

11H31-64103-22/03



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels
LAPRONA

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du Diplôme de

Master en Biologie

Option

Sciences des aliments

Par

M^r LEHBAB AHMED

Thème



**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Mentha rotundifolia* L. (Domrane) de la région de Tlemcen :
Composition chimique des huiles essentielles**

Soutenu le : 19/09/2013 devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------|-------------------------|------------|
| M ^m BEKHECHI C. | Maître de Conférences A | Présidente |
| M ^r BARKAT S. | Maître de Conférences B | Examineur |
| M ^r BENAMMAR C. | Maître de Conférences B | Examineur |
| M ^m BENDIMERAD N. | Professeur | Encadreur |

Année Universitaire 2012-2013

Remerciements

Ce travail de recherche a été effectué au centre Algérien de contrôle de qualité et emballage (CACQE), laboratoire de contrôle de la qualité et répression des fraudes de Tlemcen et Alger Ainsi que qu'au niveau du Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bakr BELKAID-TLEMEN, sous la direction de madame BENDIMERAD Nassima.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Madame BENDIMERAD N., Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, pour ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à madame BEKHECHI Chahrazed, Maître de Conférences et chef d'équipe au Laboratoire des Produits Naturels LAPRONA, trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et notre obligeance pour toute l'aide fournie à la réalisation des analyses microbiologiques. Nous la remercions pour sa disponibilité, et l'importance qu'elle a accordée à notre recherche. Aussi me fais l'honneur de présider ce jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur BARKAT SALIH, Maître de conférences au département de Biologie à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré ses multiples occupations.

Que monsieur BENAMAR C, Maître de conférence au département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie vivement monsieur Tafiani CHOUKRI Maitre de conférence au département d'agronomie à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir aidé dans se travail

Je tiens également à remercier les personnels de laboratoire de centre Algérien de contrôle de qualité (CACQE) laboratoire de Tlemcen trouve ici le témoignage de notre reconnaissance et notre obligeance pour toute l'aide fournie à la réalisation des analyses microbiologiques en particulier : Monsieur ; Dali, Khaldi, Mekki, et M^{elle} Touria pour leur aide précieuse.

Je remercie Monsieur ; Azzi, Benyoub, Afifi, Madame Yousfi, Melle Belbachir Kawter, Melle Djalila pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance, sans oublier tous ceux dont l'aide et les conseils m'ont été si utiles.

Liste des abréviations

Ac : Acide

AFNOR : Association française de normalisation

CCM : Chromatographie sur couche minces

CMI : La concentration minimale inhibitrice

cm : Centimètre

CPG : Chromatographie phase gazeuse

CPG/MS : Couplage chromatographie phase gazeuse et spectrométrie de masse

D : Diamètres de zones d'inhibition

DB : Dimethylpolysiloxane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

HE's : huilles essentielles

HPLC : Chromatographie liquide haute performances

LDL : Lipoprotéines de basse densité

M. : *Mentha*

MeOH : Méthanol

min : Minutes

ml: Millilitre

nm : Nanomètre

n-buOH : n-butanol

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : potentiel hydrométrique

PPi₃ : Phosphate d'isopentén,-3-yle

PPi₂ : Pyrophosphate de diméthylallyle

PPG : Pyrophosphate de géranyle

g : Gramme

SM : Spectrométrie de masse

UV : Lumière ultra-violet

UFC : Unité formant colonie

µg : Microgramme

µl : Microlitre

% : Pourcentage

Résumé

Dans le cadre de la contribution à la valorisation de la flore algérienne, par la recherche d'extraits et composés d'origine végétale à intérêt thérapeutique, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et microbiologique des extraits de l'espèce aromatique *Mentha rotundifolia*.

L'analyse phytochimique a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des huiles volatiles, et des stérols et stéroïdes au niveau des feuilles et des tiges de la plante, avec une faible quantité des saponosides.

Deux extraits bruts secs ont été préparés, l'un aqueux, l'autre méthanolique, les rendements sont respectivement de l'ordre de 32.85 % et 8.01% pour les feuilles et environ 26.55 % et 5.87 % pour les tiges.

L'huile essentielle de couleur jaune et à forte odeur issue de la partie aérienne feuilles et tiges a été extraite par entraînement à la vapeur d'eau, le rendement étant de 1.7%. L'analyse de cette huile essentielle a été réalisée par couplage CG/SM. 14 composés représentant 70.91% de l'huile essentielle ont été identifiés principalement les monoterpènes oxygénées avec prédominance la pipériténone (33.06%) et la pulégone (17.12%). D'autres constituants sont présents en quantités moindres, la pipéritone (9.21%) et la menthone (3.31%). Les composés non identifiés représentent 29.09% de la composition de l'huile.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien a été faite pour les extraits méthanolique, aqueux et huiles essentielles vis-à-vis de onze souches microbiennes. Les résultats ont révélés une sensibilité plus importante des souches fongiques à l'huile essentielle par rapport aux bactéries, alors que les extraits méthanoliques et aqueux se sont montrés presque inactifs sur l'ensemble des germes microbiens testés.

Mots clés : *Mentha rotundifolia*, étude phytochimique, extrait aqueux, extrait méthanolique, huile essentielle, CG/SM, analyse microbiologique.

ملخص

وكجزء من المساهمة في التنمية من النباتات الجزائري، مقتطفات البحوث والمركبات المشتقة من النباتات لأغراض علاجية، ونحن مهتمون في الدراسة النباتية والميكروبيولوجية من مقتطفات من الأنواع العطرية النعناع *rotundifolia*. وكشف التحليل الكيميائي النباتي وجود مركبات الفلافونويد، كاتشين العفص، الزيوت الطيارة، والجمادة والمنشطات في أوراق وسيقان النبات، مع كمية صغيرة من الصابونين.

تم إعداد اثنين من مقتطفات الخام الجافة، مائي واحد والميثانول واحد، والمحاصيل هي على التوالي 32.85% و حول 8.01% لأوراق الشجر وحول 26.55% و 5.87% لينبع. تم استخراج الزيوت الأساسية من اللون الأصفر ورائحة قوية من الجزء الجوي من الأوراق والسيقان عن طريق التقطير بالبخار من الماء، وكان العائد 1.7%. تم إجراء التحليل من الضروري النفط من قبل GC / MS. وقد تم تحديد 14 مركبات يمثلون 70.91% من الضروري النفط monoterpenes الاوكسيجين بشكل رئيسي مع piperitenone غلبة (33.06%) وبوليغون (17.12%).

مكونات أخرى موجودة في كميات أصغر، 9.21% piperitone و 3.31% menthone). تمثل المركبات مجهولة الهوية 29.09% من تكوين النفط.

تم إجراء تقييم لفاعلية مضادات الميكروبات لمقتطفات الميثانول والزيوت الأساسية وجها لوجه سلالات ميكروبية مائي أحد عشر. أظهرت النتائج وجود حساسية أكبر من السلالات الفطرية مع الزيت العطري مقارنة مع البكتيريا، في حين أظهرت مقتطفات المثلي ومائي تقريبا غير فعال في جميع الجراثيم الميكروبية التي تم اختبارها.

كلمات البحث: النعناع *rotundifolia*، دراسة الكيميائي النباتي، المستخلص المائي، واستخراج الميثانول، من الضروري النفط، GC / MS، التحليل الميكروبيولوجي.

Abstract

As part of the contribution to the development of the Algerian flora, the research extracts and plant-derived compounds for therapeutic purposes, we are interested in the phytochemical and microbiological study of extracts of aromatic species *Mentha rotundifolia*. The phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, catechin tannins, volatile oils, and sterols and steroids in the leaves and stems of the plant, with a small amount of saponins.

Two dry crude extracts were prepared, one aqueous and one methanol, yields are respectively about 32.85% and 8.01% for leaves and about 26.55% and 5.87% for the stems. The essential oil of yellow color and strong odor from the aerial part of leaves and stems was extracted by steam distillation of water, the yield was 1.7%. Analysis of the essential oil was performed by GC / MS. 14 compounds representing 70.91% of the essential oil were identified mainly oxygenated monoterpenes with the predominance piperitenone (33.06%) and pulegone (17.12%). Other components are present in smaller quantities, piperitone (9.21%) and menthone (3.31%). Unidentified compounds represented 29.09% of the oil composition.

The evaluation of the antimicrobial potency was made for the methanol extracts, essential oils and aqueous vis-à-vis eleven microbial strains. The results revealed a greater sensitivity of fungal strains with essential oil compared to bacteria, while methanolic and aqueous extracts have shown almost inactive in all tested microbial germs.

Keywords: *Mentha rotundifolia*, phytochemical study, aqueous extract, methanol extract, essential oil, GC / MS, microbiological analysis.

Table des matières

| | |
|---|----------|
| Remerciements..... | iii |
| Liste des abréviations..... | v |
| Résumés..... | vi |
| Table des matières..... | x |
| Liste des figures..... | xiv |
| Liste des tableaux..... | xvi |
| | |
| Introduction générale..... | 2 |
| | |
| <i>Chapitre I: Synthèse bibliographique</i> | |
| I. Les Plantes aromatiques et médicinales..... | 5 |
| II. Généralités sur les Lamiacées..... | 5 |
| II.1. Généralités sur les menthes | 5 |
| II.2. Description botanique et systématique de la plante..... | 6 |
| II.3. Distribution et habitat..... | 6 |
| II.4. Présentation | 6 |
| II.5. Propriétés thérapeutiques..... | 7 |
| III. Travaux antérieurs..... | 8 |
| IV. Principales substances actives végétales..... | 8 |
| IV. 1. Les composés phénoliques..... | 8 |
| IV.1.1. Définition | 8 |
| VI.1.2. Les flavonoïdes | 9 |

| | |
|---|----|
| IV 2.2.1. Définition | 9 |
| IV.1.2.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes..... | 10 |
| IV.3. Les tanins..... | 10 |
| IV.3.2. Propriétés biologiques des tanins | 11 |
| IV.4. Les coumarines..... | 12 |
| IV.5. Les anthocyanes ou anthocyanosides..... | 12 |
| IV.6 .Les composés terpéniques..... | 13 |
| IV.6.1. Les huiles essentielles..... | 13 |
| IV.6.1.1 Définition | 13 |
| IV.6.1.2. Répartition et localisation..... | 14 |
| IV.6.1.3. Rôles des huiles essentielles chez les plantes..... | 14 |
| IV.6.1.4. Composition chimiques des huiles essentielles..... | 14 |
| IV.6.1.5. Propriétés et utilisation | 15 |
| IV.6.1.6. Autres propriétés..... | 16 |
| IV.6.1.5 Origine biosynthétiques des terpènes | 17 |
| IV.6. 1.6. Activité liée à la composition chimique (notion de chemotype)..... | 19 |
| IV.6.2. Les saponosides..... | 19 |
| IV.6.2.1 Définition | 19 |
| IV.6.2.2. Propriétés biologiques des saponosides | 20 |
| IV.6.3.Les stérols et stéroïdes..... | 20 |
| IV.6.4.Alcaloïdes..... | 20 |
| IV.6.4.1.Définition..... | 20 |

| | |
|--|----|
| IV.6.4.2. Propriétés biologiques des alcaloïdes | 20 |
| V. Méthodes d'analyses chromatographiques | 21 |
| V.1. Introduction | 21 |
| V.2. La chromatographie en phase gazeuse(CPG)..... | 21 |
| V.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse..... | 22 |

Chapitre II: Partie expérimentale

| | |
|---|----|
| I. Matériel végétal | 25 |
| I.1. Origine géographique et période de récolte de la plantes | 25 |
| I.2. Identification botanique | 25 |
| I.3. Préparation des échantillons | 25 |
| II .Tests phytochimiques..... | 27 |
| II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud..... | 27 |
| II.1.1. Amidon..... | 27 |
| II.1.2. Saponosides..... | 27 |
| II.1.3. Les tanins..... | 28 |
| II .1.4. Les anthraquinones..... | 28 |
| II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol..... | 28 |
| II.2.1. Les flavonoïdes..... | 28 |
| II.2.2. Les alcaloïdes sels..... | 29 |
| II.2.3. Les tanins..... | 29 |
| II.2.4. Les anthracénosides, coumarines et anthocyanosides..... | 29 |
| a. Les anthracénosides..... | 29 |

| | |
|--|----|
| c. Les anthocyanosides..... | 30 |
| D. Les stérols et stéroïdes..... | 30 |
| II.2.6. Les composés réducteurs..... | 31 |
| II.3. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique..... | 31 |
| II.3.1. Les huiles volatiles..... | 31 |
| II.3.2. Les acides gras..... | 32 |
| II.3.3. Les alcaloïdes bases..... | 32 |
| II.4. Réactifs et réactions de caractérisation..... | 32 |
| III. Préparation des extraits bruts secs..... | 33 |
| III.1 Préparation des extraits aqueux..... | 33 |
| III.1.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques..... | 33 |
| III.3. Extraction de l'huile essentielle | 34 |
| IV. Identification des huiles essentielles | 35 |
| IV.1. Analyse de la composition chimique par CPG-SM | 35 |
| IV.1.1. Principe | 35 |
| IV.1.2. Conditions Opératoires..... | 36 |
| V. Pouvoir antimicrobien | 36 |
| V.1. Provenance des germes étudiés..... | 37 |
| V.2. Antibiotique et antifongique utilisés | 38 |
| V.3. Milieux de cultures utilisées | 39 |
| V.4. Préparation de l'inoculum | 39 |
| V.4.1.. Pour les bactéries | 39 |

| | |
|---|----|
| V.4.2. Pour les moisissures..... | 40 |
| V.4.3. Pour les Levures | 40 |
| V.5. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne..... | 40 |
| V.5.1. Aromatogramme (méthode de diffusion sur disque)..... | 40 |
| V.3.4. Méthodes de détermination de la concentration..... | 41 |

Chapitre III: Résultatset discussion

| | |
|---|----|
| I. Test phytochimiques..... | 43 |
| I.1. Rendement en extraits bruts secs..... | 44 |
| I.3. Les huiles essentielles de <i>Mentha rotundifolia</i> | 44 |
| I.3.1 Rendement en huiles essentielles..... | 44 |
| I.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> | 45 |
| II. Pouvoir antimicrobien..... | 48 |
| II.1. Le pouvoir antimicrobien de l'antibiotique..... | 48 |
| II.2. Le pouvoir antimicrobien de l'antifongique..... | 49 |
| II.4. Pouvoir antimicrobien des extraits..... | 50 |
| II.4.1. Pouvoir antibactérien des extraits et de l'huile essentielle..... | 50 |
| II.4.2. Activité antifongique des extraits et huiles essentielles | 52 |
| II.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI..... | 53 |
| <i>Conclusion générale</i> | 54 |
| <i>Références bibliographiques</i> | 55 |

Annexes

Liste des figures

| Figure | Page |
|--|-------------|
| Figure 1 : <i>Mentha rotundifolia</i> L. | 7 |
| Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes | 9 |
| Figure 3 : Acide ellagique | 11 |
| Figure 4 : Acide galique (Ac 3,4,5-trihydroxybenzolque)..... | 11 |
| Figure 5 : structure chimique de la catéchine..... | 11 |
| Figure 6 : structure chimique des coumarines..... | 12 |
| Figure 7 : unité isoprénique..... | 15 |
| Figure 8 : La Biosynthèses des différents terpènes chez les plante..... | 18 |
| Figure 9 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse..... | 22 |
| Figure 10 : Schéma d'un couplage CPG/SM..... | 23 |
| Figure 11 : Carte géographique de la région de récolte –Meftahia- (Tlemcen)..... | 26 |
| Figure 12 : Appareillage d'extraction | 35 |
| Figure 13 : Rendements (%) en extraits bruts secs de l'espèce étudiée..... | 44 |
| Figure 14 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> | 47 |
| Figure 15 : Diamètre des zones d'inhibition de ciprofloxacine relatif aux différentes souches bactériennes étudiées..... | 49 |
| Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de la nystatine relatif aux souches fongiques..... | 50 |
| Figure 17 : Moyenne de diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle relative aux différentes souches bactériennes..... | 51 |

Liste des tableaux

| <u>Tableau</u> | Page |
|---|-------------|
| <u>Tableau 1</u> : Situation géographique de site de prélèvement..... | 25 |
| <u>Tableau 2</u> : Provenance des germes étudiés..... | 38 |
| <u>Tableau 03</u> : Spécifications de l'antibiotique et de l'antifongique utilisés..... | 39 |
| <u>Tableaux 4</u> : Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles et tiges..... | 43 |
| <u>Tableau 5</u> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> | 46 |
| <u>Tableau 6</u> : Comparaison de teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> avec celles des travaux antérieurs..... | 47 |
| <u>Tableaux 6</u> : Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aqueux et méthanolique et huiles essentielles relatives aux souches bactériennes..... | 50 |
| <u>Tableaux 7</u> : Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aqueux, méthanolique et huile essentielle relatives aux souches fongiques..... | 52 |
| <u>Tableau 8</u> : Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> | 53 |

Introduction générale

Les herbes et les épices ont été utilisés depuis l'Antiquité pour leur parfum, saveur et des propriétés de conservation dans une variété de produits et d'application en particulier pour l'industrie pharmaceutique, cosmétique, alimentaire, sanitaire, parfumerie et (**Bakkali et al., 2008**).

Cependant, il est aujourd'hui un renouveau d'intérêt scientifique de l'usage de ces antimicrobiens naturels pour la conservation des aliments. Cela est dû à la forte demande des consommateurs pour des aliments plus naturels que possèdent encore une durée de vie longue.

Depuis de nombreuses années, une variété de composés synthétiques chimiques différents a été utilisée comme agents antimicrobiens dans les aliments pour inhiber les microorganismes nuisibles et pathogènes. Cependant, le large usage indiscriminé de conservateurs chimiques a conduit à un certain nombre de problèmes écologiques et médicaux qui, en plus de l'économique considération font qu'il est nécessaire d'adopter des stratégies qui soient accessibles, simple demande, et non toxique pour les humains et les plantes (**Shukla, et al., 2008**).

Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, Environ 80% , profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (**El Rhaffari et al., 2004**), Plus particulièrement dans les pays en voie de développement ou se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels a base de plante, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétales pour trouver de nouvelle molécules aux caractéristiques biologiques induites. Cette source semble inépuisable puis que seul une petite partie des 400.000 espèces connues ont été investiguées en phytochimie et en pharmacologie, (**Hostettmann et al., 1998**).

L'Algérie comporte un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans le nombre et la qualité dans les zones côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle (**Duraffourd et al., 1997**). Par ailleurs, il ya de nouvelles inquiétudes concernant la fréquence croissante des nouvelles éclosions de maladies d'origine alimentaire causées par des microorganismes pathogènes (**Tajkarimi al., 2010**) et l'émergence de la résistance aux micro-organismes qui sont associés aux maladies d'origine alimentaire (**Gibbons, 1992**). Parmi les antimicrobiens naturels , les huiles essentielles et les substances

extraites de nombreuses plantes et de fruits, qui ont été signalés est qui détiennent un large spectre d'activité antibactérienne (Rota, Carramiñana et al., 2004 ; Gulluce et al., 2007 ; Derwich et al., 2010), antifongique (Gulluce et al., 2007 ; Dambolena et al., 2010), antiparasitaire (Bakkali et al., 2008) et insecticide (Burt, 2004 ; Batish et al., 2008 ; Kordali et al., 2008) ainsi que d'autres activités biologiques (Viuda-Martos et al., 2011).

Par conséquent, leur utilisation semble être particulièrement importante pour la santé publique au développement des pays. Les plantes se défendent par divers moyens physiques et chimiques en synthétisant des métabolites secondaires extraordinairement diversifiés. Ces derniers sont souvent connus pour leur toxicité pour les herbivores, ils affectent profondément le comportement des insectes phytophages. De nombreuses molécules, qui présentent une action défensive du végétal contre les ravageurs, ont été identifiées. Ainsi plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées. Ces Substances synthétisés par des plantes appartiennent à des familles chimiques très diverses telles que les alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les stéroïdes.

Le présent travail a pour objectif la mise au point des substances à effet antimicrobien naturelle d'origine végétale, notamment des huiles essentielles. L'étude de la composition chimique et les activités antimicrobiennes en vue d'apporter une contribution à la connaissance de l'espèce « *Mentha rotundifolia* ».

C'est dans cette optique que notre travail a été subdivisé en trois parties :

- La première partie, est une synthèse bibliographique qui comporte :
 - Une synthèse bibliographique menée sur l'espèce sélectionnée *Mentha rotundifolia*, appartenant à la famille de lamiacées,
 - Détermination des différents métabolites secondaires et leurs activités biologiques.

- La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à :
 - La détermination des différentes classes chimiques par criblage phytochimique des feuilles et des tiges de *Mentha rotundifolia*
 - Préparation et détermination des rendements des extraits bruts secs aqueux et

méthanolique

- Extractions des huiles essentielles
 - Analyse de des principaux constituants de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
 - L'évaluation *in vitro* du pouvoir antimicrobien des extraits méthanolique, aqueux et huiles essentielles correspondant aux feuilles et tiges de la plante, vis-à-vis de sept souches bactériennes, quatre souches fongiques.
- la troisième partie, sera consacrée à la discussion des résultats obtenus lors de cette étude et notre travail est accompli par une conclusion et des perspectives envisagées.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

I. Les Plantes aromatiques et médicinales

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on cueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales. Le monde végétal est à l'origine d'un grand nombre de médicaments, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins phytothérapeutique (**Delaveau, 1991**).

Dans plusieurs pays en voie de développement, une grande partie de la population fait confiance à des phytothérapeutes traditionnels et à leurs collections de plantes médicinales pour le soigner. Les plantes aromatiques et médicinales ont eu une infinie diversité d'emplois, à signaler le domaine thérapeutique, alimentaire, cosmétique. L'Algérie jouit d'une position privilégiée avec une façade maritime longue s'ouvrant sur la méditerranée. Cette position géographique particulière confère à l'Algérie une gamme exceptionnelle de bioclimat très variées allant de l'humide et de subhumide au saharien et désertique en passant par l'aride, le semi-aride et le climat de haute montagne. Tous ces facteurs accordent à l'Algérie une large bande de végétation très variée notamment les plantes aromatiques et médicinales dont plusieurs dizaines d'espèces existant à l'état spontané ou cultivé (**Gullen et al., 1986**).

II. Généralités sur les Lamiacées

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones dans la flore Algérienne, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres (**Naghibi et al., 2005**), d'où notre plante étudié fait partie : *Mentha rotundifolia*. Cette famille comporte aussi de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (**Judd et al., 2002**).

La famille des lamiacées englobe une très large gamme de composés comme les chaînes des terpénoïdes qui sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes, les huiles essentielles, les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes et plus précisément les courtes chaînes (**Naghibi et al., 2005**).

II.1. Généralités sur les menthes

La menthe vient du Latin « *Mentha* » qui dérive lui-même du grec « *Minhé* » c'est l'une des plantes médicinales les plus célèbres pour ses propriétés médicales et thérapeutiques. En Chine elle a été cultivée depuis les antiquités, spécialement pendant la dynastie de Ming (1368-1644) (**Dai, 1981**), elle a été citée aussi dans la pharmacopée.

islandaise du 13^{ème} siècle. Les feuilles, les fleurs et les tiges de mentha sont souvent utilisés comme tisanes ou sous forme d'additifs pour beaucoup de nourritures à l'arôme et la saveur (Kothari et Singh, 1995 ; Moreno et al., 2002).

II.2. Description botanique et systématique de la plante

✚ Nom vernaculaire

Domrane, chachatro , timarssat

Menthe de cheval, menthe odorante, menthastre, menthe simple (Eberhard et al., 2005)

✚ Classification des lamiales selon

Quezel et Santa, (1963)

Règne : Végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Classification selon

APG III (Dupont et Guignard, 2007)

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicots

Sous classe : Euastéridées I

Ordres : Lamiacées

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha rotundifolia* L.

II.3. Distribution et habitat

Appelée aussi la menthe à feuilles rondes, c'est l'une des plantes vivaces, espèces communes des ruisseaux, fossés, bords d'eau, prairies humides, bords de chemins, sentiers ombragés jusqu'à 1600 m (Globel et al., 1995). Le genre *Mentha* est principalement distribué dans les régions tempérées et sub-tempérées du monde Eurasie, Australie, Afrique, Amérique du nord (Bhat et al., 2002).

II.4. Présentation

Mentha rotundifolia, est un hybride de *Mentha longifolia* et de *Mentha suaveolens* (Kokkini et al., 1988 ; Lorenzo et al., 2002) alors que pour d'autres auteurs *Mentha rotundifolia* et *Mentha suaveolens* correspondent à la même espèce (Hendriks et al., 1976).

Elle ne pose pas de problème de détermination en raison de la forme de ses feuilles rondes (**Figure 1**).

❖ Description botanique

M. rotundifolia L. est une plante vivace de 10 à 80 cm de hauteur. Tiges en partie couchées, fleurissant abondamment dès le 1/3 inférieur. Petites feuilles rondes (1 à 2 cm) épaisses et ridées en réseau, comme gaufrées, recouvertes de poils blanchâtres, douce au toucher et ramifiés. Fleurs petites avec de couleur ; blanc ou rose, regroupées en grappe serrées, dressées à l'aisselle des feuilles



Figure1 : *Mentha rotundifolia* L.

Revu ; Tela botanica

Elles forment un tube étroit, rose, inséré dans un calice vert à 5 dents. La période de floraison s'étend de juillet à septembre. Comme toutes les menthes, elle dégage une forte odeur caractéristique qui chez cette plante rappelle la pomme (**Simandi et al., 1993**)

Les plantes se défendent par divers moyens physiques et chimiques en Synthétisant des métabolites secondaires extraordinairement diversifiés (alcaloïdes, les phénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes, les huile essentiel...etc.). De nombreuses molécules, qui son dotées d'action antimicrobiennes, ont été identifiées. Ainsi plus de 30000 structures caractérisées ont été répertoriées.

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une véritable banque de donné sur ces molécules chimiques.

II.5. Propriétés thérapeutiques

La menthe s'utilise contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, la mélancolie, les maladies de poitrines, l'hystérie, les troubles de la vue, (**Garnier et al., 1961**), elle présente aussi des propriétés médicales, on cite à titre d'exemple : stimulante du système nerveux, tonique, stomachique, antiseptique, analgésique, vermifuge (**Bezager et al., 1980 ; Singh et al., 1983**). La menthe évite la formation des toxines est fait disparaître l'accumulation des impuretés dans le sang, donne la vitalité à la peau et au visage. Aussi la menthe détient un pouvoir bactéricide et antiseptique qui entrave la purification des matières intestinales (**Bardeau, 1986**).

Les huiles essentielles extraites possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Economou et al., 1991 ; Kaur et Kapoor, 2002 ; Daferera et al., 2003**).

III. Travaux antérieurs

La plus part des travaux effectués sur *M. rotundifolia* L. visent à déterminer la composition phytochimique est plus spécialement des huiles essentielles de différents zones dans le monde (**Hendricks et Van, 1976 ; Veskutonis, 1996 ; Daniel, 2002 ; Gulluce et al., 2007, Brada, 2007**).

Aussi il ya l'étude faite par (**Djenane et al., 2012**) sur la caractéristique antioxydants et antimicrobienne des huiles essentielles de *M. rotundifolia*.

On note aussi les travaux faits par (**Benayad, 2008**) sur l'effet insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

IV. Principales substances actives végétales

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles issue de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire. Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont groupées selon leur appartenance chimique (**Judd, 2002**). Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique

Il est important de connaître la composition chimique des plantes pour expliquer le mode d'action sur l'organisme (**Iserin, 2001**).

IV. 1. Les composés phénoliques

IV.1.1. Définition

Se sont des composées qui présente des propriétés biologiques intéressantes : antioxydantes anti-inflammatoires, antiseptiques, anti radicalaire et immunostimulantes (**Bruneton, 1993**).

Ces dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont à l'origine de deux grandes voies métaboliques : la première voie du shikimate et celle de l'acétate (**Bruneton, 1999**). La double origine synthétique et à l'origine de la diversité structurale des composés phénoliques. Elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et l'acétate qui est achevée par la synthèse de composés mixtes (stiblène, xanthones, flavonoïdes). Dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés (**Harbone, 1988**).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. (**Makoi et Ndakidemi, 2007**).

VI.1.2. Les flavonoïdes

IV 2.2.1. Définition

Le nom flavonoïde est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie la couleur jaune. L'intérêt nutritionnel des flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C par *Szent Gyorgyi* en 1938 (**Bruneton, 1993**).

Ce sont des pigments responsables de la coloration des feuilles, fleurs et fruits il joue aussi un rôle important dans l'interaction et l'attraction des insectes pour la pollinisation des plantes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 9000 composés naturels du règne végétal (**Ghedira, 2005**) et ils en restent des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué en différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher, 2003 ; Williams et al., 2004 ; Kueny-Stotz, 2008**). Ils sont aussi caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (**Toufektsian et al., 2008**).

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaîne à trois carbones (structure en C6-C3-C6) (**figure 2**). La chaîne en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C (**Bruneton, 1999**). (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (**Figure2**)

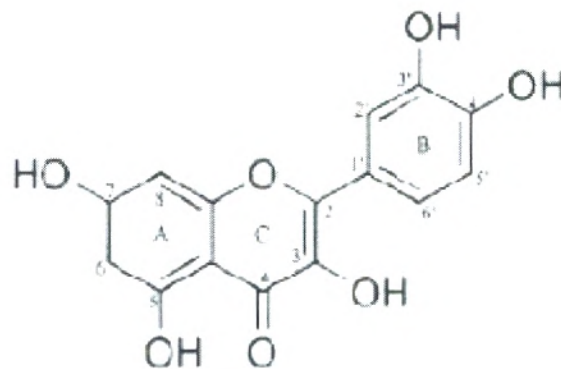


Figure 2 : Structure de base des flavonoïdes (**Bruneton, 1999; Pietta, 2000**)

IV.1.2.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (**Manach et al., 2004**). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes (**Bravo, 1998**).

Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant (**Havsteen, 2002**).

Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des Lipoprotéines de basse densité (LDL) et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (**Tu et al., 2007**).

IV.3. Les tanins

IV.3.1. Définition

Les tanins sont parmi les substances qu'on retrouve généralement dans l'ensemble des plantes et dans tous les compartiments (racine, tige, écorces, feuilles.) Se sont des composé phénoliques hydrosoluble, tirent la plus part de leur propriétés par la grande affinités de formé des complexes avec des macromolécules tel que les protéines et la liaison avec des fibres de collagènes (**Paolini et al., 2003**). Malgré La variabilité de Leur structure chimique une partie en commun est toujours présente, qui est de nature polyphénolique.

Habituellement en distingue deux catégories de tanins, différent par leur structure et l'origine biosynthétiques (**Paolini et al., 2003**).

❖ Les tanins hydrolysables :

Appelés aussi pyrogallique sont des polyesters de glucides esters d'acides phénols (acide gallique ou ellagique) (**Bruneton, 1999**) (**Figures 3,4**).

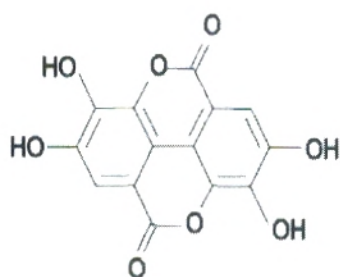


Figure 3 : Acide ellagique

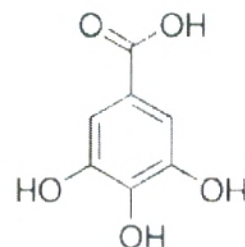


Figure 4 : Acide galique
(Ac 3,4,5-trihydroxybenzolque)

❖ **Les tanins condensés :**

Les proanthocyanidols ou tanins cathéchiques (**Figure 5**) présentent une différence fondamentale des tanins galliques, leur structure se rapproche plus des polymères flavanoliés, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent C4-C8 ou C4-C6 tel la catéchine ou l'épicatéchine. (**Bruneton, 1999**).

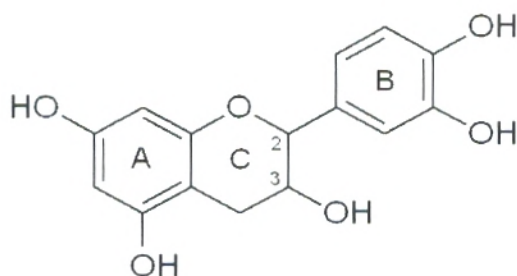


Figure 5 : Structure chimique de la catéchine

IV.3.2. Propriétés biologiques des tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes ils ont, une propriété exceptionnelles car ils favorisent la régénération des tissus et à la cicatrisation en cas de blessure superficielle ou de brûlure, de plus ils ont un effet antiseptique, (**Bruneton, 1999**)

Ils jouent aussi un rôle dans l'inhibition enzymatique ; pour les végétaux en leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base d'autres propriétés ; vulnéraire, antidiarrhéique,

l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, favorisant ainsi la vasoconstriction des petits vaisseaux (**Paolini et al., 2003**).

En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien (**Bassene et al., 1995 ; Baba Moussa, 1998 ; Kolodziej, 1999**), antiviral (**Nonaka et al., 1990 ; Pousset et al., 1993 ; Hong et al., 2000**), anti-inflammatoire (**Mota et al., 1985**) et une activité antimutagène (**Kaur et al., 2000**).

Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures, coupures et brûlures (**Bruneton, 1999**).

IV.4. Les coumarines

Les coumarines ou glucosides lactoniques sont isolés la première fois en 1820 à partir de la fève tonka (*Dipteryx odorata* Willd, Fabaceae). Ces substances qui se trouvent dans de nombreuses espèces végétales possèdent des propriétés très diverses.

Dérivées des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale et certaines formes complexes (**Figures 6**). Les coumarines ont des propriétés dues principalement à la fonction lactone (**Namba et al., 1988 ; Hoult et al., 1996**).

L'intérêt pharmacologique des coumarines est limité, certaines sont considérées comme vasculoprotectrices et veinotoniques (**Bruneton, 1999 ; Lucienne, 2010**). Les coumarines sont capables aussi de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capturer les radicaux libres (**Igor, 2002**).

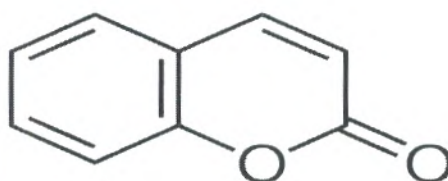


Figure 6: Structure chimique des coumarines (**Dean, 1963**)

IV.5. Les anthocyanes ou anthocyanosides

Les anthocyanes sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange de la plus part des fleurs et des fruits, ils sont issus du métabolisme des flavonoïdes, ces pigments existent sous forme d'hétérosides (les anthocyanosides) et leur génines (les anthocyanidols). Comme beaucoup d'autres composés phénoliques, les anthocyaniques se comportent comme des pièges à radicaux libres (**Jackman et Smith, 1996**).

Parmi les activités les plus connues des anthocyanosides c'est l'inhibition des enzymes protéolytiques de dégradation du collagène, ce qui explique leur propriétés vasorotectrices et antioedémateuse pour cela ils sont fortement proposées pour les traitements des troubles liés à l'insuffisance veineuse et à la fragilité capillaires (diminution de la perméabilisées des capillaires et augmentent leur résistance) (**Buruneton, 1999**).

IV.6 .Les composés terpéniques

IV.6.1. Les huiles essentielles

IV.6.1.1 Définition

Ce sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau pressage ou incision des végétaux qui les contiennent (**AFNOR, 1998**). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des spécificités et des modes d'utilisation particuliers qui ont donné naissance à une nouvelle branche de la phytothérapie : l'aromathérapie. Du point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les Huiles essentielles (HE) sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols, et d'autres éléments (**Allinger et al., 1979**).

Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille. Par contre, elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool (**Binet et al., 2001**).

Contrairement aux autre huile grasses qui, habituellement dissoutes dans les essences laissent une tache transparente sur le papier, les HE disparaît rapidement car les essences végétales sont très volatiles, grâce à cette propriété, les essences végétales diffusent rapidement au travers des épidermes, même pour des cuticules épaisses et se répandent dans l'atmosphère, ce caractère et associé à l'odeur très prononcée, et souvent agréable qui les rend responsables de l'odeur caractéristique de nombreux végétaux odoriférants (**Binet. et al., 2001**).

IV.6.1.2. Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité acceptable, chez environ 2000 espèces, réparties en 60 familles (**Richter, 1993**).

Ces essences se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, dans une même plante, ces huiles peuvent être excitées à la fois dans différents organes, ou la composition chimique peut varier d'un organe à un autre, les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (**Binet et al., 2001**).

Ces composés aromatiques sont élaborés par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante, au sein du cytoplasme de certaines cellules ou elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes, ensuite elles sont stockées dans des cavités, les cellules sécrétrices sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante ce qui facilite leur émission (**Bruneton, 1990**).

IV.6.1.3. Rôles des huiles essentielles chez les plantes

Les HE ont des fonctions multiples dans la nature, actuellement, il est difficile de préciser dans tous les cas, néanmoins qu'il semble probablement qu'elles aient un rôle écologique, car dans les régions désertiques, elle conserve l'humidité autour de la plante ce qui empêche la température d'augmenter d'une manière excessive pendant le jour et de baisser au cours de la nuit (**Belaiche, 1979**).

En effet expérimentalement, il a été établi qu'elle exerce des interactions sur les végétaux et sur les animaux, ainsi elle constitue un moyen de communication (**Bruneton, 1993**), certaines essences attirent les insectes et favorisent la pollinisation tandis que d'autres servent à la défense des plantes contre des prédateurs (herbivores, insectes, micro-organismes) (**Capo et al., 1990**).

Toutefois la fonction des essences au sein des plantes reste encore un phénomène assez obscur (**Rai et al., 2003**).

IV.6.1.4. Composition chimiques des huiles essentielles

La composition des HEs est généralement très complexe, à la fois par la diversité considérable de leurs structures et par le nombre élevé des constituants présents, ces derniers appartenant à deux grands groupes.

⚡ Le premier groupe est celui des terpénoïdes, ce sont des hydrocarbures de structures très diverses (acycliques, monocyclique, bicyclique) constituant une chaîne plus au moins longue. Les molécules de cette famille sont formées de l'assemblage de deux ou plusieurs unités isoprénique (**figure 7**), unité composée de cinq carbones isoprénique de formule brute (C_5H_8) (**Allenger et al., 1975**), sur ce squelette de base se trouve souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnel semblable ou différent.

La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atome d'oxygène et pour quelque groupes fonctionnels azoté ou soufré. Selon le nombre de résidus isoprènes que groupent les composés terpéniques, on distingue souvent des terpènes simple ou monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), des sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) et rarement en trouvent des diterpènes ($C_{20}H_{32}$).

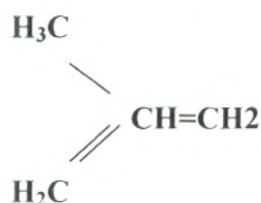


Figure 7: Unité isoprénique

⚡ Le second groupe est celui des composés aromatiques dérivés de phénylpropane qui sont moins fréquents que les terpénoïdes (**Sovoboda et Hampson, 1999**).

Entre ces deux catégories de composés, il existe naturellement d'autres corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines essences (esters, aldéhydes, alcools...) (**Bruneton, 1993**).

IV.6.1.5. Propriétés et utilisation

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les HE. Respirer une odeur agréable, celle d'une rose ou d'un fruit bien mûr procure une sensation de bien-être (**Blayn, 1980 ; Maach et Jemalia, 1986**). Respirer l'odeur agréable d'une HE procure une sensation de bien-être doublée d'un effet sur la santé. En effet, toutes

les HE ont une ou plusieurs vertu(s) particulière(s). Des mélanges des HE destinés à être diffusés sont conçus par exemple pour créer une synergie entre les huiles et exercer un effet sur l'organisme et le cerveau. Lorsqu'on sait que les odeurs que l'on perçoit sont recueillies dans le cerveau par l'hémisphère relié aux émotions, on comprend mieux l'impact que peuvent avoir ces huiles. Ces HE agissent selon leur tropisme ; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent dans les tissus et l'organisme. Par exemple, l'HE de basilic est particulièrement actif au niveau de la digestion. Celle de Cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu (**Blayn, 1980 ; Maach et Jemali, 1986**).

IV.6.1.6. Autres propriétés

✚ Antibactérienne

En phytothérapie les HE's sont utilisées contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires . Elles représentent aussi des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants étant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Billerbeck, 2007**). Cette activité antimicrobienne est principalement en fonction de leur composition chimique, et en particulier de leurs composés volatils majeurs (**Mebarki, 2010**). Les plantes aromatiques, les épices et leurs HE's sont utilisées depuis des siècles dans la préparation alimentaire non seulement pour la flaveur qu'elles apportent, mais aussi comme conservateurs, pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (**Mebarki, 2010**).

✚ Antivirale

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (**Roger, 1984**).

✚ Antifongique

Les HE sont utilisés contre la microflore d'origine fongique comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes (**Billerbeck, 2002**).

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain (**Singh, 1983**).

✚ Antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites (**Singh et al., 1983**).

✚ Antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (**Singh, 1983**).

✚ Effet insecticide des HE

Depuis que les grains sont stockés par l'homme, le problème de leur conservation est posé.

L'effet consiste à mettre hors d'atteinte des intempéries, des déprédateurs et des parasites, des masses de grains plus ou moins importantes pour des durées variables. Le stock de céréales constitue une entité formée d'une part de la céréale à stocker et d'autre part de l'environnement dans lequel il évolue et où il subit diverses agressions. Ces agressions d'origines biologiques sont dues à des êtres vivants (rongeurs, oiseaux, insectes, acariens et microorganismes). Ce sont les insectes et les acariens en particulier, qui causent le plus de dégâts aux denrées stockées. L'HE de *Mentha rotundifolia* s'est révélé toxique pour les insectes plus particulièrement les espèces de *Coleopteres* (**Fournier, 1948**).

IV.6.1.5 Origine biosynthétiques des terpènes

Les principales étapes de la formation des terpènes sont (**figure 8**)

➤ L'auto-condensation de l'acétyl-coenzyme A : ce dernier est condensé avec une autre molécule de même type qui conduit après réduction et hydrolyse à l'acide mévalonique .

➤ l'acide mévalonique est activé enzymatiquement par phosphorylation, fourni le pyrophosphate est donne du phosphate d'isopentén,-3-yle (PPI_3) par une réaction d'élimination et de décarboxylation

➤ une fraction PPI_2 est isomérisé enzymatiquement en pyrophosphate de diméthylallyle l'action de PPI_3 sur PPI_2 conduit par une liaison tête-queue de pyrophosphate de géranyle (PPG). Pour *M. rotundifolia* : L'analyse qualitative de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* montre la présence des composés réunis dans le Tableau 5 ci-dessous, qui contient des monoterpènes, des sesquiterpènes et d'autres composés organiques. A partir de notre spectre, on voit bien que les monoterpènes sont plus volatiles que les sesquiterpènes.

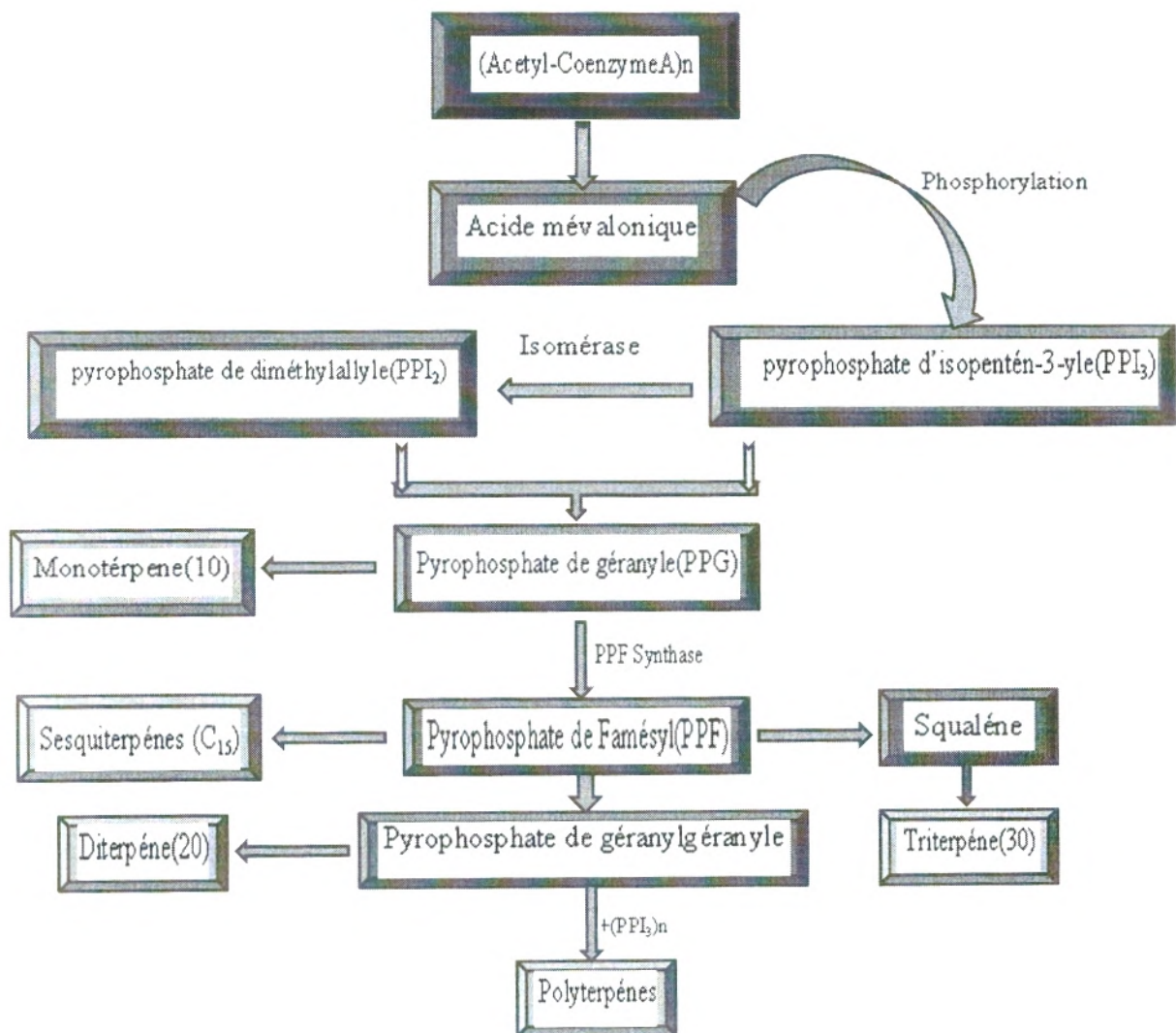


Figure 8 : La Biosynthèses des différents terpènes chez les plante (Dubey et al., 2003)

IV.6. 1.6. Activité liée à la composition chimique (notion de chemotype)

Une même plante aromatique présentera une composition différente en HE, suivant les parties utilisées, la période de cueillette, la localisation géographique et même suivant le protocole d'extraction ou le mode d'utilisation (**Iserin, 2001**). C'est la notion de chemotype qui présente de grandes variabilités, quantitatives et qualitatives et qui explique les divergences des résultats rapportés pour une plante donnée (**Garreta, 2007**).

Le principal facteur modulant le spectre d'activité des HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans les HE ; ainsi *in vitro* on observe une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison aux terpènes à hydrocarbures. (**Dorman et Deans, 2000**). La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que le degré d'oxydation de la molécule de terpène : la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminantes vis-à-vis de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes (**Dorman et Deans; 2000**). Sur cette base l'ordre de l'activité antimicrobienne de ces composés est le suivant : (**Ouraini et al., 2007 ; Bekhechi et al., 2008**).

Phénols > Alcools > Aldéhyde > Cétones > Oxydes > Hydrocarbure > Esters.

Le pouvoir antimicrobien des HE est probablement en rapport avec leur fort contenu phénolique, (**Sokmen et al., 2007**), mais les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité, la totalité de la composition chimique devant être prise en compte (**Cosentino et al., 1999 ; Lahlou, 2004**) a montré que les activités antimicrobiennes antivirales, insecticides, larvicides des extraits totaux des HE sont supérieures à celle des composés majoritaires testés séparément. Ces données ont été confirmées par (**Rota et al., 2008**) dans une étude *in vitro* sur les microbes pathogènes isolés des aliments.

IV.6.2. Les saponosides

IV.6.2.1 Définition

Les saponosides dérivent du mot latin « sapon ». Comme le savon Se sont des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpénique (**Robinet, 1951**). Souvent amers, amphiphiles aux propriétés tensioactives utilisées dans la fabrication de détergents

aussi ils sont solubles dans l'eau qui leur permet le contrôle de la stabilité membranaire des cellules.

IV.6.2.2. Propriétés biologiques des saponosides

Les saponosides ont une activité expectorante, ils rendent un peu moussant la muqueuse des bronches inflammatoires et facilitent l'expectoration. De plus, ils sont de puissants hémolysants, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (**Bruneton, 1999**).

D'autre part les travaux de (**Steinmetz et al., 1993**) ont mis en évidence l'activité antifongique, antibactérienne et antitumorale de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes. En peut classer les saponoside en deux groupes

- ❖ les saponosides à génine triterpenique ;
- ❖ les saponosides à génine Steréoidique (**Bruneton, 1999**).

IV.6.3. Les stérols et stéroïdes

Ce sont des composés terpéniques se présentant sous forme d'alcool libre ou sous forme d'esters associés par le glucose (**Linden et Lovient, 1994**). Ils jouent un rôle important dans la qualité des graisses et les huiles (**Kamm et Dionisi, 2001**).

Ils sont indispensables pour couvrir les besoin dans l'industrie pharmaceutique spécialement en médicaments stéroïdique, ils sont aussi utilisés dans divers domaines : antiviraux, insecticides et analgésiques (**Connolly et Hill, 1991**).

IV.6.4. Alcaloïdes

IV.6.4.1. Définition

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle, on les trouve chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et dans certains micro-organismes. La majorité est des hétérocycles azotés sauf pour quelques substances dans les quelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine par exemple). Il se trouve à l'état de sel biosynthétiquement formé à partir des acides aminés Il existe plus de 6000 alcaloïdes mais ce nombre augmentation constamment (**Judd et al., 2002**).

IV.6.4.2. Propriétés biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un groupe hétérogènes ils sont généralement de goût amer (**Bruneton, 1999**). Se sont des substances intéressantes par leur activité pharmacologique

dans des domaines varies, Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique. Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison "ine" (Bruneton, 1999).

IV.6.4.3. Définition de l'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Le contact se fait par l'intermédiaire du disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée des extraits de plante. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère et Avril, 2002). L'aromatogramme se réalise aussi sur un milieu liquide par la méthode des disques (Belaiche, 1979).

V. Méthodes d'analyses chromatographiques

V.1. Introduction

L'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différents techniques de séparation est d'identification, demeure toujours une opération délicate nécessitant la mise en œuvre simultanée ou successive de diverses techniques.

Elle est basée sur la purification des constituants par différents méthodes chromatographiques: citons l'exemple de chromatographie sur couche minces (CCM), chromatographie liquide haute performances (HPLC), chromatographie phase gazeuse (CPG), spectrométrie de masse (MS) (Cooper, 1980 ; Silverstein *et al.*, 1990) .

V.2. La chromatographie en phase gazeuse(CPG)

Le CPG est une méthodes usuelle des huile essentielles (figure 9), c'est une techniques de séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisé par chauffage sans décomposition (Arpino *et al.*, 1995) , c'est une analyse quantitatives des résultats obtenu à partir d'un volume d'injection réduit .

La particularité de CPG, est l'inertie de la phase mobile (Azote, hélium,...), qui ne joue le rôle que d'un vecteur. La séparation dépend donc uniquement à l'interaction des analytes et la phase stationnaire qui peut être de plusieurs types (**Judeinstein et al., 1999 ; Rogalska et al., 2001**). Malgré tout ceci ne peut suffire pour une bonne identification, sans l'apport du couplage entre le CPG est une technique d'identification spectroscopique : en général la spectroscopie de masse (CPG/MS) qui est applicable pour un grand nombre de substance organiques, aussi bien gazeux que liquide.

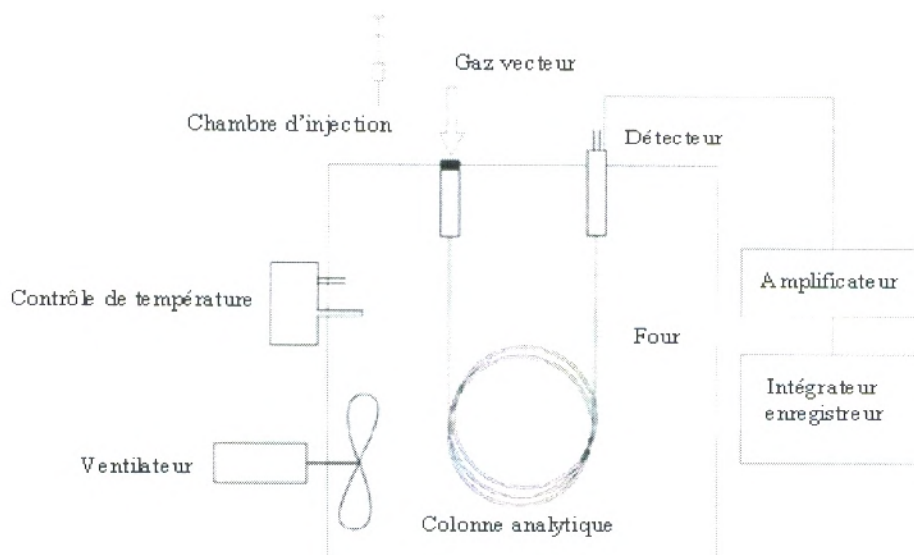


Figure 9 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

V.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

Cette technique permet d'obtenir à la fois des temps de rétention des constituants volatiles de l'échantillon pour un programme donné et leur spectre de masse (**Figure 10**) , il permet de connaître dans la majorité des cas la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structural relatives a une molécule a partir de sa fragmentation , ces molécules son bombardée a l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse, qui sont en suite diriges vers la partie analytique de l'appareil (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**) .

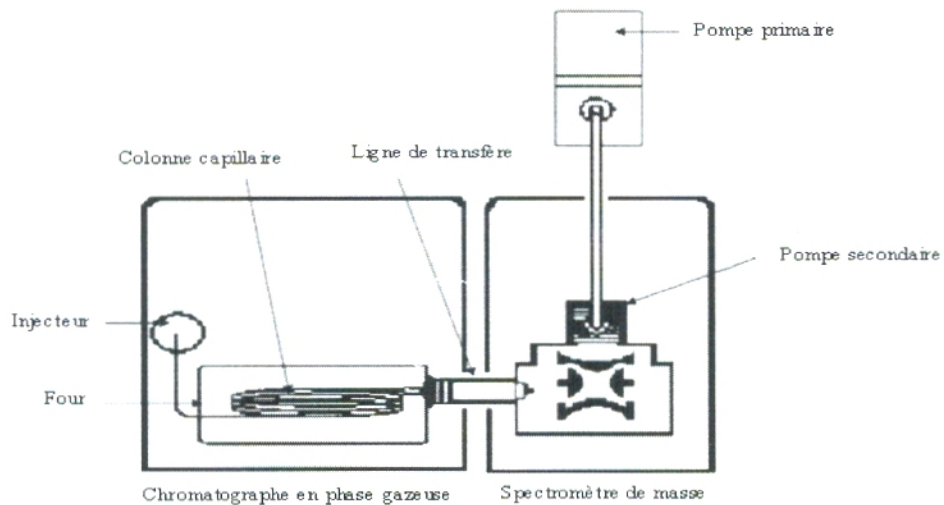


Figure 10 : Schéma d'un couplage CPG/SM

CHAPITRE II

Partie expérimentale

I. Matériel végétal

I.1. Origine géographique et période de récolte de la plantes

L'espèce sélectionnée *Mentha rotundifolia* a été récoltée au mois de mars avant floraison dans la région de Meftahia à environ 20 Km au nord ouest de la wilaya de Tlemcen (Algérie) (**Figure11**). Cette espèce est très utilisée par la population locale. La situation géographique et les coordonnées de site de prélèvement sont présentées dans le tableau suivant(**Tableau1**).

Tableau 1 : Situation géographique de site de prélèvement

| Région | latitude | longitude | Etage bioclimatique |
|----------|----------|-----------|--------------------------------------|
| Meftahia | 34° 73 | 1°60 | Subhumide inférieur à climat tempéré |

I.2. Identification botanique

L'espèce a été identifié par le professeur **Benabadji N.** du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes naturels, université de Tlemcen.

I.3. Préparation des échantillons

La plante récolé et trié, ensuite les feuilles et les tiges sont isolées séparément puis séchées à l'air libre, à l'ombre et à température ambiante pendant huit jours, après ils sont broyées au mortier.

Ces poudres résultantes sont Conservées dans des bocaux en verre, hermétiquement fermés et conservées à basse Température au congélateur. Ces poudres seront soumises à des tests qualitatifs afin de détectés la présence des différentes classes de composés chimiques dans l'espèce *Mentha rotundifolia*.



Légende de la carte

— :Route principale

— :Route secondaire

— : Retenue, Sebkhia, Chott



Station de récolte

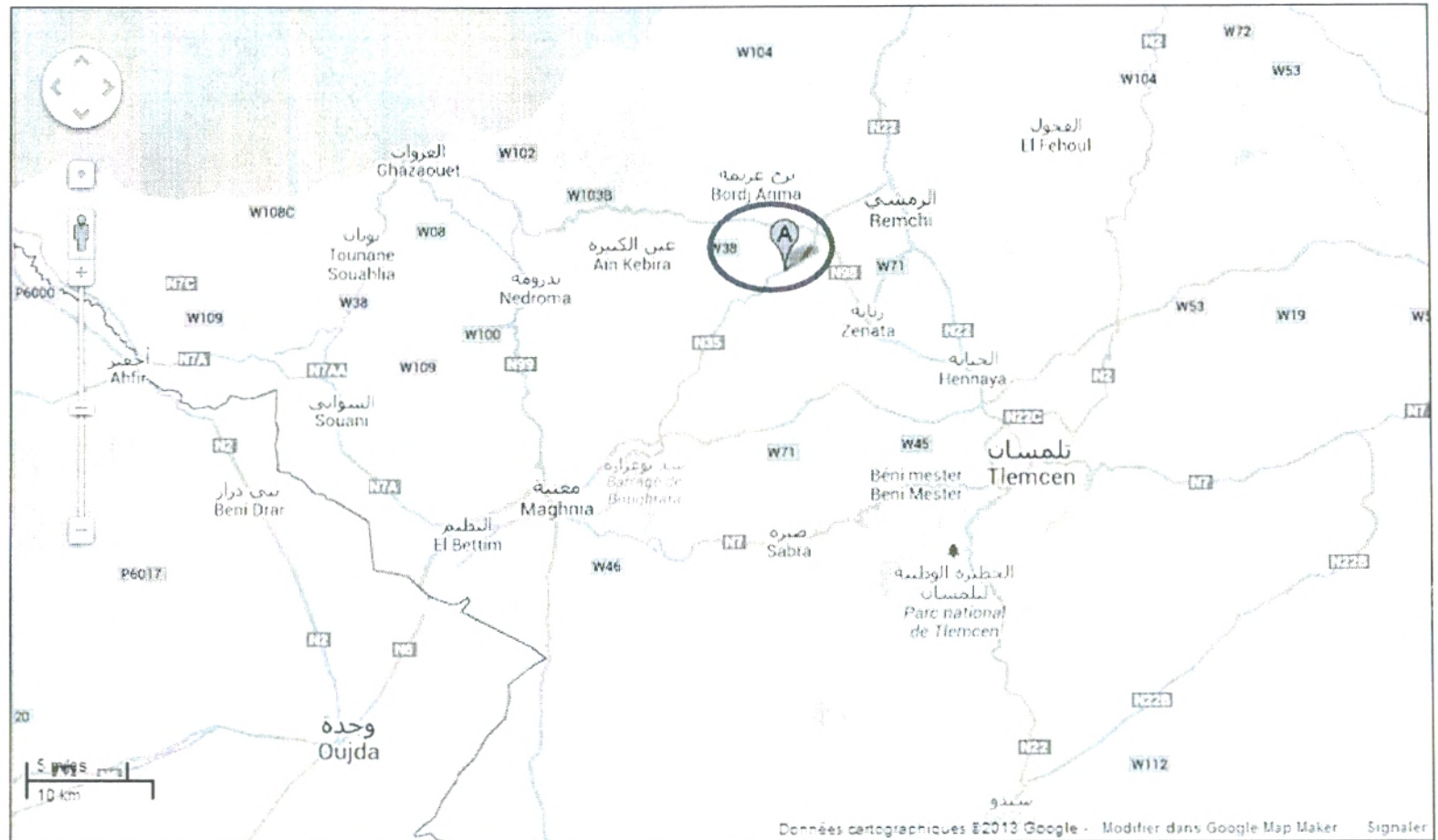
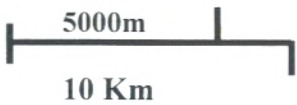


Figure 15: Carte géographique de la région de récolte –Meftahia- (Tlemcen)(Google earth)

II .Tests phytochimiques

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante. Trois solvants de polarités différentes (eau, éthanol, éther diéthylique) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

II.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud

50 g de matériel végétal broyé est mis en contact avec 300 ml d'eau dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux différents tests (**Annexe Ij**).

II.1.1. Amidon

C'est un sucre complexe sous forme d'homopolymère de D-glucose, il se trouve comme substance de réserve principale du règne végétale.

Le test effectué (**Guignard, 1979**) consiste à :

- Chauffer 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain Marie jusqu'à l'ébullition ;
- Ajouter le réactif d'amidon qui est l'eau iodée.
Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée

II.1.2. Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse (**Bruncton, 1999**). Leur détection est réalisée en ajoutant 1 ml d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après une forte agitation d'une minute, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée par la mesure de la hauteur de la mousse:

- ❖ Pas de mousse = test négatif (-)
- ❖ Hauteur de mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+)

- ❖ Hauteur de mousse de 1 à 2cm = test positif (++)
- ❖ Hauteur de mousse plus de 2cm = test très positif (+++)

II.1.3. Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait aqueux, 1ml d'eau distillé et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (**Trease et Evans, 1987**).

II .1.4. Les anthraquinones

La détection des anthraquinones consiste à (**Bruneton, 1999**).

- Traiter 1g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5N) et 1 ml H_2O_2 dilué à 5% ;
- Bouillir et refroidir le mélange ;
- Filtrer, puis acidifier le filtrat avec de l'acide acétique ;
- Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de toluène ;
- Agiter l'extrait de toluène en présence de 5 ml de NH_4OH ;

Une réaction positive est révélée par formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

II.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol

50g de matériel végétal broyer est mise en contact avec 300 ml d'éthanol dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et l'extrait éthanolique est soumis aux différents tests (**Annexe II**).

II.2.1. Les flavonoïdes

La mise en évidence des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1ml d' HCl concentré et 0,5g de tournure de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rose ou rouge qui se développe après 3 minutes (**Bruneton, 1993**).

II.2.2. Les alcaloïdes sels

Leur détection consiste à : (**Memelink et al., 2001**)

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait éthanolique ;
- Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu obtenu, puis chauffer dans un bain marie ;
- Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH₄OH (10%) jusqu'au pH 9 ;
- Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec ;
- Dissoudre le résidu dans du HCl (2%) ;
- Tester la présence des alcaloïdes par quelques gouttes de réactif de Mayer et Wagner afin d'obtenir un précipité blanc et un précipité brun respectivement indiquant leur présence.

II.2.3. Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique ; 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition (**Trease et Evans, 1987**)

- ❖ une coloration bleu-noire indique la présence des (tanins galliques).
- ❖ Une coloration bleu-verte indique la présence des (tanins catéchiques)

II.2.4. Les anthracénosides, coumarines et anthocyanosides

Pour mettre en évidence ces composés, il faudra suivre les étapes suivantes (**Bruneton, 1999**) :

- Ajouter 15 ml d'HCl (10%) à 25 ml de l'extrait éthanolique ;
- Porter l'ensemble à reflux pendant 30 minutes ;
- Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther diéthylique;
- Ensuite, chacune des ces familles est détectée séparément

a. Les anthracénosides

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Bornträger, en traitant 8ml de la solution extractive éthanolique par ce dernier. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée-rouge au violet- pourpre (**Bruneton, 1999**).

b. Les coumarines

Leur détection consiste à :

- Evaporer à sec 5 ml de la solution extractive étherique
- Le résidu obtenu est repris dans 2 ml d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties ;
- Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH à (10%) ;
- Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense (**Bruneton, 1999**).

c. Les anthocyanosides

Le test effectué consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution NaOH.

Les anthocyanosides ont des colorations variant en fonction du pH.

- Coloration rouge stable en $\text{pH} < 3$,
- Coloration bleu en milieu en $4 < \text{pH} < 6$

D. Les stérols et stéroïdes

- Deux essais ont été effectués (**Linden et al., 1994**) :

❖ **Essai 1** : il consiste à :

- Evaporer à sec 10 ml d'extrait éthanolique;
- Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer;
- Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique;
- Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré;
- Agiter, puis laisser la solution reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C).

❖ **Essai 2** : Il consiste à :

- Evaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme, puis filtré ;
- Traiter le filtrat par la réaction de Liebermann-Burchardt.

Si cette réaction donne une.

- Coloration verte-bleue indique la présence des hétérosides stéroïdiques
- Coloration verte-violette, indique la présence des triterpéniques

II.2.6. Les composés réducteurs

Les glucides, (hydrate de carbone), sont des composés organiques carbonyles qui peuvent être trouvés sous forme aldehydique ou cétonique. Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffé. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

II.3. Epuisement du matériel végétal avec l'éther diéthylique

50g de matériel végétal broyé est mis en contact avec 300 ml d'éther diéthylique dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble est porté à reflux pendant 1 heure. Le mélange est filtré et l'extrait étherique est soumis aux différents tests (**Annexe III**).

II.3.1. Les huiles volatiles

La détection des huiles volatiles consiste à : (**Harborne, 1973**)

- Evaporer à sec 20 ml de l'extrait étherique ;
- 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.

II.3.2. Les acides gras

L'essai effectué consiste à : (**Harborne, 1973**)

- Concentrer à sec 20 ml de la solution étherique ;
- 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.

II.3.3. Les alcaloïdes bases

La détection des alcaloïdes consiste à : (**Memelink et al., 2001**)

- Evaporer à sec 10 ml de l'extrait étherique ;
- Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml d'HCl (2%) ;
- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

II.4. Réactifs et réactions de caractérisation

Les réactifs utilisés au cours de ces tests sont :

✚ **Réactif d'amidon** : Dissoudre 1,2g d'iode (I_2) 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 I_2 dans 75ml d'eau distillée. Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

✚ **Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358g de $HgCl_2$ 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 de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

III. Préparation des extraits bruts secs

III.1 Préparation des extraits aqueux

10 g de poudre de la plante a été portée à reflux pendant 2 heures dans 150 ml d'eau distillée, puis filtrés ; ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à 65°C au Rotavapeur (Laborta LX-4000). Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement pour les tige et les feuilles (Majhenic *et al.*, 2007).

III.1.2. Préparation des extraits bruts méthanoliques

Une prise d'essai de 2,5g de poudre de chacune de la plante a été mise à macérer dans 25ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 30 minutes. L'extrait a ensuite été stocké à 4°C durant 24 heures, filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au Rotavapeur. Le résidu sec pesé est repris par 3ml du méthanol et conservé à -18°C (Falleh *et al.*, 2008).

❖ Calcul du rendement

Le pourcentage en extrait brut sec méthanolique et aqueux a été calculé par la Formule suivante :

$$\mathbf{R(\%) = M / M_0 \times 100}$$

- **R (%)** : Rendement exprimé en %.
- **M** : Masse en gramme de l'extrait sec en gramme
- **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

III.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction est présentée, la plus part du temps comme un procédé de séparation par le quel un matériau peut être traité par différentes méthodes.

Dans le cas particulier des huiles essentielles, l'extraction se fait de généralement par entrainement à la vapeur d'eau, cette méthode est basée après condensation sur la différence de composition entre l'eau et la vapeur produite pendant l'exécution unitaire (**Rose, 1965 ; Lawer, 2000**).

❖ **Technique d'extraction** : Entrainement à la vapeur d'eau

Le montage utilisé est constitué d'un ballon métallique contenant 5 l d'eau, posé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte contenant le matériel végétal placé sur une grille (figure 12). L'enceinte est reliée à son tour à des réfrigérants qui condensent les vapeurs que l'on recueille sous forme de distillat dans une fiole à décanter. Cette phase est séchée sur du sulfate de magnésium. L'échantillon d'huile essentielle obtenu est conservé à -18°C jusqu'à analyse.

❖ **Calcul du rendement**

$$\mathbf{R(\%) = M / M_0 \times 100}$$

- **R (%)** : Rendement exprimé en %.
- **M**: Masse en gramme de l'extrait sec en gramme
- **M₀** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

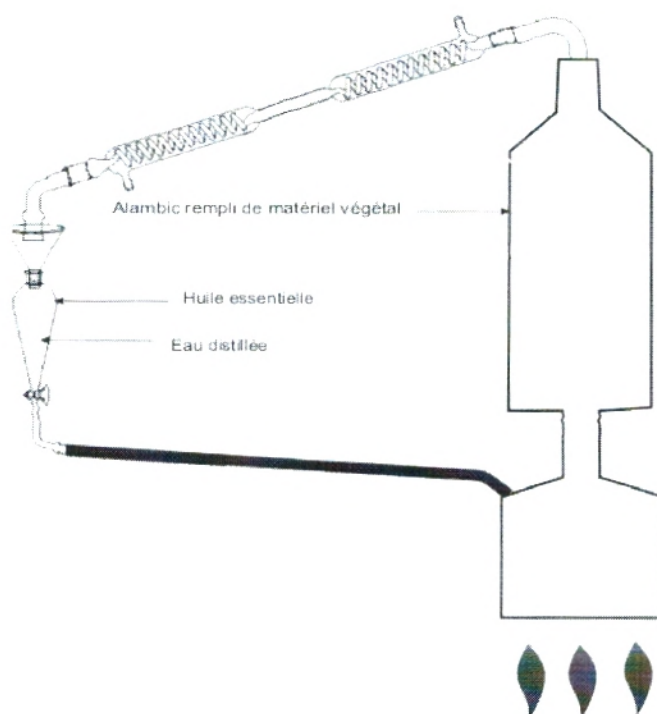


Figure 12 : Appareillage d'extraction (montage au laboratoire)

IV. Identification des huiles essentielles

Dans notre étude, l'analyse qualitative et quantitative des HE a été faite par la méthode Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG-SM)

IV.1. Analyse de la composition chimique par CPG-SM

IV.1.1. Principe

Cette technique d'analyse est réalisée pour déceler la composition des huiles essentielles, elle permet à la fois d'obtenir les temps de rétention des constituants volatiles de l'échantillon pour un programme donné et leurs spectres de masse (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (CPG-MS) est une technique d'analyse qui possède plusieurs atouts : le chromatogramme en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange. Le spectromètre de masse associé permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et bien souvent de les identifier.

Leur association permet de disposer d'un outil analytique très performant. L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nanogramme, la détection par fragmentométrie est possible jusqu'au picogramme. Il réclame peu d'échantillon, la quantité injectée est de l'ordre du microlitre. Il est rapide, le temps d'acquisition du spectre est identique à celui de l'analyse chromatographique. Pour réaliser nos spectres, nous avons utilisé le mode SCAN

Le mode SCAN : on réalise un balayage sur une gamme de masse prédéterminée. Il est à noter que plus on réalise un balayage de masse sur une gamme large, moins on sera sensible.

IV.1.2. Conditions Opératoires

Les paramètres de l'instrument sont :

- Méthode SCAN en IE
- Chromatographe Water
- Injecteur : injection manuelle, à pression constante : 2,15 psi, volume injecté : 2 μ l
- La colonne est capillaire DB-5, longueur 30 m, diamètre 250 μ m sa température maximal : 325°C
- La température initiale du four 40°C, montée en température 10°C/min
- La température finale 250°C, le temps total de l'opération 32 min
- Mode avec division
- Spectromètre de masse « Perkin Elmer » Le gaz vecteur est l'Hélium (He) à 1ml /min
- L'appareil est piloté par un système informatique, gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

V. Pouvoir antimicrobien

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique de chaque extrait des feuilles et des tiges de *Mentha rotundifolia* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, moisissures et levures. Ces extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont à l'origine et permettraient, à partir du présent travail, d'ouvrir d'autres pistes à la recherche. Afin de mettre en évidence l'effet antimicrobiens *in vitro* des différents composants de note plante étudier (aqueux, méthanolique et huile essentielle), nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu de Mueller-Hinton gélosé ou L'aromatogramme (**Lesueur et al., 2007**)

Les résultats obtenus sont comparés à ceux d'un antibiotique et d'un antifongique testés sur les mêmes souches bactériennes et fongiques.

❖ Calcul de volume ajouté

Les extrait aqueux et méthanolique récupérés sont solubilisés séparément dans du DMSO pour obtenir des concentrations de 100mg/ml. Après récupération des extraits en procédant à un séchage de 40°C à 35°C à l'étuve, dans des boîtes de pétrie en verre préalablement séchées et pesées (M_0) le poids final est (M_1).

- $V = \frac{M_1 - M_0}{C}$
- M_0 : masse boîte vide
- boîte pétrie vide
- M_1 : masse boîte pétrie après séchage
- C : concentration voulue (100mg /ml)

V.1. Provenance des germes étudiés

Les souches étudiées ont été fournies par M^{me} Bekhechi (**Tableau 2**). Elles sont responsables de nombreuses maladies qui affectent actuellement l'homme, les animaux et les plantes qui, dans certaines conditions, se comportent en contaminants, provoquant ainsi d'importantes mycoses, des allergies et des intoxications.

Tableau 2: Provenance des germes étudiés

| Souches utilisés | Code de la souche | Provenance |
|-------------------------------|-------------------|--|
| a-Bactéries : | | |
| Bactéries à Gram (+) : | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | |
| <i>Enterobacter faecalis</i> | ATCC 29212 | |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 10876 | |
| Bactéries à Gram (-) : | | |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | Laboratoire des produits naturels LAPRONA Université de Tlemcen |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | ATCC 13311 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 700603 | |
| | | |
| b-Moisissures : | | |
| <i>Aspergillus flavus</i> | MNHN 994294 | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | MNHN 963917 | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | MNHN 566 | |
| c- Levure : | | |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 | |

MHN : Muséum National d'Histoire Naturel, Paris

V.4. Préparation de l'inoculum

V.4.1.. Pour les bactéries

Les souches, conservées sur gélose nutritive inclinée à 4°C, sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 37° C ±1° C pendant 24 h, puisensemencées sur boites contenant de la gélose nutritive pour vérifier leur pureté.

Après 24h d'incubation à 37°C, les souches bactériennes sontensemencées sur bouillon nutritif puis remettre en incubation à 37° ± 1° C pendant 18 h.

De cette dernière culture, on prélève quelques gouttes et on les mets dans 9 ml d'eau physiologique stérile à 0.9. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10, soit environ 10⁸UFC/ml (Pessini et al., 2003). La suspension bactérienne est ensuite diluée à 1/10 pour les staphylocoques et à 1/100 pour les autres souches bactériennes.

V.4.2. Pour les moisissures

La suspension de spores a été préparée dans l'eau physiologique et la concentration a été ajustée à 10⁶ spores/ml ce qui correspond à une transmittance de 0.68 à 0.82% lue à 530 nm (Pfaller et al., 2000 ; Sala et al., 2003). Ces spores proviennent d'une culture de 7 jours en boites de pétri.

V.4.3. Pour les Levure

Les levures sont revivifiées dans du bouillon nutritif à 30° ±1° C pendant 48 h, puis cultivées sur boite contenant du milieu de Sabouraud pendant 24 h à 48 h (pour vérifier leur pureté), ensuite, elles sont cultivées dans du bouillon nutritif pendant 24 à 48 h.

Après incubation, un certain volume de cette culture est dilué dans de l'eau physiologique pour avoir une densité optique entre 0.12 et 0.15 à 530 nm, soit environ 1à 5×10⁶ UFC/ml (NCCLS, 2001).

V.5. Méthodes d'étude de l'activité antimicrobienne

V.5.1. Aromatogramme (méthode de diffusion sur disque)

En parallèle, nous avons utilisé un disque témoin négatif imbibé par 20µl de DMSO. Après incubation à 37°±1° C pendant 24 h pour les bactéries ; à 30°±1° C pendant 48h pour la levure et à 25°±1°C pendant 48h pour les champignons filamenteux, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm (disque inclus).

CHAPITRE III

Résultats et discussions

I. Test phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à déceler les différents composés existants dans les feuilles et les tiges de l'espèce *M. rotundifolia* Par des réactions qualitatives de caractérisation qui sont basées sur des phénomènes de coloration ou de précipitation par des réactifs typiques à chaque famille de composé (**Annex I**).

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles et tiges de la plante étudiée *M. rotundifolia*, traité par l'eau, l'éthanol et éther diéthylique sont regroupés dans le (**tableau 4**).

Dans les feuilles ainsi que les tiges de la plante, la recherche les alcaloïdes, les composés réducteurs, les amidons, les anthracénosides, les coumarines, les anthraquinones, les alcaloïdes bases, les acides gras, les anthocyanosides, été négatifs, par contre celle des huiles essentielles, des tanins, des flavonoïde, ont été positifs.

Il est a signalé que les stérols et stéroïdes sont présents en faible quantité dans les tiges mais se trouve moyennement dans les feuilles,

D'autre part les saponosides sont de classe de familles chimiques faiblement caractérisée dans la plante étudiée.

Tableaux 4 : Résultats des tests phytochimiques sur les feuilles et tiges

| Classes recherchées | <i>M. rotundifolia</i> (feuilles) | <i>M. rotundifolia</i> (tiges) |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Flavonoïdes | ++ | ++ |
| sels Alcaloïdes | - | - |
| Tanins | +++ | ++ |
| Composés réducteurs | - | - |
| Amidon | - | - |
| Stérols et stéroïdes | ++ | + |
| Saponosides | + | + |
| Anthracénosides | - | - |
| Coumarines | - | - |
| anthraquinones | - | - |
| Huiles volatiles | +++ | +++ |
| Alcaloïdes bases | - | - |
| Acide gras | - | - |
| Anthocyanosides | - | - |

- : Test négatif : Absence de turbidité et de floculation

+: Test faiblement positif : présente une légère opacité

++ : Test positif : s'il y'a une turbidité mais non une floculation (présence de précipité en Moyenne quantité)

+++ : Test fortement positif : si il y'a une réaction de floculation ou présence d'un précipité Lourd en grande quantité.

I.1. Rendement en extraits bruts secs

Les résultats obtenus (**figure 13**) montrent que des rendements élevés en extrait aqueux des feuilles *Mentha rotundifolia* est de 32.85 % est légèrement faible, dans les tiges 26.55 %. Par contre l'extraction méthanolique des feuilles et tiges révèle des taux nettement inférieurs de 8.01% dans les feuilles est de moins dans les tiges d'une valeur de 5.87 % (**AnnexIV**).

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais on a remarqué qu'elle peut varier également en fonction des paramètres de type de l'extraction solide-liquide des composés polyphénoliques ainsi que la température, le type de solvant d'extraction, les dimensions et taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante (**Majhenic et al., 2007**) et qu'ils sont plus élevés pour l'extrait aqueux que méthanolique (**Majhenic et al., 2007**) ce qui est en accord avec notre résultat.

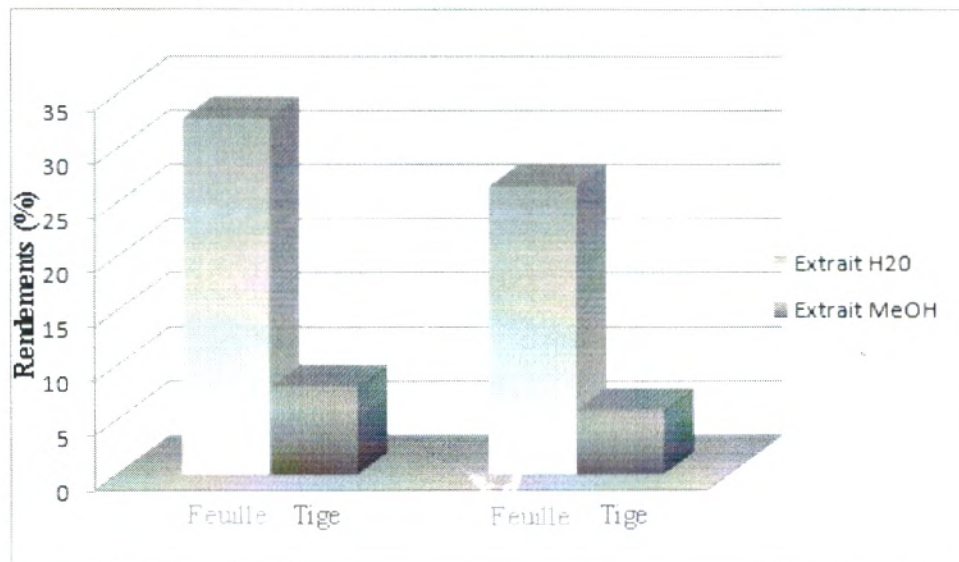


Figure 13 : Rendements (%) en extraits bruts secs de l'espèce étudiée

I.3. Les huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*

I.3.1 Rendement en huiles essentielles

L'huile essentielle de couleur jaune à forte odeur issue de la partie aérienne de *Mentha rotundifolia* a été obtenue par entraînement à la vapeur d'eau avec un rendement de 1,7%.

Ce rendement a été comparé à d'autres travaux sur la même espèce. Notre résultat est inférieur à celui obtenu par **Benayad (2008)** qui de l'ordre de 4.33% pour l'espèce d'origine marocaine alors qu'il est supérieur à celui de **Brada et al. (2007)** (0.8%) pour la même origine Algérie, à celle issue de l'Uruguay 1.02 % (**Daniel et al., 2002**), ainsi qu'à celle du Maroc 1.54% (**Derwich et al., 2010**).

Ces variations dans les rendements sont dues aux conditions environnementales, climatiques, géographique, la période de récolte, aussi la technique de distillation influent sur le rendement (**Lahlou, 2004**).

I.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

L'application de la CPG/SM pour l'analyse de l'huile essentielle des feuilles de *Mentha rotundifolia*, nous a permis de séparer 33 composés, dont 14 identifiés représentant 70.91% de la composition chimique de cette huile (**tableau 5**).

Cette huile est riche en constituants monoterpènes oxygénés notamment la pipériténone est avec un pourcentage de 33.06%, suivi de pulégone (17.12 %). D'autres constituants sont présents en quantités moindres, à savoir la pipéritone (9.21 %) et la menthone (3.31 %) (**figure 13**). Les composés non identifiés au nombre de 19 ont été obtenus avec 29.09%.

Nos résultats ont été comparés avec ceux de la littérature (**Tableau 6**).

Tableau 5 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

| N° de pic | Composés identifiés | TR (min) | Teneur (%) |
|-----------|--|----------|--------------|
| 1 | α -pinène | 5,60 | 0.50 |
| 2 | inconnu | 6.09 | 1.56 |
| 3 | inconnu | 6.31 | 0.99 |
| 4 | β -pinène | 6,35 | 0.12 |
| 5 | inconnu | 6.62 | 1.1 |
| 6 | inconnu | 7.04 | 0.41 |
| 7 | Terpinolène | 7,01 | 0.16 |
| 8 | inconnu | 7,29 | 2.24 |
| 9 | Eucalyptol | 7.36 | 0.07 |
| 10 | γ -terpinène | 7,74 | 0.23 |
| 11 | α -fenchène | 7,94 | 1.41 |
| 12 | Inconnu | 8,23 | 0.04 |
| 13 | Inconnu | 8.57 | 0.12 |
| 14 | Pulégone | 9,52 | 17.12 |
| 15 | Pipéritone | 9,53 | 9.21 |
| 16 | Inconnu | 9.93 | 2.17 |
| 17 | Inconnu | 10,29 | 0.73 |
| 18 | Pipériténone | 11,08 | 33.06 |
| 19 | Menthone | 11,17 | 3.31 |
| 20 | Inconnu | 11.34 | 0.25 |
| 21 | Inconnu | 11.51 | 3.91 |
| 22 | Inconnu | 11.62 | 0.23 |
| 23 | Inconnu | 12.33 | 1.58 |
| 24 | Inconnu | 12.82 | 5.54 |
| 25 | Inconnu | 13.17 | 2.52 |
| 26 | Inconnu | 13,45 | 0.95 |
| 27 | Caryophyllène | 13,74 | 4,09 |
| 28 | Inconnu | 13.87 | 0.29 |
| 29 | 5-méthyl-9-méthylèn-2-isopropyl bicyclo(4.4.0) dec-1-ène | 14.00 | 0.82 |
| 30 | 7-méthyl-10-isopropylbicyclo (4.4.0) dec-1-ène | 14.28 | 0.59 |
| 31 | Inconnu | 15,67 | 2.55 |
| 32 | Inconnu | 15.92 | 1.91 |
| 33 | α -cadinol | 16.41 | 0.22 |

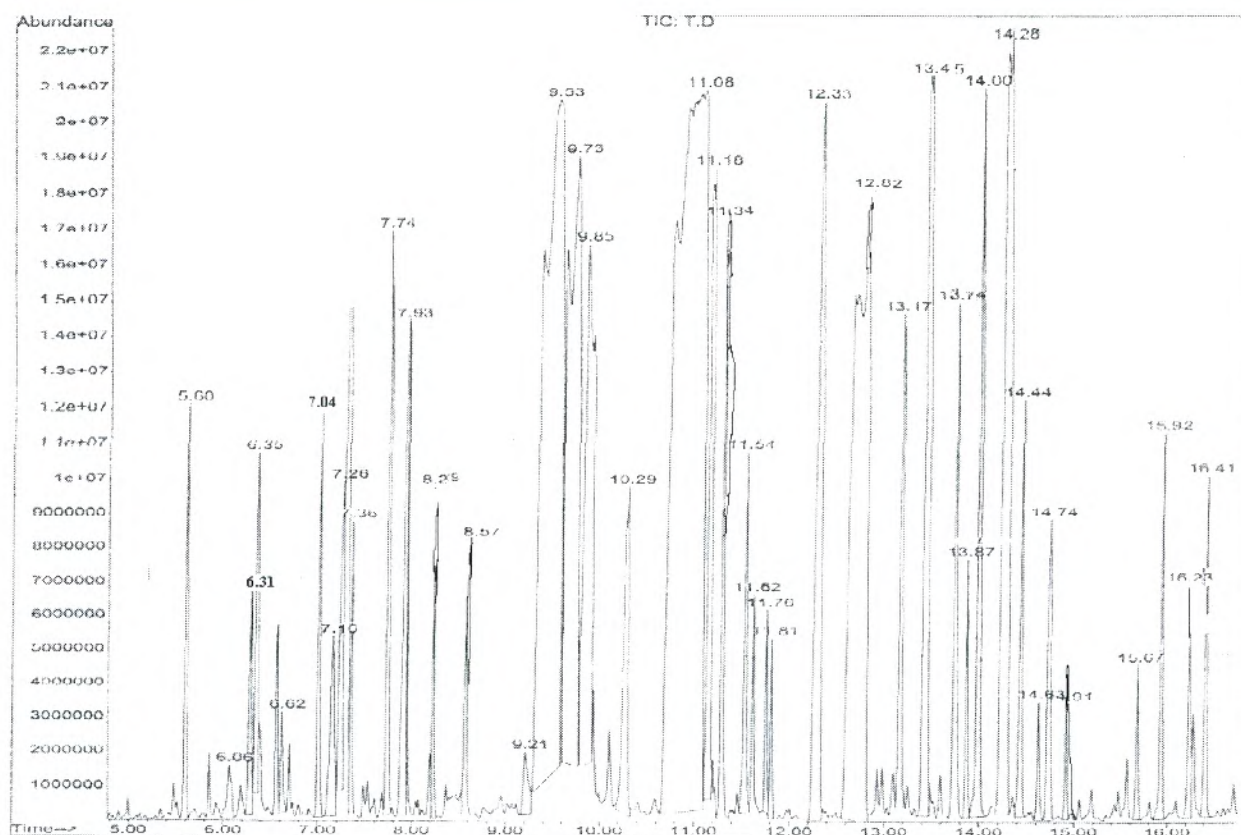


Figure 14 : Chromatogramme en CPG/SM de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*

Tableau 6: Comparaison de teneurs en composés majoritaires de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* avec celles des travaux antérieurs

| Constituants majoritaires en (%) | Partie de la plante | Région | Références bibliographiques |
|---|-------------------------------------|---------|---------------------------------|
| Oxyde de pipériténone (80%) | Partie aérienne pleine floraison | Uruguay | Daniel et al., 2002 |
| Oxyde de pipériténone + Oxyde de pipéritone (88%) | Plante entière pleine floraison | Maroc | El Rahfari et al., 2008 |
| Pipériténone (29.36%) Pipéritone (19.72 %) | Partie aérienne (feuilles et tiges) | Algérie | Brada et al., 2007 |
| Pipériténone (33,03%) Pipéritone (9.18 %) | Partie aérienne pleine floraison | Maroc | Benayad, 2008 |
| Menthol (40.50%) | Feuilles | Maroc | Derwich et al., 2010 |
| Pulégone (85,47%) | Partie aérienne pleine floraison | Maroc | El Arch et al., 2013 |
| Pipériténone (33.06%) Pulégone (17.12 %) Pipéritone (9.21 %) Menthone (3.31 %) | Partie aérienne (feuilles et tiges) | Tlemcen | Travail personnel (2013) |

Nos résultats sont comparables à ceux de **Brada et al. (2007)** effectué sur trois région en Algérie Chlef, Meliana et Rouina, ces essences de la partie aérienne feuilles et tiges présentent les même composés majoritaires pipériténone et pipéritone que de notre échantillon, mais a des proportions différentes.

Cependant la composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* du Maroc (**El Rahfari et al., 2008**) a révélé une dominance des oxydes de pipériténone et de pipéritone En outre l'huile essentielle de *M. rotundifolia* poussant en Uruguay et au Maroc est du caractérisée par une prédominance d'oxyde de piperiténone (80%) et du pulégone (45%) respectivement. Ces différences peuvent être du à l'origine botanique de l'espèce aux conditions environnementales, au stade de maturité, ou de plein floraison et à la partie de la plante traitées.

II. Pouvoir antimicrobien

Depuis l'antiquité l'être humain s'est soigné avec des produits issus de la nature comme les plantes, aujourd'hui il est face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, dont l'efficacité semble décroître de jour en jour, l'homme essaie de trouver de nouvelles molécules naturelle et plus efficaces surtout à partir de plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action des extraits méthanolique, aqueux ainsi que l'huile essentielle de l'espèce végétale *Mentha rotundifolia* vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes.

II.1. Le pouvoir antimicrobien de l'antibiotique

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques, cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zone d'inhibition autour de ces disques. Les mesures de celles-ci sont présentées dans la figure (**Figure14**).

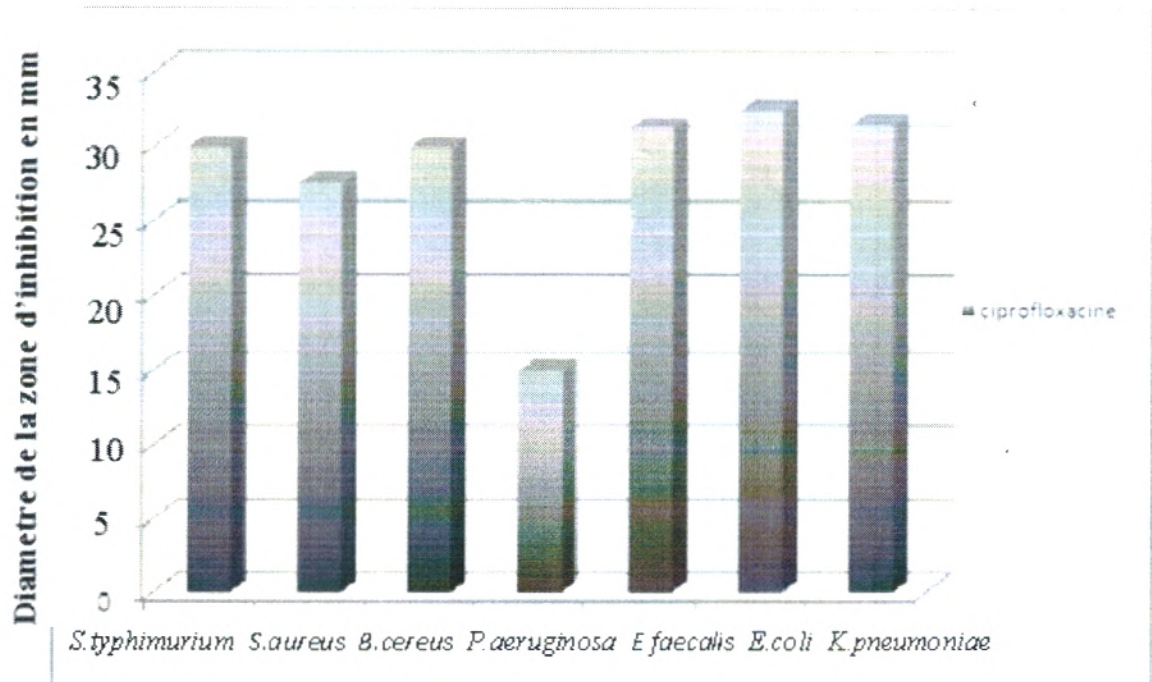


Figure 15: Diamètre des zones d'inhibition de ciprofloxacine relatif aux différentes souches bactériennes étudiées

Les souches ont montré des sensibilités vis à vis des antibiotiques. D'après la **figure 14**, la ciprofloxacine semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de toutes les souches testées sauf pour *P. aeruginosa* qui présente une résistance. On constate que la souche *S. aureus* est moins sensible à l'antibiotique par rapport aux autres souches par contre la souche *E. coli* présente la zone d'inhibition la plus élevée.

II.2. Le pouvoir antimicrobien de l'antifongique

Nous avons testé l'effet antifongique de la nystatine vis-à-vis de trois moisissures (**Figure 16**) qui présente le pourcentage d'inhibition déterminé à partir des diamètres des zones d'inhibition.

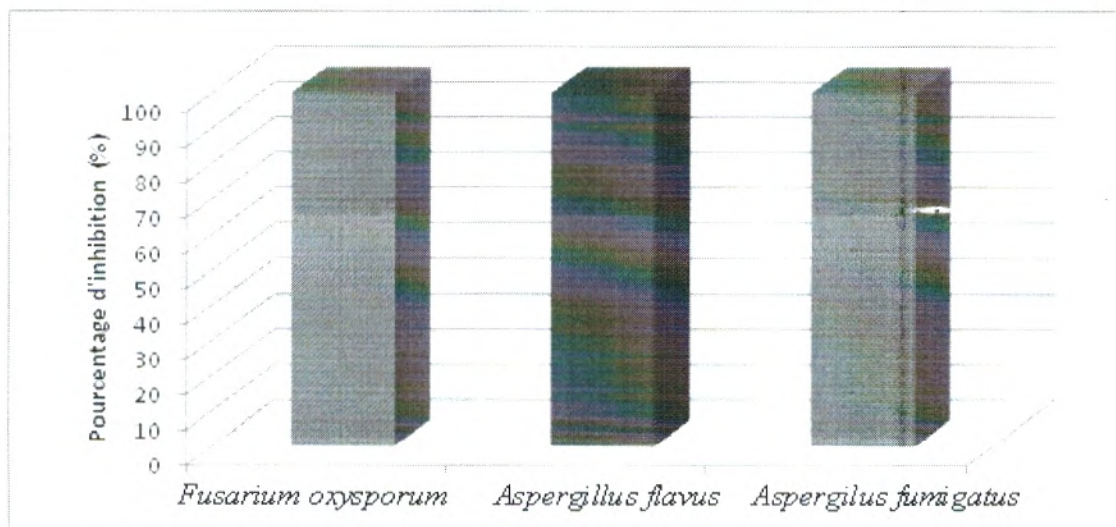


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de la nystatine relatif aux souches fongiques

On remarque qu'il y a une inhibition totale par l'absence de croissance des colonies mycéliennes de *A. flavus*, *F. oxysporum* et *A. fumigatus*, donc la nystatine possède une activité fongicide.

II.4. Pouvoir antimicrobien des extraits

II.4.1. Pouvoir antibactérien des extraits et de l'huile essentielle

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition des différents extraits et huile essentielle ont été mesurées. Les résultats obtenus sont donnés dans le (Tableau 6).

Tableaux 6 : Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aqueux et méthanolique et huiles essentielles relatives aux souches bactériennes

| Extraits Souches testés | Extrait Aqueux | | Extrait méthanolique | | Huile essentielle |
|-------------------------------|---|----------|----------------------|----------|-------------------|
| | Tiges | feuilles | Tiges | feuilles | |
| a-Bactéries | Diamètre des zones d'inhibition (mm) | | | | |
| Bactéries à Gram (+) | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 07 | 06 | 06 | 09 | 25 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 06 | 06 | 06 | 07 | 20 |
| <i>Enterobacter faecalis</i> | 08 | 9 | 06 | 8.5 | 12 |
| Bactéries à Gram (-) | | | | | |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | 07 | 09 | 08 | 09 | 15 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 06 | 06 | 6.5 | 09 | 08 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 06 | 06 | 07 | 06 | 23 |
| <i>Escherichia coli</i> | 06 | 9.8 | 07 | 08 | 20 |

Comme cela a été rapporté dans la littérature, l'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al (2009)** ; ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 5 classes ;

- ✦ Très fortement inhibitrice : De 30mm ou bien à partir de 30mm
- ✦ Fortement inhibitrice : 21 mm D à 29mm D
- ✦ Modérément inhibitrice ; 16mm D à 20mm D
- ✦ Légèrement inhibitrice : 11mm à D 16 mm D
- ✦ Non inhibitrice : $D < 10$

Les diamètres d'inhibition trouvés dans le **tableau 6** révèlent que les extraits de *Mentha rotundifolia* (feuilles et tiges) ont des diamètres d'inhibition significatifs mais faible par rapport à d'autre dans le tableaux (inférieurs à 09 mm et 10 mm) pour les extraits aqueux et méthanolique respectivement, ce qui nous amène à dire que nos extraits ont une très faible activité vis-à-vis des bactéries testées. Nous constatons aussi que les diamètres concernant l'huile essentielle présente des zones d'inhibitions meilleures que celle des extrais bruts. Nous pouvons par conséquent déduire que les souches testées manifestent une résistance envers les extraits methanolique et aqueux de *M. rotundifolia*.

Les résultats obtenus montrent clairement une sensibilité variante des germes testés, pour les bactéries à Gram positif et pour les Gram négatif.

La figure 16 présente les moyennes des zones d'inhibition de l'huile essentielle

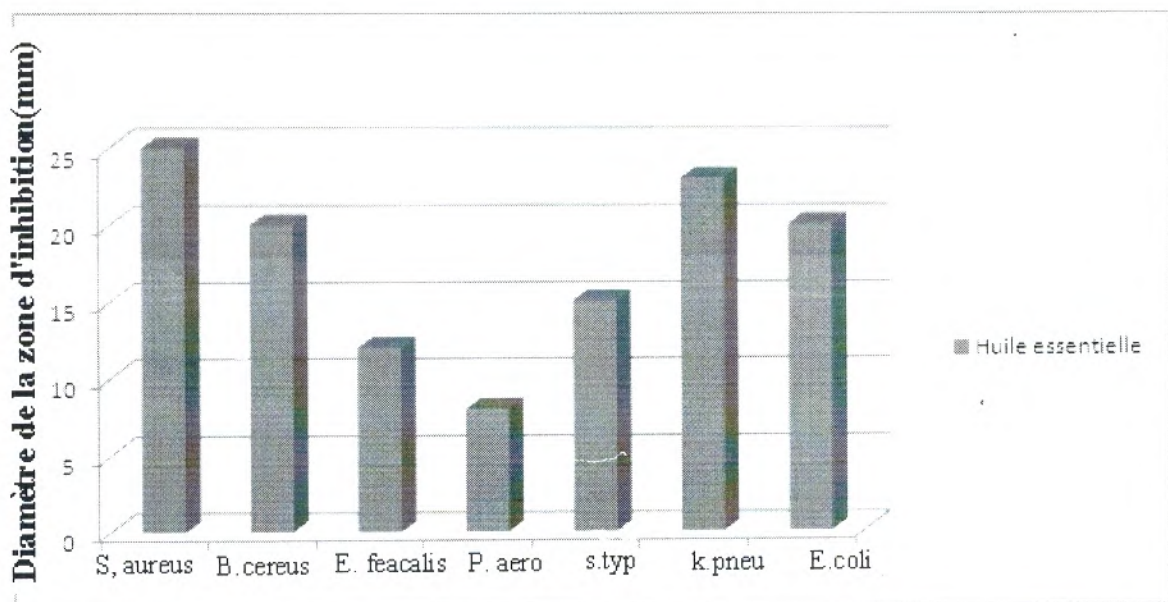


Figure 17 : Moyenne de diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle relative aux différentes souches bactériennes.

En comparaison de nos résultats avec celle de l'antibiotique testé ciprofloxacine, nous pouvons déduire que notre huile essentielle présente une activité antibactérienne fortement inhibitrice pour les souches *S. aureus* et *K. pneumoniae* avec des valeurs de 25 mm et 23 mm respectivement. Nous constatons aussi une inhibition modéré pour *B. cereus* et *E.coli*, avec des diamètres de 20 mm, concernant *S. Typhimurium* et *E. faecalis* qui manifeste une légère inhibition avec des diamètres de 12 mm et 15mm respectivement, cependant la souche de *P.aeruginosa* s'est avérée résistante à l'huile essentielle de *M.rotundifolia* avec un diamètre de 8 mm.

II.4.2. Activité antifongique des extraits et huiles essentielles

Après 5 jours d'incubation, les diamètres d'inhibition de la croissance des souches fongiques ont été mesurés. Nous avons mis en évidence l'activité antifongique des extraits bruts (aqueux et méthanolique) ainsi que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* (**Tableau7**).

Tableaux 7: Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits aqueux, méthanolique et huile essentielle relatives aux souches fongiques

| Extraits Souches testés | Extrait Aqueux | | Extrait méthanolique | | Huile essentielle |
|------------------------------|-----------------------------------|----------|----------------------|----------|-------------------|
| | Tiges | feuilles | Tiges | feuilles | |
| b-Moisissures : | Diamètre d'inhibition (mm) | | | | |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 06 | 06 | 06 | 06 | 60 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 06 | 06 | 06 | 06 | 64 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 06 | 06 | 06 | 06 | 62 |
| c- levure : | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 06 | 8 | 6.5 | 10 | 25 |

D'après les valeurs trouvées (**Tableau 7**), et leur comparaison avec l'échelle d'activité antimicrobienne faite par (**Mutai et al., 2009**), il s'avère que les extraits bruts n'ont aucune activité inhibitrice sur les souches fongiques testés. Cependant ces souches fongiques se sont montrées fortement sensibles vis-à-vis de cette huile essentielle en comparaison aux souches bactériennes, cette constatation est en accord avec celle rapportée par plusieurs

auteurs (Benjlali *et al.*, 1984 ; Kivan et Akgil, 1986), alors qu'elle est inversement constatée par (Al Arch *et al.*, 2013).

II2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

D'après les résultats obtenus, nous avons jugé intéressant de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* sur les souches avérées sensibles (Tableau 8)

Tableau 8 : Concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

| Concentration en µl/ml | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 |
|-------------------------------|-------|------|-----|---|
| ↓ Bactéries | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> | + | + | + | - |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | + | + | + | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | + | + | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | - |
| ↓ Moisissures | | | | |
| <i>Aspergillus flavus</i> | + | - | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | + | - | - | - |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | + | - | - | - |
| ↓ Levure | | | | |
| <i>Candida albicans</i> | + | + | - | - |

(-) : pas de croissance (+) : croissance

Ces résultats confirment ceux obtenus par l'aromatogramme, en effet, les souches bactériennes sont inhibées à des CMI très faibles de l'ordre de 0.5 µg/ml pour *S. aureus* et *K. pneumoniae* et moins pour *B. cereus*, *S. typhimurium* et *E. coli* à des concentrations de 1 µg/ml. Nous remarquons aussi une meilleure sensibilité pour la levure *C. albicans* avec une CMI de 0.5 µg/ml. Alors que l'inhibition totale des moisissures est atteinte à de faibles concentration de l'ordre de 0.25 µg/ml ce qui nous amène à déduire que l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* a une action fongicide.

Conclusion générale

Les produits naturels étaient et restent toujours une source inépuisable de structures complexes et diverses vu le rôle que peuvent jouer certains composés purs dans beaucoup d'applications, à savoir l'industrie pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, la parfumerie, etc.

Les plantes synthétisent plusieurs substances du métabolisme secondaire. Ces molécules peuvent avoir différents effets, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antimicrobienne des extraits brutes méthanoliques et aqueux ainsi que les huiles essentielles extraites de l'espèce *Mentha rotundifolia* qui appartient à la famille de lamiacées, une des familles les plus importantes dans la flore Algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels.

La présente étude entreprise a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des huiles volatiles, des tanins, des flavonoïdes, des stérols et stéroïdes, et des saponosides.

La détermination du rendement en extraits bruts sec de *Mentha rotundifolia* a permis d'obtenir des valeurs élevées en extrait aqueux des feuilles (32.85 %) est légèrement faible pour les tiges de (26.55 %). Par contre l'extraction méthanolique des feuilles et tiges révèle des taux nettement inférieurs avec des valeurs de 8.01 %, 5.87% respectivement. L'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur a montré un rendement acceptable de 1.7 %.

L'application de la CPG/SM pour l'analyse de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*, nous a permis de séparer 33 composés, dont 14 identifiés, représentant 70.91% de la composition chimique de cette huile, avec une dominance des constituants monoterpènes oxygénés notamment la pipériténone avec un pourcentage de 33.06%, suivi de pulégone (17.12 %). D'autres constituants sont présents en quantités moindres, à savoir la pipéritone (9.21 %) et la menthone (3.31 %). Les composés non identifiés au nombre de 19 ont été obtenus avec 29.09%.

D'autre part, nous avons évalué l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ainsi que les extraits bruts vis-à-vis de 7 souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*

faecalis, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*) et quatre souche fongique (*Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigates*, *Candida albicans*). Les résultats obtenus nous amène a avancer les conclusions suivant

- ✚ L'huile essentielle présente un pouvoir antimicrobienne plus important que celui des extrait brutes, ces dernier se sont avérées inactifs sur les souches testés.
- ✚ Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne montre une forte inhibition pour les souches *S. aureus* et *K. pneumoniae*. Nous constatons aussi une inhibition modéré pour *B. cereus* et *E.coli*, concernant *S. Typhimurium* et *E. faecalis* manifeste une légère inhibition, cependant la souche de *P.aeruginosa* s'est avérée faiblement sensible à l'huile essentielle de *M.rotundifolia* par rapport a d'autre souches.
- ✚ Les souches fongiques se sont montrées fortement sensible aux huiles essentielles.
- ✚ L'effet inhibiteur des huiles essentielles est plus efficace sur les souches fongiques que celle des souches bactériennes.

L'ensemble de ces résultats obtenu *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de sources naturelles biologiquement actives.

L'espèce *Mentha rotundifolia* est riche en métabolites secondaires, une exploitation de leurs propriétés antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs. Un travail complémentaire s'impose en vue de déceler les différentes molécules non identifier dans les huilles essentilles de *Mentha rotundifolia* par La techniques CPG/SM, donc une purification est indispensable en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

Evaluer et tester les différentes molécules isolées (Pipériténone, Pulégone, Pipéritone, Menthone) *in vivo* sur différents modèles biologique en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques et de conservation des produits destinés à la consommation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

AFNOR ;(1989)

Association Française de normalisation « huile essentiel » Recueil des normes française
3^{Eme} édition AFNOR, Paris

Allinger Nl.,cava PM ,Djougle CR. Jonson CR , Lebel NA,strens CL. , 1975

Chimie organique, ED Science Mc , Graw ,Hill.Paris-813

Belaiche .P

., (1979)

Traité de phytoterapie et d'aromatherapie, l'aromatogramme

Ed.Maloine ,Tome1.Paris

Arpino P, preport A.,Sepiner J., trancahant J, Vergnol A., Witier .P.,(1995)

Manuel pratique de chromatographie en phase gazeux

Ed. Masson .Paris

Baba Moussa F., Akpagana K., Bouchet P. ; 1998.

Comparaison de l'activité antifongique des feuilles et écorces de tronc de *Pteleopsis suberosa*
G. Don (Combretaceae).

Acta botanica Gallica, 145 (3) , 223-288.

Bhat S, Maseshwari P, Kumar S, Kumar A. ; (2002).

Mentha species: *in vitro* regeneration and genetic transformation.

Mol. Biol. Today, 3, 11-23.

Bhat, Subodh, Michael Bevans and Sanjit Sengupta (2002), "Measuring Users' Web

Activity to Evaluate and Enhance Advertising Effectiveness", *Journal of Advertising*, 31, 3
(Fall), 97-106.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.

Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural

pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166–2174.

Bardeau F.; (1986).

Le pharmacien du bon dieu.

Ed. Stoch. Paris-France

Bassene E., Mahamat B., Lo m., Boye C.S, Faye B. ; 1995.

Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae : C. micranthum,Guiera senegalensis et Terminalia avicennioides.

Fitoterapia, 66 (1), 86-87.

Belaiche P.,(1979)

Traité de plythérapie et d'aromathérapie, l'aromatogramme

Ed.Maloine tome 1, Paris

Benayad, N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Rapport d'activité. Faculté des Sciences-Rabat, Maroc.

Benjilali B. • A. Tantaoui Elaraki. A. Ayadi & M. Ihlal, 1984.

- Method to study antimicrobial effects of essential oils. Application to the antifungal activity of six

Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Tork M. et Totin F. ;(1980);

Les plantes médicinales et régions tempérées.

Ed. Maloine, Paris.

Beecher G. R. ; 2003.

Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake.

J. Nutri., 133 (10), 3248S-3254S.

Bekhechi C. Attk- Bekkara F. Abdelouhib D.E. (2008) .Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *origanum glandulosum* d'Algérie- phytothérapie . **6** : 153-159.

Birt D.F., Hendrich S., Wang W. ; 2001.

Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. Pharmacol.

Ther., 90 (3), 157-177.

Binet P. et , Brunel J.-P. ;

Physiologie Végétale. Tome II. Ed.,Doin.

BINET P. ET, BRUNEL J.-P.; Physiologie Végétale. Tome II. Edit., Doin (esque c'est 2001)

Bodner A.J., Kilkuskie R.E., Cheng Y.C., Lee K.H. ; 1990.

Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells.

Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. ; 2007.

Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et link.

Food Chemistry, **105**, 146-155.

Brada, M., M. Bezzina, M. Marlier A. Carlier and G. Lognay, 2006.

Chemical Composition of the Leaf Oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. J. Essent Oil Res., 18(6): 663-665.

Bravo L. ; 1998.

Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.

Nutr. Rev., 56 (1), 317-333.

Bruneton J. ; 1999.

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris.

Bruneton J. ; (1993).

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation.
2^{ème} Ed. Lavoisier. Paris-France

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods .

A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.

Capo M., Courilleau V., Valette C.;(1990).

Chimie des couleurs et des odeurs, culture et technique .204

Connolly J.D., Hill R.A.,(1991)

Methods in plant biochemistry

Triterpenoids.,7;331;351

Cooper JW (1980)

Spectroscopy technique for charetry research

Ed. John Wiley et sons, New

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V.,

Arzedi, E., et al. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical

composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied

Microbiology, 29, 130–135.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness

of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp.

and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection,

22, 39–44.

Dai, K.M., 1981. A preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China

(author's transl). Yao Xue Xue Bao 11, 849–859.

Dambolena, J. S., Zunino, M. P., López, A. G., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A.,

Mwangi, J.W., Thoithi, G. N., Kibwage, I. O., Mwalukumbi, J. M., & Kariuki, S. T.

(2010). Essential

oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya

and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 410–414.

Damien Dorman HJ., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R. (2003).

Antioxidant properties and Composition of aqueous Extracts from *Mentha* Species,

Hybrids, Varieties and Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51, p. 4563–4569.

Daniel, Lorenzo, Daniel, Paz, Eduardo, Dellacassa, P. Davies, R. Villa and S.

Canigueral, 2002. Essential oils

of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* From Uruguay. *Brazi. Archi. Biol and Technol*,

45: 519-524.

Moroccan essences. *J. Food Prot* .. 47, 748-752.

El-Rhaffari L., Zaid A. ; 2004.

Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée renouvelée.

Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293-318.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. ; 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities.

Compte Rendu de Biologie, 331, 372-379.

Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B. ; 2004.

Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn.

J. Agric. Food Chem., **52**, 6824-6829.

Fauchère, J.-L. et J.-L. Avril (2002). "Bactériologie générale et médicale" Ellipses Editions Paris. P 365

Fandohan P., Gbenou J., Gnonlofin B. ; 2004.

Effet of essential oil on the growth of Fumonisin contamination in corn.

J. Agric. Food Chem, 52, 6824-6829.

Fournier P. (1948) .

Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France :
15000 espèces. Tome III.

Garreta R. (2007). *Des simples à l'essentiels : De l'herboriste à l'aromathérapie.* Edition les Anthropologiques, Toulouse. P. 367.

Garnier G., Beauquesne L.B. et Bebraux G. (1961) .

Ressources médicinales de la flore française. Tome II, Edit. Vigot Frère, , Paris

Ghedira K. ; 2005.

Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique.

Gibbons, A. (1992). Exploring new strategies to fight drug resistant microbes. *Science*, 29, 1036–1038.

Globel .H, Shidet.G,Z, phytother 16(1) ; 23-33(1995)

GULLEN. MD, CABO. N, BURILLO. J (1986)

Characterisation of the essential oils of food and agriculture; (3), p: 359-363. !!!

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., et al. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiolo*

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., & Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449–1456.
Food Chemistry, 29, 130–135

Gul, P., 1994. Seasonal variation of oil and menthol content in *Mentha arvensis* Linn. *Pakistan J. For.* 44, 16–20.

Guignard J-L. ; 1998.
Abrégé botanique. 2ème Edition Masson. Paris.

Harborne J.B. ; 1988.
The flavonoids, advances in research since 1980. Ed. Chappman et Hall. London.

Havsteen B. H. ; 2002.
The biochemistry and medical significance of the flavonoids.
Pharmacol. Therapeutics, 96, 67-202.

Hendriks H., Van Os FHL. (1976).
Essential Oils of two chemotypes of *M. suaveolens* during ontogenesis.
Phytochemistry 15, p. 1127–1130

Hennebelle T. ; 2006
Investigation chimique, chimiotaxonomique, et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants,
Thèse présentée pour l'obtention de Docteur en Chimie Organique et Macromoléculaire.
Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille1. Ecole doctorale science de la matière du rayonnement et de l'environnement.

Holt .J.R.S., Paya M.; (1996)
Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins : natural products with therapeutic potential.
Gen. Pharmacol., 27; 713-722.

Hong X.Y., Wan M., Dong H., But P.P.H., Foo L; Ycap ; 2000.
Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease.
Biological and Pharmaceutical Bulletin, 23 (9), 1072-1076.

Igor Passi L.B. ; (2002).
Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo* des Lamiacées.
Thèse pharmacie pour obtenir le grade de Doctorat en pharmacie (Diplôme d'Etat),
Bamako-Mali.

Iserin P., (2001). *Encyclopedie des plantes medicinales*. Ed : Larousse Bourdasse .Paris .
p.335

Jakman .R.L., smith .J.I.; (1996)
Anthocyanins and betalains in "Natural Food Coloration"
Eds. Hendy G.A.F., and Houghton.J.D., Blackie academic and professional, London. 244-309

Lamy S., Blanchette M., Michaud-Levesque J., Lafleur R., Durocher Y., Moghrabi A., Barrette S., Gingras D., Béliveau R. ; 2007.

Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation.

Carcinogenesis, 27(5), 989-996.

Lahouel M., Amedah S., Zellagui A., Touil A., Rhouati S., Benayache F., Leghouchi E., et Bousseboua H. ; 2006.

The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration.

Thérapie, 61(4), 347-355.

Lahlou M. (2004).

Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils phytotherapy research. 18: 435-448.

Lawrence BM. (1978).

A Study of the Monoterpenene Interrelationships in the Genus *Mentha* with Special Reference to the Origin of Pulegone and Menthofuran.

Ph.D. Thesis. Groningen, The Netherlands : Rijksuniversiteit, p. 123–144

Liu L.Z., Fang J., Zhou Q., Hu X., Shi X., Jiang B.H.; 2005.

Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer.

Mol. Pharmacol., 68(3), 635-643.

Linden G., Loivient D.; (1994).

Biochimie agro-industriel. Valorisation alimentaire de la production agricole

Longevialle. P.; (1981)

Spectrométrie de masse des substances organique

ED. Masson .paris 3-98

Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., & Cañigueral, S. (2002).

Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 519–524.

Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R.,

Canigueral S. (2002). Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil. Technol.* 45 (4), p. 519–524.

Majhenic L., Kergel M.S., Knez Z. ; 2007.

Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts.

Food Chemistry, 104, 1258–1268.

Namba T., Marita O.S, Huany S,L Goshina K., hattori,M.,Kakiuchi N; (1988)

Studies on cardio-active Crude drugs, Effets of coumarins on cultured myocardial cells.

Planta medica; 54;277-282

Manach C., WilJiamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.; 2005.

Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. Review of 97 bioavailability studies.

Am. J. Clin. Nutr., 81(1), 230S-242S.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., & Jimenez, L. (2004).

Polyphenols: Food sources and bioavailability.

American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727–747.

Maach, A., Jemali, A., 1986.

Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe NaaNaa Abdi, Coriandre. Bulletin de l'IAV

Hassan II, Rabat, Maroc.

Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. ; 2007.

Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes.

African Journal of Biotechnology, 6(12), 1358-1368

Memelink J., Verpoort R., Kijine J.W. ; 2001.

Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

Trends in Plant Science, 6, 212-221.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. ; 2000.

The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.

Pharmacol. Rev., 52(4), 673-751.

Moreno, L., Bello, R., Primo-Yufera, E., & Esplugues, J. (2002).

Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh.

Phytotherapy Research, 16, 10–13.

Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M. ; 1985.

Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L.

Journal of Ethnopharmacology, 13, 289-300.

Naghbi F., Mosaddegh M., Motamed S-M, Ghorbani A. ; 2005.

Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology.

Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2, 63-79.

Nonaka GI., Nishioka I., Nishi-Zawa A., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman GE., Bodner AJ., Kilkuskie RE., Cheng YC., Lee KH. ; 1990.

Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100-S11. Wayne, PA, USA.

Ourini D., Agouni A. , A.Alaoui MI.,Alaoui K., Alaoui MA et Belabbas MA.(2007) .

Activité antifongique de l'acide oleique et des huiles essentielles de thymus saturjoides L.et

Paolini V., Dorchies Ph., Hoste H. ; 2003.

Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre.

Alter. Agri., 17-19.

Penssini G.L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D.A.G. (2003).

Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnelli* (Miq).C.D.C. var. *pallescens* (C.D.C). yunk.

Memorias do instituo Oswaldo Cruz, **98**.

Pfaller M. A., Burmeister L., Bartlett M. S., Rinaldi m. G., 1988.

Multicenter Evaluation of Four Methods of Yeast Inoculum Preparation.

J. Clin. Microbiol. 26 (8) : 1437-1441

Pfaller. M .A, Messer.S.A, Mills.K and A. Bolmström., 2000.

In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Comparison of Etest and Reference Microdilution Methods for Determining Itraconazole MICs.

J. Clin. Microbiol. 38 (9): 3359–3361

Pitta ,P ; (2000)

Flavonoides as Antioxidants

Journal of Natural Products; 63 (A); 1035-1042

Pousset J.L., Rey J.P., Levesque J., Corsaget P., Galen FX. ; 1993.

Hepatitis B surface antigen (HBs Ag) inactivation and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in vitro by *Combretum glutinosum* perr.(Combretaceae), extracts.

Phytotherapy Research, 7 (1), 101-102.

Quezel P., Santa S. ; 1963.

Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.

Rai m,K., acharya D.,Wadegaonkarp., (2003),Plants, In plant-derived antimycotics :cument trends and future prospects, Hawerth press, New -york ,lndon, Oxford 165-185

Ramos S. ; 2007.

Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways to cancer chemoprevention.

J. Nutr. Biochem, 18(7), 427-442.

Richter G.,(1993)

“Metabolisme des vegetaux” phytologie et biochimie presse pollyechimiques et universitaires, Romandes.292

Robinet F-G. ; 1951.

Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences Techniques. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich,

Suisse. (Prom. No. 1937)

ROGER S. (1984) ; Essence de menthe dans le monde. Communication au 1^{er} Colloque International sur les PAM du Maroc, Rabat, Mai 1984.

Rogalska E., Rogalski M, Judeinstien P, Bayte J.P; Guermouche.M.H.,(2001)
Thermodynamique and interfacial study of two liquid crystals substituted with polyethylene oxide (POE) chains
J.molecular liquid; 94;226-231

Rose ,A.E., (1965)
Technique of organic chemistry
2^{eme} Edition , volIV, Distillation by John wiley and sons, new York

Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004).
In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252–1256.

Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252–1256.

Sala A., Recio M.C., Schinella G.R. (2003).
Assessment of the inflammatory activity and free radical scavenging activity of filliroside. *Eur. J. Pharmacol.*, 461, 53-61.

Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C. S., Srivastava, B., & Dubey, N. K. (2008) Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 348–351.

Silverstein R.M., Bassett G.C., Morill T.C. ;(1991)
Spectroscopic identification of organic compounds.
5^{eme} edition, John Wiley et Sons, New York.

Simandi .B et al , Planta Med,59(suppl):A 626 (1993)

Singh A.K., , Diskshitet A., Dixit S.N. ;1983 . Perfumer and flavorist, vol. 8, February /March.

Singleton V.L., Rossi J.A. ; 1965.
Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-153.

Sokmen A., Gulluce M., Akpulat HA . et al .(2004). The *in vitro* antibacterial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of endemic thymus *spatulifolius* *Food control* .15:627-634.

Sovoboda K., Hompson JB. ;(1999)

Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK

Steinmetz M.D., Elias R., Maillard C., Boudon G., Régli P., Balansard G., Ghastin C. ; 1993.

Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques.
2ème colloque Européen d'ethnopharmacologie et 11ème conférence internationale d'ethnomédecine. Heidelberg, 24-27.
Médicaments et Aliments : *L'Approche Ethnopharmacologique*, 331-332.

Spencer J.P., Abd-el-Mohsen M.M., Rice-Evans C.; 2004.

Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.

Arch. Biochem. Biophys., 423, 148-166.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Review. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Toufektsian M-C., de Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H-P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pilu R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., Boucher F., Martin C. ; 2008.

Chronic Dietary Intake of Plant-Derived Anthocyanins Protects the Rat Heart against Ischemia-Reperfusion Injury.

Journal of Nutrition, 138, 747-752.

Trease E., Evans W.C. ; 1987.

Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London .

Tu Y.C., Lian T.W., Yen J.H., Chen Z.T., Wu M.J. ; 2007.

Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin.

J. Agric. Food Chem, 55(24), 9969-9976.

Venskutonis PR. (1996). A chemotype of *Mentha longifolia*

L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *J. Essent. Oil Res.* 8, p. 91–95.

Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A. ; 2010.(ou 2011)

Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragrance Journal*, 25, 13–19.

Wenzel U., Kunz S., Brendel M. D., Daniel H. ; 2000.

Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells.

Cancer Res., 60(14), 3823-3831.

Williams C.A., Grayer R.J. ; 2004.

Anthocyanins and other flavonoids.

Nat. Prod. Rep., 21(4), 539-573.

Sovoboda K., Hompson JB .;(1999)

Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK

Steinmetz M.D., Elias R., Maillard C., Boudon G., Réglé P., Balansard G., Ghastin C. ; 1993.

Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques.
2ème colloque Européen d'ethnopharmacologie et 11ème conférence internationale d'ethnomédecine. Heidelberg, 24-27.
Médicaments et Aliments : *L'Approche Ethnopharmacologique*, 331-332.

Spencer J.P., Abd-el-Mohsen M.M., Rice-Evans C.; 2004.

Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity.

Arch. Biochem. Biophys., 423, 148-166.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Review. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Toufektsian M-C., de Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H-P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pili R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., Boucher F., Martin C. ; 2008.

Chronic Dietary Intake of Plant-Derived Anthocyanins Protects the Rat Heart against Ischemia-Reperfusion Injury.

Journal of Nutrition, 138, 747-752.

Trease E., Evans W.C. ; 1987.

Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindall London .

Tu Y.C., Lian T.W., Yen J.H., Chen Z.T., Wu M.J. ; 2007.

Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin.

J. Agric. Food Chem, 55(24), 9969-9976.

Venskutonis PR. (1996). A chemotype of *Mentha longifolia*

L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *J. Essent. Oil*

Res. 8, p. 91–95.

Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A. ; 2010.(ou 2011)

Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragrance Journal*, 25, 13–19.

Wenzel U., Kunz S., Brendel M. D., Daniel H. ; 2000.

Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells.

Cancer Res., 60(14), 3823-3831.

Williams C.A., Grayer R.J. ; 2004.

Anthocyanins and other flavonoids.

Nat. Prod. Rep., 21(4), 539-573.

Annexes

Annexe IV : Rendement des extraits bruts des feuilles et des tiges de *Mentha rotundifolia*

| Extraits | Parties | Rendements (%) |
|--------------|----------|----------------|
| Méthanolique | Feuilles | 8.01 |
| | Tiges | 5.87 |
| Aqueux | Feuilles | 32.85 |
| | Tiges | 26.65 |

Annexe : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'antibiotique et du DMSO relatif aux différentes souches bactériennes.

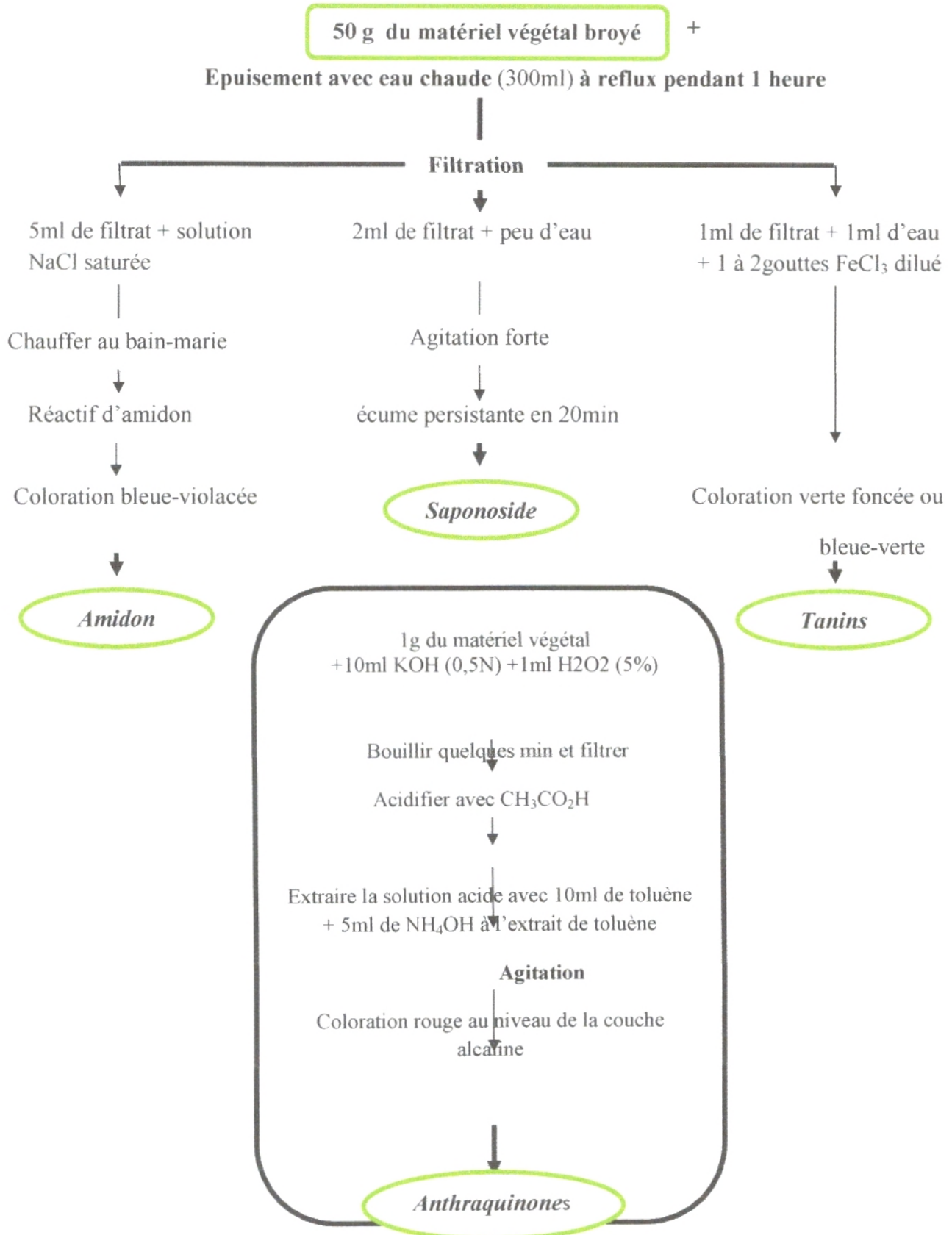
| Extrait en flavonoïdes | Ciprofloxacine(5µg/disque) | DMSO |
|-------------------------------|---------------------------------------|------|
| | Diamètres des zones d'inhibition (mm) | |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | 27 | 6 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 | 6 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 27 | 6 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 | 6 |
| <i>Enterobacter faecalis</i> | 31 | 6 |
| <i>Escherichia coli</i> | 32 | 6 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 30 | 6 |

Annexe IV : Rendement des extraits bruts des feuilles et des tiges de *Mentha rotundifolia*

| Extraits | Parties | Rendements (%) |
|---------------------|----------------|-----------------------|
| Méthanolique | Feuilles | 8.01 |
| | Tiges | 5.87 |
| Aqueux | Feuilles | 32.85 |
| | Tiges | 26.65 |

Annexe I : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud



Annexe III : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'éther diéthylique

50 g du matériel végétal broyé

+

Epuisement avec l'éther diéthylique (300ml) à reflux pendant 1 heure.

Filtration

10ml de solution
Evaporée

Résidu+1ml NH₄OH

Réaction de Bornträger

vive

de l'orangé-rouge
au violet pourpre

Alcaloïdes base

20ml de solution
concentrée

Résidu+ alcool

solution alcoolique

Concentration à sec

Huiles volatiles

20ml de solution
étherique cc

Résidu + Alcool

Solution alcoolique

le résidu gras se saponifie

(hydrolyse d'ester présence d'une Teinte

base soude ou potasse) Variant

Ajouter un peu d'eau extraire la

solution avec l'éther diéthylique

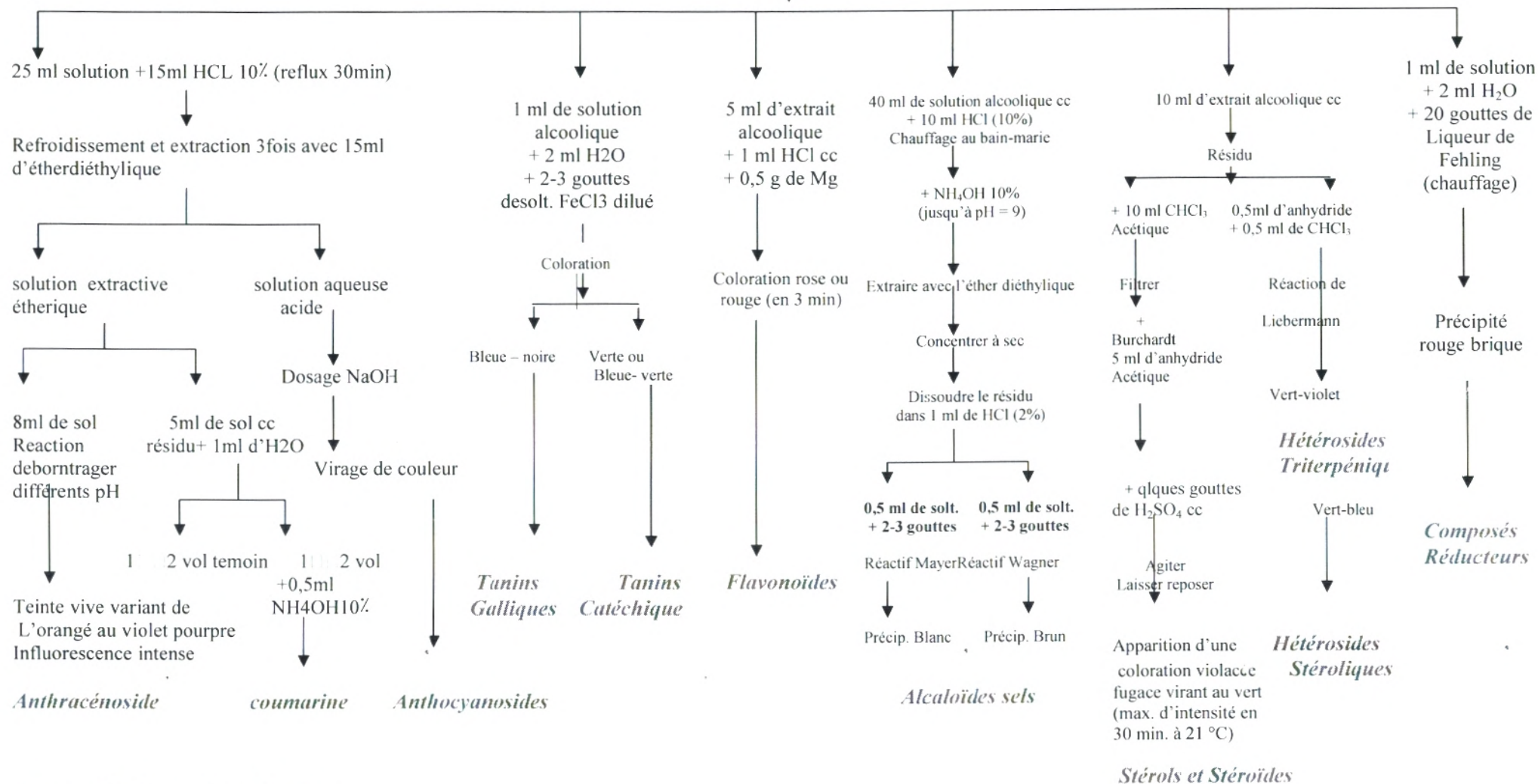
Concentrer à sec

Acides gras

50 g du matériel végétal + 300ml d'éthanol

Reflux pendant 1 heure.

Filtration



Annexe B : Tests phytochimiques

Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol