml	0,916	0,701	0,624	0,6	0,594	0,592	0,598	10.61

3^{ème} essais :

Temps		0	5	10	15	20	25	30	%
	56,25µg/ml	0,644	0,577	0,510	0,448	0,395	0,348	0,306	54.26
	28,12µg/ml	0,631	0,571	0,516	0,470	0,422	0,390	0,365	45.44
	14,06µg/ml	0,677	0,641	0,588	0,541	0,500	0,461	0,427	36.17
	6,97mg/ml	0,685	0,646	0,601	0,564	0,531	0,501	0,473	29.29

Tableau 5 : pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle de *Mentha aquatica* après 30 min

Cc	112,5µg/ml	56,25µg/ml	28,12µg/ml	14,06µg/ml	6,97µg/ml	IC ₅₀ µl/ml
HE	79.35	54.26	45.44	36.17	29.29	<u>IC₅₀ =</u> 40.90
Cc	20	50	60	75	100	7,36
BHT	18.55	30.40	35.95	55.85	64.69	

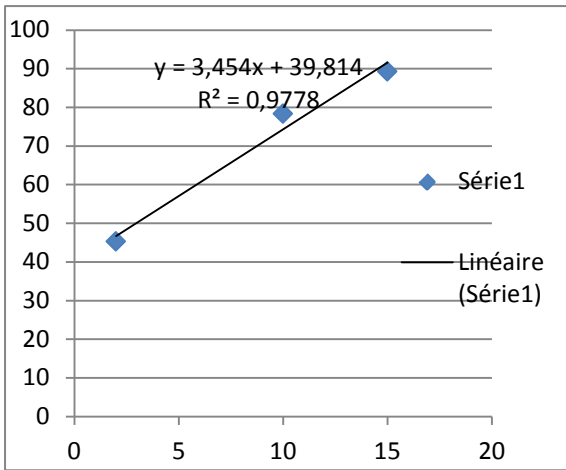


Figure 9 : Pourcentage d’inhibition H.E

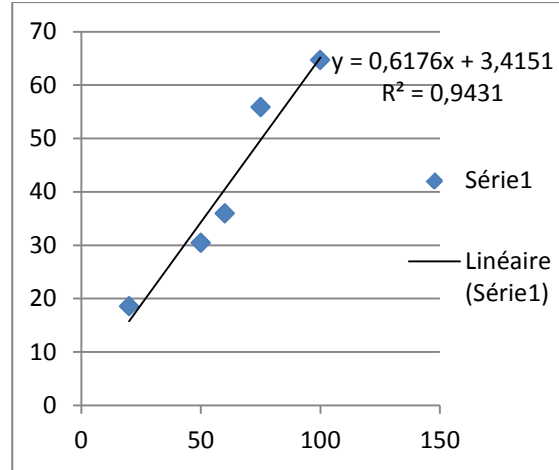


Figure 10 : Pourcentage d’inhibition BHT

ii. Hydrolat :

Tableau 6 : pourcentage d’inhibition de l’hydrolat après 30minute

Echantillons	50µg/ml	20µg/ml	15µg/ml	10µg/ml	2µg/ml	IC ₅₀ µg/ml
Hydrolat	91.85	96.74	89.22	78.26	45.22	2.27

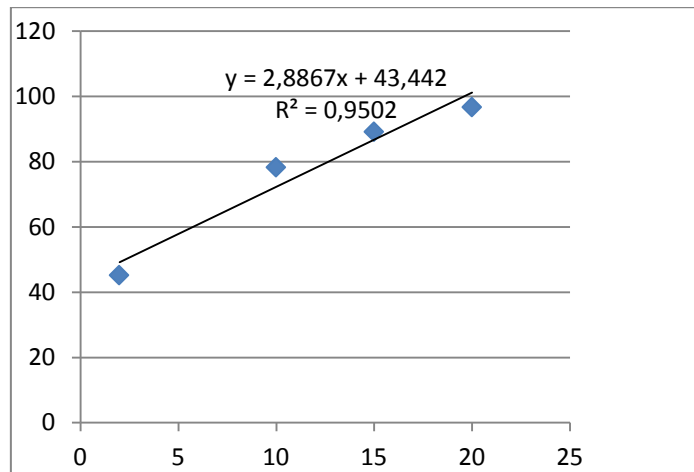


Figure 11 : pourcentage d’inhibition d’extract d’hydrolat

Dans la présente étude, l’huile essentielle, l’hydrolat et le BHT ont pu réduire le radical DPPH• avec des valeurs de IC₅₀= 40.90 µg/mL, IC₅₀= 2,27 µg/mL et IC₅₀= 7,36 µg/ml respectivement. L’huile essentielle de la *Menthe aquatique* a montrée une activité de balayage du DPPH• moins élevée par comparaison au BHT contrairement à l’extract d’hydrolat qui a montré une très bonne activité ce qui

est considéré comme un résultat prometteur en terme de recherche poussée concernant cette phase qui est considérée jusqu'à lors comme un effluent.

IV.5.1.3 Méthode de réduction des ions ferreux FRAP :

Le témoin utilisé concernant cette méthode est l'Acide ascorbique ou les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Résultats du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP.

Concentrations	56,25µg/ml	28,12µg/ml	5,62µg/ml	1,12µg/ml
Ethanol	0,000	0,000	0,0000	0,0000
Blanc	0,532	0,532	0,034	0,033
Absorbance vitamine « C »H.E	3,000	3,000	3,000	1,962
Absorbance H.E	1,556	1,247	0,862	0,733
Absorbance vitamine « C » H.Y	3,000	3,000	2,769	0,585
Absorbance hydrolat	3,000	3,000	2,471	2,521

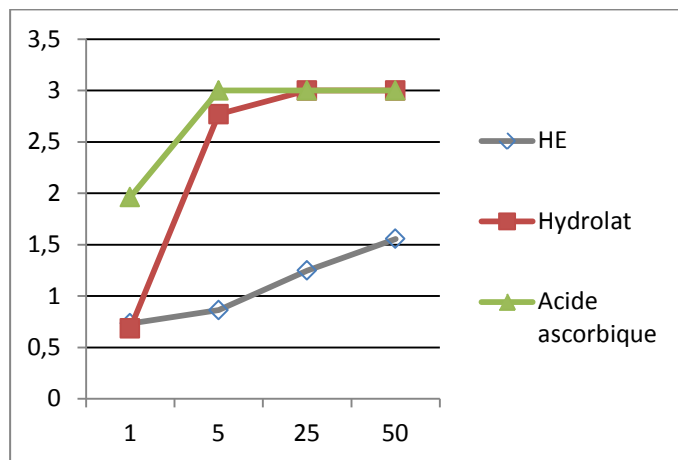


Figure 12 : Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP

Comme le traduit les résultats obtenus la confirmation du pouvoir antioxydant que possède notre plante est bien parente chez les deux fractions volatils étudiées qui sont riche en composés oxygénés qui possèdent un caractère réducteur remarquable vis-à-vis des ions ferreux Fe³⁺.

Concernant le résultat captivant qu'a présenté l'extrait d'hydrolat de notre plante en le comparant avec l'acide ascorbique ça nous a servie comme un appui fort pour la méthode de DPPH

en donnant des valeurs similaires à celle de l'acide ascorbique et même meilleurs dans le cas des concentrations plus faibles (5µl/ml et 1µl/ml) et cela peut être observé au stade de changement de la couleur comme le montre la (**Figure 13**). Ces résultats montrent que l'extrait d'hydrolat a un effet de conservation plus important que le BHT à faible concentration ce qui peut lui valoir d'être un bon agent de conservation des produits alimentaires.

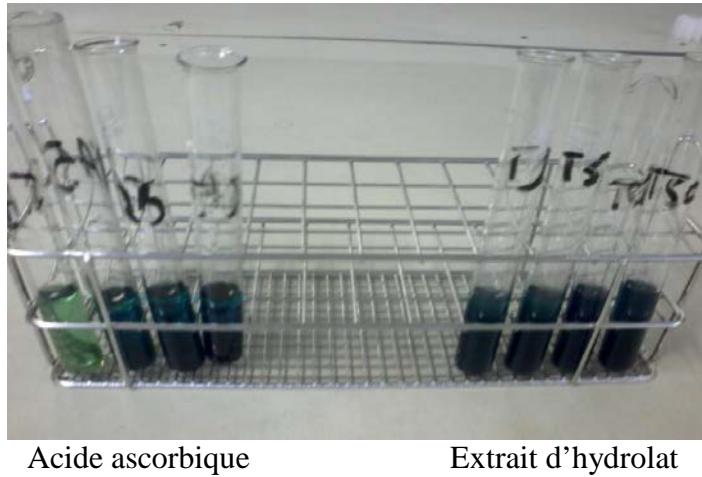


Figure 13 : résultats du test de la méthode de FRAP

IV.5.1.4 Test de blanchissement de β-carotène :

La détermination du pouvoir antioxydant de la *Menthe aquatique* qui repose sur l'inhibition d'une manière dépendante de la dose d'oxydation de l'acide linoléique par la méthode de blanchissement du β-carotène va nous servir comme un test de confirmation en comparant les résultats donnés dans le tableau 8 avec les résultats des méthodes réalisées précédemment.

Tableau 8 : Résultats du test de blanchissement du β-carotène

Echantillons	Activité antioxydante				
HE	Concentration de l'extrait (µg/mL)	1,12	5,62	28,12	56,25
	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	9.65	11.53	19.43	66.43
	IC ₅₀ (µg/ml)				
HY	Concentration de l'extrait (µg/ml)	0.5	1	5	25
	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	49.25	67.53	77.01	91.54
	IC ₅₀ (µg/ml)				
BHT	Concentration de l'extrait (µg/ml)	0.1	0.2	1.0	2.0
	Inhibition du blanchiment du β-carotène (%)	49.55	55.59	75.36	98.23
	IC ₅₀ (µg/ml)				

D'après les résultats obtenus, on constate que le BHT et tous les extraits testés inhibent d'une manière significative (0.62 µg/ml) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β-carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation. L'HE montre une activité inhibitrice appréciable avec une IC₅₀ estimé à 40.87%, mais cette valeur d'activité reste significativement inférieure à celle du contrôle positif (BHT) qui représente 100% d'activité inhibitrice. D'autre part ce test confirme une autre fois le pouvoir antioxydant très important que représente l'extrait d'hydrolat avec une valeur de 0,51% et qui est une valeur très significative surtout par rapport au témoin de référence qui est le BHT.

IV.5.2 Activité antimicrobienne :

1.1.1. Tests *in-vitro* :

En collaboration avec l'équipe de Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement, LAMAABE, sous la direction du Pr. Mourad BENDAHOU ainsi que Mr. Abdelmounaim KHADIR, les tests de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle, de ses fractions ainsi que de l'extrait d'hydrolat ont été réalisés sur 11 souches de références :

- Bactéries gram positive : *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633,
- Bactéries gram négatif : *Salmonella montevideo*, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Et une levure qui est : *Candida albicans* ATCC10231

Le (Tableau 9) présente les résultats des diamètres d'inhibition (en millimètre) et CMI (%) de nos différents échantillons.

Tableau 9 : Résultats des activités antimicrobiennes sur l'extrait d'hydrolat, l'huile essentielle et ces fractions de *M. aquatica*.

	HE		HE-F1		HE-F2		HY	
	Zone	CMI %	Zone	CMI %	Zone	CMI %	Zone	CMI %
<i>Eenterococcus faecalis</i> ATCC 49452	6	ND	6	ND	7	1	8	0.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	6	ND	7	2	10	0.125	11	0.125
<i>Salmonella montevideo</i>	6	ND	6	ND	10	0.125	12	0.125
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	8	0.5	8	1	8	2	12	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	9	0.5	10	0.5	19	0.0625	22	0.0625
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 70603	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6	ND	8	0.5	10	0.125	11	0.125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	10	0.5	6	ND	10	0.5	12	0.125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	6	ND	6	ND	6	ND	6	ND

Ces résultats montrent que l'extrait d'hydrolat de *M. aquatica*, ainsi que la fraction 2 de l'huile essentielle (fraction à 100% d'éther) riche en composés oxygénés, spécialement des alcools et cétones donnent de très bon résultats sur plusieurs souches gram + et gram – ainsi que sur la souche *Candida* comme indiqué dans le tableau. Ces résultats sont très prometteurs, surtout pour l'extrait d'hydrolat, et nous oriente à vouloir fractionner l'extrait d'hydrolat afin de concentrer encore plus l'activité dans une des ses fractions. Dans cette optique nous avons aussi réalisé des tests d'activité antifongique de l'hydrolat aqueux sur les souches responsables de l'infection des agrumes. Ces tests sont présentés ci-dessous.

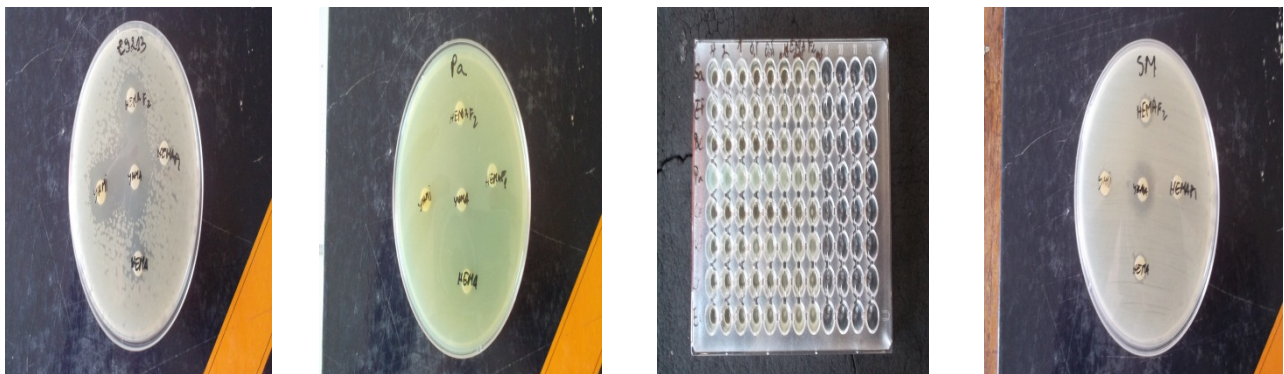


Figure 14 : Effet inhibiteur de l'H.E, l'extrait d'H.Y, et les fractions oxygénées sur différentes souche.

IV.5.3 Tests *in-vivo* (Activité antifongique):

Le suivi des résultats du test *in vivo* de la pourriture des agrumes par l'hydrolat de la *Menthe aquatique* sur les quatre souches *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Oryza*, *Penicillium italicum* et *Penicillium Fusarium solani* nommés (B,C,E,I) respectivement a montré qu'après 10 jours aucune incidence de la maladie n'est remarqué pour l'ensemble des souches utilisés séparément alors que pour le mélange des souches injectés dans les oranges traités par l'hydrolat la contamination été remarquée mais elle est beaucoup moins importante par rapport au témoin négatif (non traités) (**Figure 15, 16**).

La révélation appréciable de l'activité antifongique de l'hydrolat contre les agents pathogène qui cause la pourriture des oranges indique une opportunité prometteuse vis-à-vis de leurs utilisations comme conservateurs naturelles.

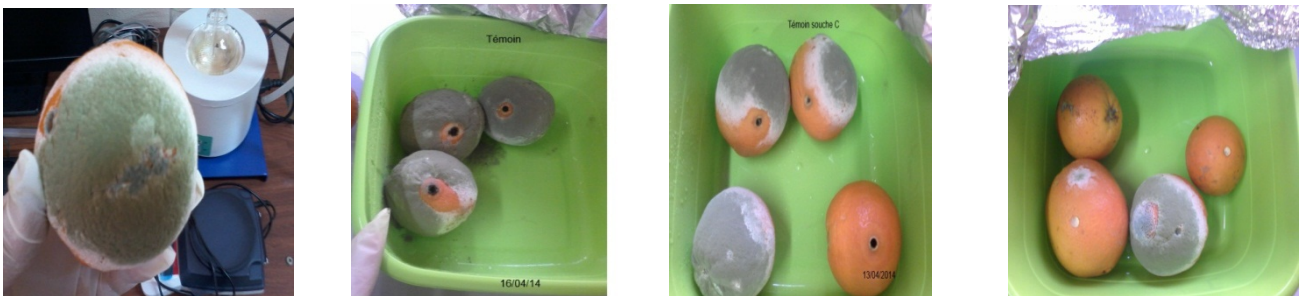


Figure 15 : Oranges contaminés avec les souches (B, C, E, I) non traités par l'hydrolat (témoins)



Figure 16 : Oranges traités par l'hydrolat et contaminés par les souches (B, C, E, I) maintenus pendant 15 jours à la température de 25°C.

V. CONCLUSIONS

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la composition chimique de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de la menthe aquatique poussant dans différentes régions de la willaya de Tlemcen (Algérie), dans le but de valoriser les plantes aromatique, de notre région, pouvant constituer une source substantielle d'huiles essentielles. Dans un premier temps à l'identification des groupes phytochimiques, qui caractérisent les extraits des parties aériennes de notre plante. Dans un deuxième temps, l'extraction et l'identification des volatils de notre plante à des fins de valorisation par des activités biologiques et les potentialités que peuvent avoir ces extraits *in vitro* à savoir les capacités antioxydante, antifongique et antimicrobienne.

Sur le plan phytochimique, les résultats montrent une composition riche et variée en métabolites secondaires, où, les tannins, les coumarines et les stérol et stéroïdes ont caractérisé tous les extraits bruts, alors que les alcaloïdes particularisent à un taux modeste l'extrait aqueux.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des différentes analyses nous ont permis l'identification de 35 composés dans l'huile essentielles. La spécificité de cette huile réside dans le composé majoritaire trouvé qui est l'acétate d' α -terpinyle jamais décrit comme un composé majoritaire dans l'huile de cette plante, ce qui nous oriente vers la possibilité de présence d'un nouveau chémotype pour l'huile essentielle de la menthe aquatique d'Algérie.

Les potentialités antioxydantes de l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat de notre plante sont évaluées par divers mécanismes ; piégeage directe des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur du Fer (FRAP) et le pouvoir de blanchiment de la β -carotène. Les résultats *in vitro* ont révélés des activités antioxydantes pour nos deux extraits(H.E et H.Y). Un fort pouvoir de piégeage du DPPH similaire au BHT exercé par l'extrait d'hydrolat a été observé. Au même titre, le pouvoir réducteur qu'ont présenté nos extraits en utilisant la méthode de FRAP a été remarquable pour l'extrait d'hydrolat avec une décoloration similaire à l'acide ascorbique.

L'aptitude de nos extraits à estimer l'activité antioxydante des substances dans les émulsions a été révélée par le test de blanchissement de la β -carotène, Les résultats montrent que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par notre extrait d'hydrolat contrairement à l'H.E qui a montré une activité modeste.

Dans un autre volé, les résultats de cette présente étude montrent clairement que l'extrait d'hydrolat est capable d'inhiber la croissance antimicrobienne. Cette inhibition (CMI) rangée entre

0,5% et 0,0625% peut constituer une alternative aux substances chimiques nocives pour l'environnement et la santé dans le bio-contrôle de la flore fongique et mycotoxique.

Les tests *in-vivo* d'activité antifongique, réalisé sur les agrumes montrent tout l'étendu de l'application de nos extraits et particulièrement celui de l'hydrolat. D'autres études approfondies sont nécessaires pour mieux valoriser nos extraits et peuvent se résumer dans les points suivants :

Une étude statistique pour la mise en œuvre de la variabilité chimique de nos huiles essentielles dans différents sites.

- Etude statistique des l'huiles essentielles des différentes sites de récolte.
- L'isolement et la caractérisation des composés actifs dans l'extrait d'hydrolat ;
- Le fractionnement bio-guidé de l'extrait d'hydrolat ;
- L'évaluation des autres effets biologiques *in vitro* et *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs et spécialement l'effet cytotoxique ;
- En fin et partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits testés et cela a pour but de pousser la recherche vers une valorisation plus complète du secteur des plantes aromatiques a effet thérapeutique en Algérie.

Après séchage de la plante, à l'ombre et dans un endroit sec et aéré, pendant 6 jours jusqu'à dessiccation complète de la plante, la mesure de la teneur en eau a été effectuée comme suit :

$$T\% = (X - Y/X) * 100$$

Considérons :

X : Poids de l'échantillon.

Y : Poids de l'échantillon après déshydratation.

T% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

VI.2 TESTS PHYTOCHIMIQUES :

La caractérisation des différentes familles que contient notre plante a été réalisée sur deux extraits par le procédé suivant :

VI.2.1 Préparation de l'échantillon :

L'épuisement de la matière végétale a été réalisé à chaud par un montage type Soxhlet, ou 50 g de la matière végétale est placée dans une cartouche poreuse à l'intérieur du Soxhlet, et cela en présence de 300ml d'éthanol pour l'extrait éthanolique, 300ml d'hexane pour l'extrait hexanique et le même volume d'eau dans le cas de l'extrait aqueux. Le produit obtenu est un « Percolat ».



Figure 18: Montage Soxhlet

Les extraits éthanoliques et aqueux ont été soumis à divers tests phytochimiques en vue de mettre en évidence les métabolites secondaires responsables de la plupart des activités biologiques de chaque espèce végétale.

VI.2.2 Détections des familles présentes dans les extraits :

Parmi les familles les plus reconnues vis-à-vis à leurs fortes teneurs en terme de présence dans les plantes et qui ont été mises en évidence par notre criblage phytochimique on cite :

VI.2.2.1 Les alcaloïdes :

La présence des alcaloïdes est caractérisée par l'obtention d'un précipité brun en utilisant les réactifs de MAYER et WAGNER.

La présence des alcaloïdes a été mise en évidence par le test de Mayer et Wagner ou 20 ml de la solution éthanolique a été évaporée. On ajoute par la suite 5ml d'HCL 10% au résidu et on chauffe dans un bain marie. Après filtration du mélange on divise le filtrat en 2 parties en traitant une par le réactif de Mayer et la deuxième par le réactif de Wagner.

Observation : présence de turbidité ou précipitation.

(+) : Est enregistré si le réactif produit une légère opacité ;

(++) : Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation.

(+++): Est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

VI.2.2.2 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.

Caractérisation :

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé " réaction de Shinoda". Le test consiste à ajouter à 1ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée si une coloration rouge, orangée, rosée ou rouge violacé se développe en l'espace de 3 min.

VI.2.2.3 Tanins :

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. On distingue : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Caractérisation :

A 1ml de la solution alcoolique, on ajoute 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test positive est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noir, verte ou bleu -verte et un précipité, selon que les tanins seraient cathéchique, galliques ou éllagiques.

VI.2.2.4 Composés réducteurs :

La caractérisation des composés réducteurs se fait par le traitement de 1ml d'extrait éthanolique avec 2ml d'eau et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

VI.2.2.5 Coumarine :

Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-Pyrone.

Caractérisation :

La détection des coumarines se fait par l'évaporation de 5 ml de la solution extractive éthérique. Pour cela il faut dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Ensuite il faut diviser le volume en deux parties. Le demi-volume est pris comme témoin et on ajoute pour le deuxième 0,5 ml de NH₄OH (10%). Après il faut mettre deux taches sur un papier filtre et les examinées sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

VI.2.2.6 Anthocyanoside :

La présence des anthocyanosides est caractérisée par un dosage de la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH .un virage de couleur en fonction de PH confirme leurs présence :

PH < 3 : la solution prend une coloration rouge.

4 < PH < 6 : la solution prend une coloration bleue

VI.2.2.7 Les saponosides :

Les saponosides sont des substances très fréquentes chez les végétaux, ils sont caractérisés par leur pouvoir moussant en solution aqueuse qui donne l'indice de mousse.

La présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

VI.2.2.8 Stérol et stéroïdes :

La présence des stérols et tripterpènes est mise en évidence à l'aide de H₂SO₄ concentré. La mise en évidence des stérols et stéroïdes est effectuée en évaporant 10ml d'extrait alcoolique (éthanolique) puis on traite le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre. Après filtration 5ml de la solution chloroformique est mélangée avec 5ml d'anhydride acétique, en ajoutant par la suite quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Après agitation et repos de la solution, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 min à 21°C).

VI.2.2.9 Les huiles volatiles :

La détection des huiles volatiles consiste à :

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait hexanoïque;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Concentrer à sec la solution alcoolique obtenue.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

VI.2.2.10 Les acides gras :

L'essai effectué consiste à :

- Concentrer à sec 20 ml de la solution hexanoïque ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans de l'alcool ;
- Traiter la solution alcoolique avec une solution base de soude ou de potasse ;
- Ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique ;
- Concentrer à sec la solution étherée.

Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

Réactifs et réactions de caractérisation

Les réactifs utilisés au cours de ces tests sont :

- **Réactif d'amidon** : Dissoudre 1,2g d'iode (I₂) dans 50ml d'eau distillée contenant 2,5gd'iodure de potassium (KI) puis chauffer pendant 5 minutes et diluer jusqu'à 250ml ou 500 ml.

- **Réactif de Wagner** : Dissoudre 2g de KI et 1,27g I₂ dans 75ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.
- **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358g de HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée. Dissoudre 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.
- **Réaction de liqueur de Fehling** : Mélanger 5ml de liqueur Fehling A avec 5ml de liqueur Fehling B. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones donne un précipité rouge brique.
- **Réaction de Liebermann-Burchardt** : Mélanger 5ml de la solution à tester avec 5ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer la solution 30 minutes à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.
- **Réaction de Bornträger** : En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants des quinones, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

VI.2.3 PROCÉDE D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES :

VI.2.3.1 *Hydrodistillation* :

Le matériel végétal (parties aériennes) des populations de *M. aquatica* a été mis dans un montage à hydrodistillation de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne (**Figure 19**), utilisé à l'échelle du laboratoire sous pression atmosphérique. Une quantité de 500 g du matériel végétal est déposée dans un ballon de 6 L rempli à demi d'eau, relié à un réfrigérant. Le mélange eau/plante est porté à ébullition par un chauffe-ballon pour générer une vapeur d'eau saturée en composés volatils. Le réfrigérant sert à condenser la vapeur en distillat (hydrolat) et l'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 4 heures. L'huile essentielle (phase organique) se sépare de l'hydrolat (phase aqueuse) après condensation dans le réfrigérant. L'huile essentielle est par la suite récupérée et conservée à 4°C dans des flacons en verre brun avant d'être analysées.



Figure 19: Montage d'hydrodistillation type Clevenger

VI.2.3.2 Calcul de rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétale à traiter.

$$\mathbf{Rd\% = (m_1/m_0)*100}$$

Rd : rendement en huile essentielle

m1 : masse en gramme d'huile essentielle

m0 : masse en gramme de la matière végétale

VI.2.3.3 Caractérisation des huiles essentielles :

Une fois l'huile obtenue, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM).

VI.2.3.3.1 Chromatographie en phase gazeuse :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées en utilisant un appareil CPG Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, USA) équipé d'un injecteur unique et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil a été utilisé pour l'échantillonnage simultané de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mx 0,22 mm, épaisseur film de 0,25 um) avec différentes phases stationnaires: Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et RTX cire (polyéthylène glycol). Le programme de température est:

de 60 à 230 ° C par pat de 2 ° C/min, puis la température est maintenu stable à 230 ° C pendant 30 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène (0,7 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenus à 280 ° C. Le mode d'injection a été mené avec un rapport de 1:80. Volume injecté: 0,1 µl.

VI.2.3.3.2 Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse :

L'huile essentielle a été analysée en utilisant un analyseur quadripôle Perkin Elmer TurboMass, directement couplé à un Perkin Elmer Autosystem XL équipé de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mm 0,22 mm, Epaisseur 0,25 µm), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Pour la CPG les mêmes conditions décrit ci-dessus ont été conservé. Pour la SM, la température de la source d'ions: 150 ° C; l'énergie d'ionisation: 70 eV; Les spectres de masse à ionisation électronique ont été acquises avec un intervalle de masse de 35 à 350 Da; balayage de masse: 1s. Volume d'huile injectée: 0,1 µl.

VI.2.3.4 HYDROLAT « HY »:

Pour chaque extraction 400ml d'hydrolat a été récupéré dans des bouteilles en verre et conservé à l'abri de la chaleur. Le volume total a été soumis à une extraction séquentielle liquide-liquide par un solvant apolaire en utilisant une ampoule à décanter. Chaque 300ml de l'hydrolat a été traité par 2 fois 50ml d'éther diéthylique. La phase organique a été ensuite évaporée au Rotavapor. Le résidu ainsi récupérer a été mis dans des flacons opaques préalablement pesés.

Le calcul de rendement est définit comme suit :

$$\mathbf{RdtHY = [V/V_0] \times 100}$$

V : volume d'hydrolat après traitement en millilitre ;

V₀: volume totale de l'hydrolat en millilitre.

VI.2.3.5 FRACTIONNEMENT DE L'HUILE ESSENTIELLE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE SILICE :

Le fractionnement de l'huile essentielle de la *Menthe aquatique* a été réalisé sur colonne de silice. L'adsorbant choisi est une silice fine de granulométrie 63-200 µm. Environ 3 g d'huile essentielle de notre menthe ont été élués par un gradient hexane / éther d'éthylique / selon les proportions suivantes : 100/0 ; 98/2 et 0/100. Ces mélanges ont été choisis suite aux résultats obtenus pour les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées préalablement sur l'huile brute. 13 fractions notées F1 à F13 ont ainsi été obtenues.

Certaines de ces fractions ont été consacrées aux activités biologiques (antifongique et antimicrobienne).



Figure 20 : Fractionnement de l'huile essentielle par colonne chromatographique

VI.2.4 REALISATIONS DES ACTIVITES BIOLOGIQUES :

VI.2.4.1 *Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles*

VI.2.4.1.1 **Dépistage du pouvoir antioxydant par Chromatographie sur couche mince (CCM) :**

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Pour analyser les trois extraits ; éthanolique, hexanique et aqueux ainsi que l'huile essentielle et l'hydrolat de la *Menthe aquatique* L, une CCM a été utilisée sur plaques de gel de silice avec un indicateur fluorescent. Dans un système de migration constitué dans un premier temps du Butanol-Acétate d'éthyle-eau (65 :15 :20) et ensuite les proportions ont été changées en (50 :40 :10) et ceci concernant les l'analyse des extraits.

Les proportions qui ont été utilisés pour l'huile essentielle et l'hydrolat étaient de (50 :50) dans un système de migration constitué de l'Acétate d'éthyle-eau

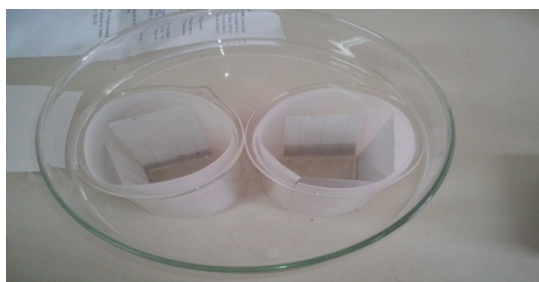


Figure21 : Cuve chromathographique

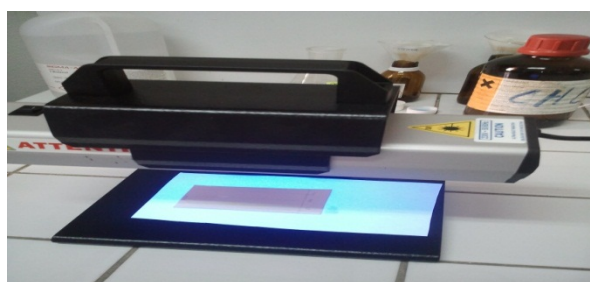


Figure 22 : Revelateur UV visible.

Nous avons utilisé la méthode mise au point par Takao et ses collaborateurs (1994) [64]. Sur plaques de Silicagel possédant un support en aluminium, une goutte de chaque extrait est déposée et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile.

Après migration, les chromatogrammes ont été séchés, puis révélés par 2 systèmes :

- Une qui est une révélation chimique à l'aide d'une solution de DPPH (2mg/ml dans le méthanol). Les constituants de l'extrait présentant une activité antiradicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune-blanc sur fond violet.
- Et le deuxième par une révélation physique sous lampe UV à 254 nm

VI.2.4.1.2 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance [64]. Selon le protocole décrit par Mansouri et *al* (2005) [65], avec des légères modifications qu'on a apportées, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,6 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Des solutions à différentes concentrations de l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat ou standard (BHT) sont ajoutés à un volume complémentaire de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{48\text{h}} (\text{BHT})] \times 100.$$

Calcul des IC₅₀:

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC₅₀ (*Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées.

VI.2.4.1.3 Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

Le protocole expérimental utilisé est celui de Wang et coll (1986)[66], avec une légère modification où : 2,5ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 0,5 ml d'une solution tampon phosphate (pH= 6.6) et 0,5 ml d'une solution de potassium ferrocyanide à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1 ml du surnageant sont ajoutés à 0,5 ml d'eau distillée et 0,3ml d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃) à 0.1%.

Après incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre [66].

VI.2.4.1.4 Test de blanchissement du β-carotène :

La méthode décrite par Tepe et coll (2005) [67], a été employée avec une légère modification. Une émulsion β-carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 µl de l'acide linoléique et 200 mg de tween 20 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au Rotavapor et 100 ml d'eau oxygénée sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

À 2,5 ml du mélange précédent, 350 µl de chaque extrait ont été ajoutés (à une concentration de 2 mg/ml dans le méthanol). Les tubes à essai ont été incubés en obscurité à la température du laboratoire. Deux tubes contrôle ont été aussi préparés avec la même procédure, l'un contenant un antioxydant de référence BHT (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350µl de méthanol [67].

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{échantillon})/\text{Abs}_{48\text{h}}(\text{BHT})] \times 100.$$

N.B : le BHT est utilisé comme contrôle positif, dans les deux méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydantes (DPPH et blanchissement du β-carotène), et aux mêmes conditions expérimentales.

VI.2.4.2 Réalisations des activités antimicrobiennes :

L'activité antimicrobienne a été évaluée par deux méthodes :

- ❖ Méthode de micro-dilutions sur milieu liquide.
- ❖ Méthode de diffusion en gélose.

Les souches pures ont été inoculées dans des tubes contenant 5 ml de Brain Heart Infusion (Conda Pronadisa™, Espagne) puis ils ont été incubés à 37°C pendant 18 h. Une concentration de 0,5 McFarland a été réglée et qui correspond à 107 UFC/ml selon le Clinical and Laboratory Standards Institute [68].

VI.2.4.2.1 Méthode de diffusion en gélose :

La sensibilité des souches à l'huile a été testée par la méthode décrite par Bauer et coll(1966) [69]. En bref, une culture de 18-24 h des souches testées sur bouillon Müller-Hinton a été préparé à une concentration de 107 UFC / ml et ensuite ensemencé sur gélose Müller-Hinton (Fluka BioChemika, Espagne) et Sabouraud (Fluka BioChemika, Espagne). Pour la levure *Candida albicans* par écouvillon tel que recommandé par (CLSI, 2011) [70]. Un disque de 6 mm de diamètre stérile imprégnée avec 5 µL d'huile a été déposé dans des conditions aseptiques au centre de la plaque inoculée.

VI.2.4.2.2 Méthode de micro-dilutions sur milieu liquide :

La concentration minimale inhibitrice a été calculée par la méthode de microplaque (96 puits) à fond rond suivant la méthode modifiée à partir de Wiegand et coll. , (2008) [71]. L'huile essentielle a subi une dilution successive par ½ dans des tubes contenant le bouillon Müller- Hinton (Fluka Bio Chemika, Espagne) par l'ajout de Tween 80 à une concentration de 1 % (v / v) pour obtenir une solution homogène d'huile et du bouillon. On a préparé une seconde solution qui contient seulement le bouillon Müller -Hinton et du Tween 80 à une concentration de 1%, cette concentration a été utilisée en tant qu'un blanc.

Les inoculums de 107 UFC/ml ont été dilués de 1/100 pour une concentration de 105UFC/ml. Sur les microplaques, 180 µl de la suspension bactérienne 105UFC/ml ont été déposés à l'intérieur des puits. Ensuite, 20 µl de la solution de l'huile a été ajouté. La concentration finale du Tween 80 dans chaque puits est de 0,1% (v/v) à et les concentrations finales de l'huile essentielle ont varié de 0,0078 % à 4%.

REFERENCES

- [1] Dahmani Megrerouche M., 1997 - Le Chêne Vert En Algérie. Syntaxonomie, Phytosociologie Et Dynamique Des Peuplements. Thèse Doct. Es. Sciences - Univ. Houari Boumediene. Alger. 383P.
- [2] Quezel P., 2000 – Réflexion Sur L'évolution De La Flore Et De La Végétation Au Maghreb Méditerranéen. Ibis Press. Edit. Paris. 117 P.
- [3] S. Sutour, "Etude De La Composition Chimique D'huiles Essentielles Et D'extraits De Menthe De Corse Et De Kumquats," Université De Corse, 2010.
- [4] Z. Mohammedi, "Etude Phytochimique Et Activités Biologiques De Quelques Plantes Médicinales De La Région Nord Et Sud-Ouest De l'Algérie," 2013
- [5] Bruneton J., 1993 - Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Paris, Lavoisier, 623p.
- [6] Tucker, AO Et RFC Naczi. 2007. *Mentha* : Un Aperçu De La Classification Et Les Relations. En 16-17: Laurent, BM, Ed, Monnaie. Du Genre *Mentha* . 16-17.
- [7] Il Edrissi A., Thèse De Troisième Cycle: Etude Des Huiles Essentielles De Quelques Espèces Salivia, Lavandula Et Mentha Du Maroc, Faculté Des Sciences De Rabat, Maroc, 1982,18-22.
- [8] Nisrin Benayad, Thèse Sur: Les Huiles Essentielles Extraite Par Plantes Médicinales Marocaine : Moyen Efficace De Lutte Contre Les Ravageurs Des Denrées Alimentaires Stockées, Université Mohammed V– Agdal De Rabat, Novembre 2008, 13-30.
- [9] Abdellatif El Fadl & Noureddine Chtaina, ' Etude De Base Sur La Culture De La Menthe Au Maroc, 2010.
- [10] Bruneton J. 1993. Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinales. Pp 41-54. 2^eEdition, Lavoisier, Paris.

- [11] S. Guido, B. Alessandra, F. Guido, C. P. Luigi, And T. P. Emilio, "Variability Of Essential Oil Composition Of *Mentha Aquatica* Ssp. *Aquatica* Collected In Two Different Habitats Of North Tuscany, Italy," *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 9, No. 4, Pp. 455–457, 1997.
- [12] Bertoli A, Flamini G, Cioni PL, Tomei PE, Spinelli G. 1997. Variability of essential oil composition of *Mentha aquatica* ssp. *Aquatica* collected in two different habitats of north Tuscany, Italy. *J. Essent. Oil Res.* 9 : 455-457.
- [13] Avato P, Tava A. 1995. *Acetylenes And Terpenoids Of Bellis Perennis*. *Phytochemistry* (Oxford) 40: 141-7.
- [14] Maffei, M. (1988). Environmental Factors Affecting The Oil Composition Of Some *Mentha* Species Grown In North West Italy. *Flavour Frag. J.*, 3: 79-84.
- [15] S. Kokkini, "Chemical Races Within The Genus *Mentha* L.," In *Essential Oils And Waxes*, Springer, 1991, Pp. 63–78.
- [16] Fraisse, K.N., C. Suon, M.G. Scharff, G. Vernin, R.M. Zamkotsian, And J. Metzger. 1985. *Huiles Essentielles De Menthe Crépue*. *Parf.Cosm. Aromes* 65: 71-75.
- [17] M. Miyazawa, H. Watanabe, K. Umemoto, And H. Kameoka, "Inhibition Of Acetylcholinesterase Activity By Essential Oils Of *Mentha* Species," *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, No. 9, Pp. 3431–3434, 1998.
- [18] O. Sticher Et Al., *Helv. Chim. Acta* 53, 2010 (1970)
- [19] Hefendehl, F. W. And Murray, M. J. (1972). Changes In Monoterpene Composition In *Mentha Aquatica* Produced By Gene Substitution From *M. Arvensis*. *Phytochemistry*, 11: 2469-2474..
- [20] I. Jerkovic And J. Mastelic, "Composition Of Free And Glycosidically Bound Volatiles Of *Mentha Aquatica* L.," *Croat. Chem. Acta*, Vol. 74, No. 2, Pp. 431–439, 2001.
- [21] H. T. Olsen, G. I. Stafford, J. Van Staden, S. B. Christensen, And A. K. Jäger, "Isolation Of The MAO-Inhibitor Naringenin From *Mentha Aquatica* L.," *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 117, No. 3, Pp. 500–502, May 2008.

- [22] Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M Et Al (2003) Antimicrobial And Antioxidant Activities Of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Med* 69:413–41
- [23] Lawrence BM (1978) A Study Of The Monoterpene Interrelationship In The Genus *Mentha* With Special Reference To The Origin Of Pulegone And Menthofuran. Thesis, Groningen State University, Groningen.
- [24] Malingré, T. M. And Maarse, H. (1974). Composition Of The Essential Oil Of *Mentha Aquatica*. *Phytochemistry*, 13: 1531-1535.
- [25] F. Agostini, A. C. A. Dos Santos, M. Rossato, M. R. Pansera, P. L. Dos Santos, L. A. Serafini, R. Molon, And P. Moyna, “Essential Oil Yield And Composition Of Lamiaceae Species Growing In Southern Brazil,” *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Vol. 52, No. 2, Pp. 473–478, Apr. 2009
- [26] F. Senatore, A. D’Alessio, C. Formisano, And M. Özcan, “Chemical Composition And Antibacterial Activity Of The Essential Oil Of A 1,8-Cineole Chemotype Of *Mentha Aquatica* L. Growing Wild In Turkey,” *J. Essent. Oil Bear. Plants*, Vol. 8, No. 2, Pp. 148–153, 2005.
- [27] W. Dhifi, M. Litaïem, N. Jelali, N. Hamdi, And W. Mnif, “Identification Of A New Chemotype Of The Plant *Mentha Aquatica* Grown In Tunisia: Chemical Composition, Antioxidant And Biological Activities Of Its Essential Oil,” *J. Essent. Oil Bear. Plants*, Vol. 14, No. 3, Pp. 320–328, 2011.
- [28]. A. Esmaili, A. Rustaiyan, S. Masoudi, And K. Nadji, “Composition Of The Essential Oils Of *Mentha Aquatica* L. And *Nepeta Meyeri* Benth. From Iran,” *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 18, No. 3, Pp. 263–265, 2006.
- [29] K. H. C. Başer, M. Kürkçüoğlu, B. Demirci, T. Özek, And G. Tarımcılar, “Essential Oils Of *Mentha* Species From Marmara Region Of Turkey,” *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 24, No. 3, Pp. 265–272, Jun. 2012.
- [30] Muñoz-Olivas R., Screening Analysis: An Overview Of Methods Applied To Environmental, Clinical And Food Analyses, *Trends Anal. Chem.*, 2004, 23, 203-216.

- [31] Mariott P.J., Shellie R., Cornwell C., Gas Chromatographic Technologies For The Analysis Of Essential Oils, *J. Chromatogr. A.*, 2001, 936, 1-22.
- [32] Augusto F., Leite E Lopes A., Zini C.A., Sampling And Sample Preparation For Analysis Of Aromas And Fragrances. *Trends Anal. Chem.*, 2003, **22**, 160-169.
- [33] Joulain D., Method For Analysing Essential Oil. Modern Analysis Methodologies: Use And Abuse, *Perfum. Flavor*, 1994, 19, 5-17.
- [34] Bauer K., Garbe D., Surburg H., Common Fragrance And Flavor Materials, Preparation, Properties And Uses, *Verlag Chemie Int.*, 1990, Second Edition, New-York
- [35] Takeoka G.R., Buttery R.G., Ling L.C., Wong L.Y., Dao L.T., Edwards R.H., Berrios J.J., Odor Thresholds Of Various Unsaturated Branched Esters, *Lebensm.-Wiss. U-Technol.*, 1998, **31**, 443-448.
- [36] Nagata Y., Measurement Of Odor Threshold By Triangle Odor Bag Method, *Bulletin Of Japan Environmental Sanitation Center*, 1990, 17, 77-89
- [37] Tholl D., Boland W., Hansel A., Loreto F., Röse U.S.R., Schnitzler J-P., Practical Approaches To Plant Volatile Analysis, *Plant J.*, 2006, 45, 540-560.
- [38] Wilkes J.G., Conte E.D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J.B., Miller D.W., Sample Preparation For The Analysis Of Flavors And Off-Flavors In Foods, *J. Chromatogr. A*, 2000, 880, 3-33.
- [39] Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E. Use Of Compressed Fluids For Sample Preparation: Food Applications, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1152, 234-246.
- [40] Natural Essential Oils: Extraction Processes And Applications To Some Major Oils. B. Meyer-Warnod, *Perfumer & Flavorist*, 1984, 9, 93-103.
- [41] Normes AFNOR Recueil Des Normes Françaises Huile Essentielle. AFNOR ,Paris .1992

[42] Pharmacopée Européenne 1 Conseil De l'Europe, Maisonneuve S.A. Edition, Sainte Ruffine, 1996.

[43] Apparatus For Volatil Oil Déterminations Description Of New Type J.F. Clevenger, American Perfumer & Essential Oil Review, 1928, 467-503

[44] Julien Paolini. Caractérisations Des Huiles Essentielles Par CPG/IR, CPG/SM-(IE Et IC) Et RMN Du Carbone-13 De Cistus Slibidus Et De Deux Asteraceae Endémiques De Corse : Eupatorium Cannabinum Subsp. Corsicum Et Dorocicum Corsicum- Docteur De l'Université De Corse-2005.

[45] Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, d'Acompara Zellner B, Costa R, Rubiolo P. 2008. Quantitative Analysis Of Essential Oils: A Complex Task. *Flavour Fragr. J.* 23 :382-391.

[46] Anton R Lobskin A- Plantes Aromatiques. Epices, Aromates, Condiments Et Huiles Essentielles ; Tec Et Doc, Paris 522p 2005.

[47] Jennings W., Shibamoto T., Qualitative Analysis Of Flavour And Fragrance Volatiles By Glass-Capillary Gas Chromatography, Ed. Jovanovitch H.B., Academic Press, New-York, 1980.

[48] Joulain D., König W.A., *The Atlas Of Spectral Data Of Sesquiterpene Hydrocarbons*, Hambourg, Ed. E.B. Verlag, 1998.

[49] König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., *Terpenoids And Related Constituents Of Essential Oils*, Library Of Massfinder 2.1, Institute Of Organic Chemistry, Hambourg, Germany, 2001.

[50] McLafferty F.W., Stauffer D.B., *The Wiley/NBS Registry Of Mass Spectral Data*, 4th Ed. Wiley-Interscience, New York, 1988.

[51] McLafferty F.W., Stauffer D.B., *Wiley Registry Of Mass Spectral Data*, 6th Ed. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM, Version 3.10., Newfield, 1994.

- [52] Adams R.P., *Identification Of Essential Oil Components By Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, 2001.
- [53] National Institute Of Standards And Technology. PC Version 1.7 Of The NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library. Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CT, 1999.
- [54] Hadjieva P., Sandra P., Stoinova-Ivanova B., Verzele M., Open Tubular Gas Chromatography-Mass Spectral « Electron Impact And Chemical Ionization » - Analysis Of Bulgarian Rose Oil (*Rosa Damascena* Mill.), *Rivista Italiana EPPOS*, 1980, 62, 367-372.
- [55] Dougherty R.C., Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 1981, 53, 625A-636A.
- [56] Hendriks H., Bruins A.P., A Tentative Identification Of Components In The Essential Oil Of *Cannabis Sativa* L. By A Combination Of Gas Chromatography Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry And Retention Indices, *Biochem. Mass Spectrom.*, 1983, 10, 377-381.
- [57] De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., *Spectrométrie De Masse*, Masson, 1994, Paris.
- [58] Zupanc M., Prošek M., Dušan M., Combined CI And EI Mass Spectra In The Analysis Of Essential Oils, *J. High Res. Chromatogr.*, 1992, 15, 510-513.
- [59] Arpino P.J., L'ionisation Chimique Une Façon De Modéliser Les Réactions De Chimie Organique Dans Un Spectromètre De Masse, *L'actualité Chimique*, 1982, 4, 19-28.
- [60] Vernin G., Lageot C., Couplage CPG/SM Pour L'analyse Des Arômes Et Des Huiles Essentielles, *Analysis*, 1992, 20, 34-39.
- [61] Marquez B., Bacterial Efflux Systems And Efflux Pumps Inhibitors, *Biochimie*, 2005, 87, 1137-1147.
- [62] G. Yakhlef, "Etude De L'activité Biologique Des Extraits De Feuilles De *Thymus Vulgaris* L. Et *Laurus Nobilis* L.," Université El Hadj Lakhdar De Batna, 2010.

- [63] Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. Mécanismes Physiologiques De La Défense Antioxydante Physiological Action Of Antioxidant Defences. *Nutrition Clinique Et Métabolisme* 2002, 16, 233–239.
- [64] TAKAO, T., KITATANI, F., WATANABE, N., YAGI, A. & SAKATA, K. (1994). A Simple Screening Method for Antioxidants and Isolation of Several Antioxidants Produced by Marine Bacteria from Fish and Shellfish. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 58, 1780-1783.
- [65] Mansouri, A., G. Embarek, E. Kokkalou And P. Kefalas, 2005. Phenolic Profile And Antioxidant Activity Of The Algerian Ripe Date Palm Fruit (*Phoenix Dactylifera*). *Food Chem.*, 89: 411-420.
- [66] Oyaizu M., 1986. Antioxidative Activities Of Browning Products Of Glucosamine Fractionated By Organic Solvent And Thin-Layer Chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 35:Pp.771-775.
- [67] Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. Screening Of The Antioxidant Potentials Of Six *Salvia* Species From Turkey. *Food Chem* 2006, **95**, 200-204.
- [68] M. A. Pfaller, L. Boyken, R. J. Hollis, S. A. Messer, S. Tendolkar, And D. J. Diekema, “In Vitro Susceptibilities Of Clinical Isolates Of *Candida* Species, *Cryptococcus Neoformans*, And *Aspergillus* Species To Itraconazole: Global Survey Of 9,359 Isolates Tested By Clinical And Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods,” *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 43, No. 8, Pp. 3807–3810, 2005.
- [69] A. W. Bauer, W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, And M. Turck, “Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method.,” *Am. J. Clin. Pathol.*, Vol. 45, No. 4, P. 493, 1966.
- [70] M. Hombach, G. V. Bloemberg, And E. C. Böttger, “Effects Of Clinical Breakpoint Changes In CLSI Guidelines 2010/2011 And EUCAST Guidelines 2011 On Antibiotic Susceptibility Test Reporting Of Gram-Negative Bacilli,” *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 67, No. 3, Pp. 622–632, 2012.

[71] Wiegand, T., Gunatilleke, C.V.S. & Gunatilleke, I.A.U.N. (2007a) Species Associations In A Heterogeneous Sri Lankan Dipterocarp Forest. *American Naturalist*, 170, 77–95.