



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة غرداية

N° d'enregistrement

Université de Ghardaïa

/...../...../...../...../.....

كلية العلوم والتكنولوجيا

Faculté des Sciences et de la Technologie

قسم هندسة الطرائق

Département de Génie des Procédés

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences et Technologie

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Chimique.

Thème

**ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUE D'UNE
PLANTE AROMATIQUE MEDICINALE**

Par : Bahaz Safa

Devant le jury composé de :

BENARIMA Zine el abidine	MCB	Univ. Ghardaïa	Examineur
KADRI Mohamed	MCB	Univ. Ghardaïa	Examineur
BENCHEIKH Salah Eddine	MCB	Univ. Ghardaïa	Encadreur

Année universitaire 2020/2021



Dédicace

Je Dédie ce modeste travail à :

A ma chère famille du petit au grand pour leur encouragement.

A tous mes amis et tous ceux qui me sont chers.

Safa

Remerciement

Avant tout je remercie Dieu, le tout puissant pour nous avoir donnée de la force et de la patience.

Je tiens à remercier Dr. Bencheikh Saleh Eddine, qui a bien voulu m'encadrer, je le remercie pour toute l'aide scientifique et technique qu'elle m'a apportée au cours de la réalisation de ce travail.

Je remercie également Mr. Aouf djaber. Directeur du laboratoire de génie des procédés de la Faculté des Sciences et de la Technologie l'Université de Ghardaia et Ms Sabrina Daouadi, Assistante au laboratoire d'analyses sanguines Ibn Al-Haytham.

Mes plus vifs remerciements à toutes mes amies de la promotion pour leur soutien moral tout au long de ces années mémorables.

Nos derniers remerciements, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ملخص

هذا العمل جزء من دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة للنباتات العطرية والطبية الجزائرية. لقد أجرينا دراسة على نبات يستخدم على نطاق واسع من قبل السكان المحليين، وهو *Mentha pulegium* نبات عطري من منطقتي غرداية وورقلة.

استخرجنا الزيوت بتقنية التقطير المائي. بلغ مردود الاستخلاص 1,77% غرداية و1,79% ورقلة. تم تحليل الزيوت بواسطة كروماتوغرافيا الغاز مقرونة بمقياس الطيف الكتلي (GC / MS) وهذا التحليل أعطى: المركب الرئيسي في الزيت العطري لغرداية هو iso-Pulegone بنسبة 39,47% و I-menthone بنسبة 24,11% في زيت ورقلة الأساسي.

أظهر النشاط المضاد للبكتيريا أن سلالة *Listeria monocytogenes* هي الأكثر حساسية في زيوتنا الأساسية مع منطقة تثبيط تبلغ 25 و 23 ملم. يتم تقييم نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية من خلال اختبار مسح الجذور الحرة DPPH وأظهر وجود نشاط مضاد للأكسدة لزيوتنا (IC50: 17,17 ميكروغرام / مل من ورقلة و 35,12 ميكروغرام / مل من غرداية) هذه الدراسة تعطي نشاطاً أقل لمضادات الأكسدة من زيت غرداية الأساسي مقارنة بزيت ورقلة الأساسي يظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة أعلى.

يظهر التأثير التآزري للزيوت الأساسية نتائج مثيرة للغاية.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية، *Mentha pulegium* , GC / MS, النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة.

Abstract:

This work is part of studying the antibacterial and antioxidant activity of Algerian aromatic and medicinal plants. We conducted a study on a plant which is widely used by the local community; *Mentha pulegium* is an aromatic plant that is growing in Ghardaïa and Ouargla regions.

We extracted the oils of the plants using the hydro-distillation technique. The obtained extraction yield was 1,77% for Ghardaïa and 1,79% for Ouargla. The oils were analyzed via gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS), the outcome of the analysis shows the major component in the essential oil of Ghardaia is iso-pulegone at 39,47%, however the I-menthone 24,11% was noticed in Ouargla essential oil.

The antibacterial activity has shown that the *Listeria monocytogenes* strain is the most sensitive in our essential oils with an inhibition zone of 25 and 23 mm. The antioxidant activity of essential oils is evaluated by the free radical scavenging test *DPPH* which showed the existence of an antioxidant activity of our oils ($IC_{50} = 17,17\mu g / mL$ for Ouargla and $IC_{50} = 35,12\mu g / mL$ for Ghardaïa). This study resulted a lower antioxidant activity for Ghardaia essential oil than Ouargla essential oil in which a higher antioxidant activity was noticed.

The synergistic effect of the two essential oils shows very interesting results.

Key words: essential oils, *Mentha pulegium*, GC / MS, antibacterial activity, antioxidant activity.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne et antioxydante de plante aromatique et médicinale algériennes. Nous avons entrepris une étude sur plante très utilisées par la population locale, *Mentha pulegium*. La plante aromatique provenant de régions Ghardaïa et Ouargla.

Nous avons extrait les huiles par la technique d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction obtenu est de 1,77% de Ghardaïa et 1,79% d'Ouargla. Les huiles ont été analysées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) cette analyse donne : Le composé majoritaire dans l'huile essentielle de Ghardaïa est l'iso-pulégone 39,47%, et l'I-menthone 24,11% dans l'huile essentielle de Ouargla.

L'activité antibactérienne a montré que la souche *Listeria monocytogenes* est le plus sensible dans nos huiles essentielles avec une zone d'inhibition de 25 et 23 mm. L'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH a montré l'existence d'une activité antioxydante de nos huiles ($IC_{50} = 17,17\mu g/mL$ de Ouargla et $IC_{50} = 35,12\mu g/mL$ de Ghardaïa. Cette étude donne une activité antioxydante d'huile essentielle de Ghardaïa inférieur que l'huile essentielle d'Ouargla présente une supérieure activité antioxydante.

L'effet synergique des deux huiles essentielles montre des résultats très intéressants.

Mots clés : huiles essentielles, *Mentha pulegium*, GC/MS, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Liste des abréviations :

AFNOR	Association française de normalisation
Bac	Bactérienne
C	Concentration
CMI	Concentration minimale inhibitrice
°C	Degrés Celsius
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazil
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
g	Gramme
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse
h	heure
HE	Huile essentielle
I_A	Indice acide
I	Inhibition
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
L	Litre
mg	Milligramme
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mol	Mole
N	Normalité
pH	Potentiel d'Hydrogène
μ	Micro
47	Ghardaïa
30	Ouargla

Liste des figures :

Figure 1: Schéma du principe de la technique d'hydro distillation	7
Figure 2: Schéma de l'hydro diffusion	8
Figure 3 : Montage d'hydrodistillation assistée par micro-ondes	9
Figure 4: la morphologie de <i>mentha pulegium</i>	14
Figure 5: Plan générale de la partie expérimentale	21
Figure 6: la plante <i>mentha pulegium</i>	22
Figure 7: Montage d'extraction d'huile essentielle	23
Figure 8: Le réfractomètre	25
Figure 9: Montage d'indice d'acidité	26
Figure 10: le densimètre	27
Figure 11: le pH-mètre	28
Figure 12: chromatographe en phase gazeuse adopté couplé à un spectromètre de masse GC/MS	29
Figure 13: les souches bactériennes	31
Figure 14: Zone stérile	31
Figure 15: Réchauffement le contenu des bouteilles de Mueller Hinton à 95 °C	32
Figure 16: boîtes pétries coulé par gélose	32
Figure 17: Protocole du test de l'activité antimicrobienne	33
Figure 18: Protocole de test antioxydant	35
Figure 19 : Chromatogramme en GC/SM d'HE de <i>M.pulegium</i> de 47	40
Figure 20 : Chromatogramme en GC/SM d'HE de <i>M.pulegium</i> de 30	41
Figure 21 : résultats des huiles essentielles de <i>mentha pulegium</i>	45
Figure 22 : Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH)	46
Figure 23 : Les résultats obtenus de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH	47
Figure 24 : Activité antioxydante des huiles essentielles de 30 et de 47 et acide ascorbique	48
Figure 25 : Concentration inhibitrice à 50% des huiles essentielles et de l'acide ascorbique	48
Figure 26 : Les résultats de l'effet synergique obtenus de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH	52
Figure 27 : Activité antiradicalaire des trois compositions d'huile essentielle de <i>mentha pulegium</i>	53
Figure 28 : Les valeurs de IC 50 des trois compositions d'huile essentielle <i>mentha pulegium</i>	53

Liste des tableaux :

Tableau 1: Rendement des huiles essentielles de <i>mentha pulegium</i> de différentes régions	37
Tableau 2 : les propriétés organoleptiques d'huile essentielle de <i>mentha pulegium</i>	38
Tableau 3:Caractéristiques physico-chimique d'huile essentielle de <i>mentha pulegium</i>	38
Tableau 4 : Activité antibactérienne d'HE <i>M. pulegium</i> de 47	42
Tableau 5 : Activité antibactérienne d'HE <i>M.pulegium</i> de 30	43
Tableau 6 : résultat d'activité antibactérienne d'HE <i>M.pulegium</i> par photos	44
Tableau 7 : Activité antibactérienne d'effet synergique des huiles essentielles	50
Tableau 8: activité antibactérienne d'effet synergique des huiles essentielles par photos	51

Sommaire :

Introduction générale	1
Partie I Partie théorique	
Chapitre I: Les huiles essentielles	
I.1 Historique	3
I.2 Définition	3
I.3 Propriété physico-chimique	4
I.4 Répartition et localisation	4
I.4.1 Répartition	4
I.4.2 Localisation	5
I.5 Composition chimique	5
I.5.1 Les composés terpéniques	5
I.5.2 Les composés aromatiques	6
I.5.3 Les composés d'origines diverses	6
I.6 Techniques d'extraction	6
I.6.1 Hydrodistillation	6
I.6.2 La distillation par entraînement à la vapeur d'eau	7
I.6.3 Hydrodiffusion	7
I.6.4 Extraction assistée par micro-onde	8
I.6.5 L'extraction par les solvants volatils	9
I.6.6 Extraction par du CO ₂ supercritique	9
I.6.7 L'expression à froid	10
I.6.8 Extraction par les ultrasons	10
I.6.9 Extraction par enfleurage	10
I.7 Activités biologiques des huiles essentielles	11
I.7.1 Activité antioxydante	11
I.7.2 Activité antibactérienne	11
I.7.3 Activité antifongique	12
Chapitre II: Etude botanique	
II.1 Généralité sur <i>Mentha pulegium</i>	13

II.2 Description botanique	13
II.3 La morphologie	14
II.4 Nomenclature	15
II.5 Classification botanique	15
II.6 Distribution	16
II.7 Utilisation	16
II.8 Composition des huiles essentielles du <i>Mentha pulegium</i>	16
II.9 Les activités biologiques des huiles essentielles de <i>mentha pulegium</i>	18
II.9.1 Activité antioxydant	18
II.9.2 Activité antibactérienne	18
II.9.3 Activité antifongique	19

Deuxième Partie: Partie expérimentale

Chapitre III: Matériels et méthodes

Cadre d'étude	20
III.1 Matériel végétal	22
III.2 Extraction des huiles essentielles	22
a. Matériels et produits	22
b. Mode opératoire	23
III.3 Analyses des huiles essentielles	24
III.3.1 Analyse physico-chimique	24
III.3.1.1 Le rendement	24
III.3.1.2 Indice de réfraction	24
III.3.1.3 Indice d'acide	25
III.3.1.4 la Densité	26
III.3.1.5 Potentiel d'hydrogène (pH)	27
III.3.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	28
III.4 Activités biologique	29
III.4.1 Activité antibactérienne	29
III.4.1.1 Souches bactériennes	30
III.4.1.2 Préparation des boîtes de gélose	31
III.4.1.3 Détermination de CMI	34
III.4.2 Activité antioxydante	34
III.4.2.1 Méthode de <i>DPPH</i>	34

Chapitre IV: Résultats et discussions

IV.1 Détermination de rendement	37
IV.2 Analyses des huiles essentielles	38
IV.2.1 Analyses organoleptiques	38
IV.2.2 Analyses physico-chimique	38
IV.2.2.1 La densité	38
IV.2.2.2 Le pH	39
IV.2.2.3 Indice de réfraction	39
IV.2.2.4 Indice d'acide	39
IV.2.3 Détermination de composition chimique des huiles essentielles	40
IV.3 Activités biologique	42
IV.3.1 Activité antibactérienne	42
IV.3.2 Activité antioxydante	46
IV.4 Effet synergique des huiles essentielles	49
IV.4.1 Activité antibactérienne	49
IV.4.2 activités antioxydante	52
Conclusion	54
Références	56

Introduction générale

L'homme est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes.

L'Algérie possède une richesse non négligeable en plantes aromatiques et médicinales qui susceptible d'être utilisées dans différents domaines tels qu'en pharmacie, parfumerie, cosmétique et en agroalimentaire pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes.

Des métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, généralement dans une grande diversité structurale. Dans la nature, de nombreux métabolites secondaires jouent un rôle important dans la protection des plantes comme antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides et également contre les herbivores en réduisant leur appétit pour ces plantes. Ils peuvent également attirer certains insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines, ou repousser les prédateurs indésirables [1].

Les huiles essentielles (HEs) sont des produits naturels précieux utilisés comme matières premières dans de nombreux domaines, notamment les parfums, les cosmétiques, l'aromathérapie, la phytothérapie, les épices et la nutrition. L'aromathérapie est l'utilisation thérapeutique de parfums ou du moins de simples volatils pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies, les infections et les indispositions par inhalation [2]. Dans ce but, l'utilisation des plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et / ou antioxydant. Ainsi les huiles essentielles et les extraits organiques, notamment les polyphénols, suscitent un intérêt croissant comme source potentielle de molécules bioactives pouvant être employées comme alternatives à certaines substances synthétiques [3].

Le genre *Mentha* comprend 25 à 30 espèces qui poussent dans les régions tempérées d'Eurasie, d'Australie et d'Afrique du Sud. Les espèces de menthe ont une grande importance, à la fois médicinale et commerciale. En effet, les feuilles, les fleurs et les tiges de *Mentha spp* sont fréquemment utilisés dans les tisanes ou comme additifs dans les mélanges d'épices du commerce pour de nombreux aliments pour offrir un arôme et une saveur. De plus, *Mentha spp* a été utilisé comme remède populaire pour le traitement des nausées, bronchites, flatulences, anorexie, colite ulcéreuse et troubles hépatiques en raison de ses activités anti-inflammatoires, carminatives, antiémétiques, diaphorétiques, antispasmodiques, analgésiques, stimulantes, emménagogue et anticatarrhales [4].

Le produit d'extraction peut varier en termes de qualité, de quantité et de composition en fonction du climat, de la composition du sol, de l'organe végétal, de l'âge et du stade du cycle végétatif [5] [6].

Le groupe principal est composé de terpènes et de terpénoïdes et l'autre de constituants aromatiques et aliphatiques, tous caractérisés par un faible poids moléculaire. Ce sont les molécules les plus représentatives, constituant 90% des huiles essentielles et permettant une grande variété de structures [7] [1].

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier la plante aromatique, *la mentha pulegium*, de deux régions différentes, Ghardaïa et Ouargla, pour extraire son huile essentielle et comparer le rendement, les paramètres physico-chimiques, la composition chimique et activités antibactériennes et antioxydantes.

Notre étude est divisée en deux parties :

La première partie est la revue bibliographique.

- Généralités sur les huiles essentielles.
- Botanique de la plante à la *mentha pulegium*, sa description, sa classification, ses propriétés, ses utilisations et ses composés.

La deuxième partie est la molécule expérimentale.

- Équipements et méthodes utilisés dans ce travail : Extraction, d'analyses physico-chimiques, activités biologiques.
- Les résultats obtenus et leur interprétation.

Et finalement le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Partie I

Partie théorique

Chapitre I

Les huiles essentielles

I.1 Historique :

L'utilisation d'huiles essentielles (parfums et aromates) a été étroitement liée à la phytothérapie et remonte à l'Antiquité [8].

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles des 40 000 ans avant JC, lorsque les huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia* sont utilisées par les peuples autochtones, sur le continent australien [9].

L'Inde, la Chine et la Méditerranée sont les trois principaux domaines dans lesquels l'utilisation des huiles essentielles s'est développée. Par exemple, la terre cuite se trouve encore au Pakistan et remonte à 5000 avant JC [8].

En 1928, le pharmacien français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme « aromathérapie » pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a accidentellement découvert que la lavande guérissait des brûlures sur son bras. Vers 1950, Shnodder et Messing mesurent les zones d'inhibition [8] [10]. En 1964, le médecin français Jean Valunet a traité avec succès des patients atteints de troubles mentaux [11]. En 1975, Pierre Franchomme développe une idée de base, un chémotype, désormais connu sous le nom de chémotype, et démontre l'importance de réduire les effets secondaires du traitement, les effets secondaires ou les risques d'empoisonnement [8] [10].

I.2 Définition :

Huile essentielle sont des extraits volatils et parfumés qui sont extraits de certaines plantes par distillation à la vapeur, pressage ou incision des plantes qui les contiennent [12]. Elles sont des composés naturels complexes de métabolites volatils secondaires, qui sont séparés par distillation aqueuse ou par injection mécanique [13].

De nombreuses espèces plantes produisent d'huile essentielle. Il existe plus de 2000 espèces d'environ 60 familles [14]. Elle peut être extraite de différentes parties de la plante, les organes reproducteurs pouvant se situer dans le fruit, la fleur, la feuille, la tige, la racine ou la graine. Il arrive que l'on puisse extraire des huiles essentielles dans différentes parties d'une seule plante [15]. Ils sont constitués de cellules spéciales. Généralement, il est collecté dans des

poches ou dans un canal secret, puis transporté pendant la croissance d'autres parties de plante [16].

I.3 Propriété physico-chimique :

- Ce sont composés des molécules aromatiques de très faible masse moléculaire [17].
- Sont des Liquides à température ordinaire [3].
- Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de sassafras de girofle ou de cannelle constituent des exceptions) [3].
- Elles ont un indice de réfraction élevée et ont actives sur la lumière polarisée [3].
- Elles sont totalement solubles les alcools à titres élevés et les solvants organiques, pour la plupart insolubles dans l'eau [3].
- Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps leurs odeurs changent, leur point d'ébullition augmente et leurs solubilités diminuent [18].
- Elles sont très inflammables et très odorantes [3].
- Les HE incolores ou jaune pâle et sont volatiles [3].

I.4 Répartition et localisation :

Les huiles essentielles se trouvent dans diverse familles botaniques, sont localisées dans toutes les parties vivantes des plantes et se forment dans le cytoplasme de cellules spéciales [17].

I.4.1 Répartition :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité de familles, sont des *Lamiaceae*, des *Myrtaceae*, des *Rutaceae*, des *Asteraceae*, mais aussi des *Apiaceae* [19].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, tels que les sommités fleuries (Menthe, Lavande), les feuilles (Eucalyptus, Laurier), les rhizomes

(Gingembre), les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (Vétiver), les graines (Muscades), et plus rarement les écorces (Cannelier) [19].

I.4.2 Localisation :

La synthèse et l'accumulation des HEs sont généralement liées à la présence de structures histologiques, qui se spécialisent dans catégories de dispositifs de sécrétion :

- les canaux sécréteurs sont caractéristiques des familles suivantes : *Hypericaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Burseraceae*, et *Anacardiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, etc.
- les cellules sécrétrices ne sont pas organisées en glandes mais restent isolées. Elles sont retrouvées particulièrement chez la famille des *Brassicaceae*.
- les poches sécrétrices schizogènes sont vues par transparence sous forme de points réfringents, caractéristique de la famille des *Myrtaceae*, des *Myoporaceae*, des *Rutaceae*, et des *Hypericaceae* [20].

I.5 Composition chimique :

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable [21]. La composition chimique des essences peut varier en fonction de l'organe, des facteurs climatiques, de la nature du sol, des pratiques culturales et de la méthode d'extraction [22]. Ces constituants appartiennent quasi exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (composés terpéniques).et le groupe des composés aromatiques (volatils) dérivés du phénylpropane. Ils peuvent également contenir divers produits issus du processus de dégradation impliquant des constituants non volatils.

I.5.1 Les composés terpéniques :

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par la synthèse de deux ou plusieurs cellules isoprène, le polymère isoprène de formule (C_5H_8). Les huiles essentielles contiennent surtout des monoterpènes, des sesquiterpènes et rarement de diterpènes [23].

I.5.2 Les composés aromatiques :

Les huiles essentielles contiennent également des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins courants que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente [24]. Cette classe comprend des composés parfumés comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole. Ils sont fréquemment rencontrés dans les HEs d'Apiacées (cumin, fenouil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic, du clou de girofle [25].

I.5.3 Les composés d'origines diverses :

Ce sont des produits issus de la transformation de molécules non volatiles pouvant être entraînées par la vapeur d'eau. Ce sont des composés résultant de la dégradation des acides gras, des terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les bétuns des produits de masse moléculaire plus importante qui ne peuvent pas être entraînés à la vapeur d'eau, mais qui peuvent être extraits par des solvants : homologues de phénylpropanes, diterpènes, etc [3].

I.6 Techniques d'extraction :

Il existe plusieurs différentes méthodes ou technique principales pour l'extraction des huiles essentielles :

I.6.1 Hydrodistillation :

C'est la méthode la plus simple et la plus ancienne utilisée pour extraire les huiles essentielles. Le processus consiste à immerger le matériel végétal dans un récipient rempli d'une quantité adéquate d'eau. Tout est ensuite porté à ébullition [3]. Différents évaporateurs sont concentrés sur la surface froide et l'huile essentielle est séparée par densité [26]. Les inconvénients de cette méthode sont : la déshydratation de la matière végétale, qui entraîne des changements dans la composition et les propriétés chimiques des huiles essentielles, le manque de contrôle de la température du récipient contenant le mélange (eau + parties de la plante) et des changements dans l'odeur, la couleur et la composition de l'huile au cours de la distillation [27].

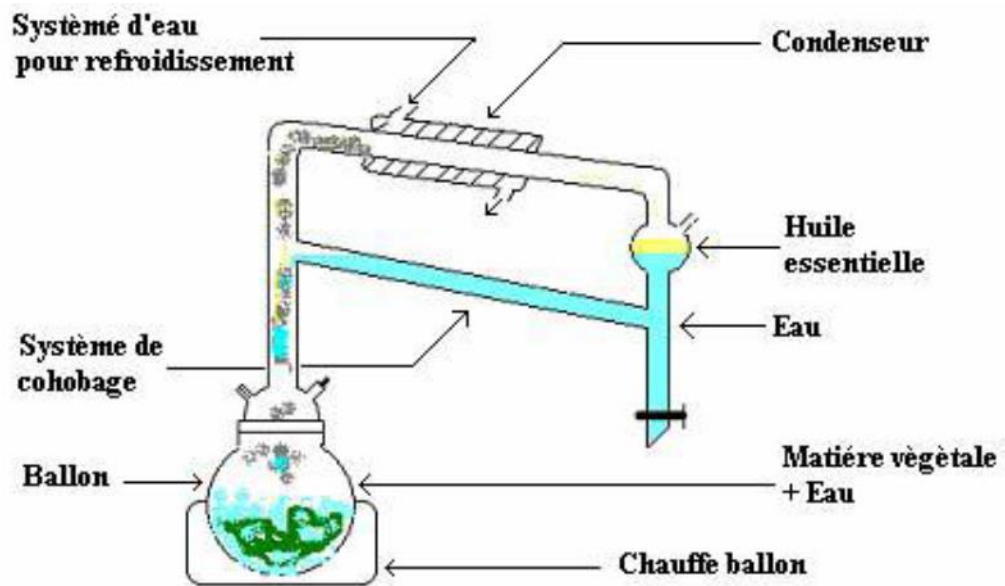


Figure 1: Schéma du principe de la technique d'hydro distillation [28].

I.6.2 La distillation par entrainement à la vapeur d'eau :

Contrairement à l'hydrodistillation, cette technique ne fait pas entrer l'eau en contact direct avec le matériel végétal à traiter. Le principe de distillation de la vapeur d'eau est que la vapeur de vapeur traverse la plante à une température suffisante pour détruire les cellules végétales, libérer les substances aromatiques et la lier au serpentin de refroidissement. Là, l'évaporateur revient à l'état liquide en formant un mélange « eau + huile essentielle ». Il est recueilli en essence, huile essentielle et eau de fleur et séparé par une simple différence de densité. L'absence de contact direct entre l'eau et les plantes, suivie de l'interaction entre l'eau et les molécules aromatiques, empêche la survenue d'une certaine hydrolyse ou érosion qui peut affecter la qualité de l'huile [29].

I.6.3 Hydrodiffusion :

L'hydro-diffusion consiste en une dispersion de vapeur d'eau à très basse pression à travers la masse des plantes, de haut en bas [30]. Les composés de vapeur contenant l'huile tombent sous le treillis contenant la matière végétale. L'avantage de cette méthode est qu'ils sont plus rapides et n'endommagent donc pas leurs composés volatils. De plus, l'hydrodiffusion

permet des économies d'énergie en raison du raccourcissement de la période de lixiviation et donc de la réduction de l'utilisation de vapeur [31].

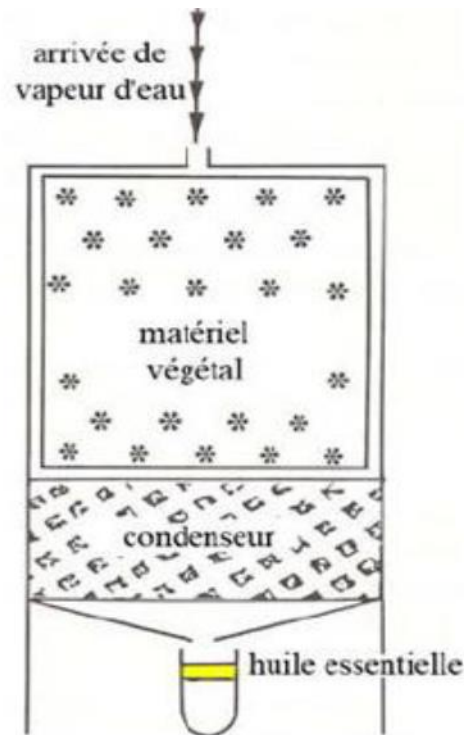


Figure 2: Schéma de l'hydro diffusion [31].

I.6.4 Extraction assistée par micro-onde :

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technologie qui combine l'utilisation de micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce système, la matière végétale est chauffée dans une chambre à micro-ondes fermée où la pression est continuellement réduite. Les agrégats volatils sont transportés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau végétale. Il est ensuite récupéré à l'aide de méthodes conventionnelles de vapeur, de refroidissement et de stabilisation. Des études montrent que cette technique présente plusieurs avantages tels que le gain de temps de production, l'utilisation d'une petite quantité de liquide et une efficacité de production élevée [32].

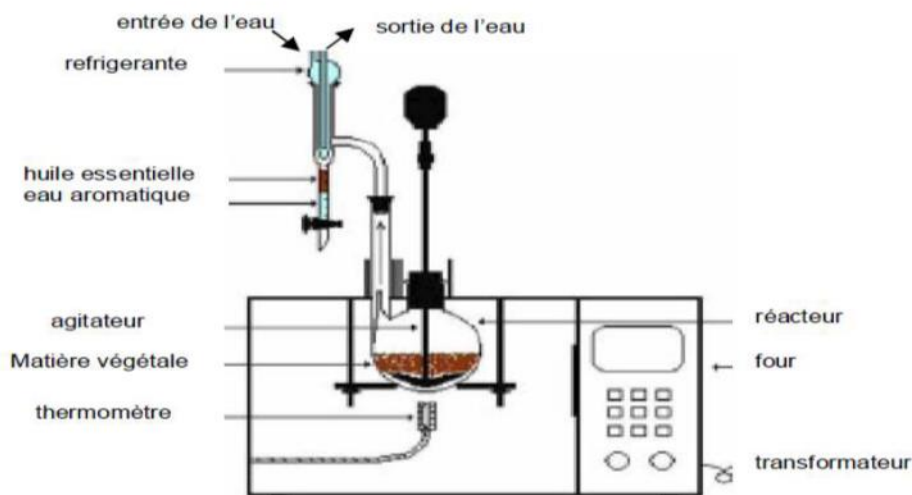


Figure 3 : Montage d'hydrodistillation assistée par micro-ondes [33].

I.6.5 L'extraction par les solvants volatils :

Cette méthode est utilisée pour les parties de plantes hautement concentrées en essence ou en nutriments qui ne peuvent pas être produites par distillation. Il est basé sur la capacité de certains liquides à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce processus, l'épuisement des plantes est réalisé à l'aide d'un liquide qui s'évapore qui ne laisse aucune saleté, une très belle couleur et une couleur très parfumée appelée « concrète ». Le traitement pratique de l'alcool complet conduit à « l'absolue » [34] [35].

I.6.6 Extraction par du CO_2 supercritique :

L'origine de cette technique est basée sur le liquide utilisé : il s'agit de la phase supercritique au CO_2 . L'extraction consiste à comprimer la pression et la température du dioxyde de carbone au-delà du point critique ($P = 72,8 \text{ bar}$ et $T = 31,1^\circ \text{C}$) [36]. A l'état supercritique, le CO_2 n'est ni liquide ni gazeux, ce qui lui confère une excellente capacité de production, qui peut être convertie à souhait en ajustant la température de fonctionnement. Les liquides tels que le CO_2 liquide continu sont bons à l'état supercritique et les gaz liquides sont médiocres [37].

L'avantage de cette méthode est la possibilité de dissoudre et de recycler le liquide en utilisant un simple lavage et relaxation. De plus, la température de sortie est faible dans le cas du dioxyde de carbone et ne résiste pas aux composants les plus fragiles [38].

I.6.7 L'expression à froid :

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles du fruit de la famille des *Rutacées* (citron, orange, mandarine, etc.). Il s'agit d'une méthode simple et polyvalente consistant en une fraction mécanique (compression, abrasion, perforation, incision, etc.) de poches à essence (généralement au niveau de l'écorce ou du péricarpe des graines) pour recueillir un mélange de parfums et d'« eau ». Les huiles essentielles sont séparées par décantation ou centrifugation [39].

I.6.8 Extraction par les ultrasons :

Lorsque les ultrasons se répandent, les oscillations liquides des molécules provoquent la formation de zones raréfaction, où les cycles de raréfaction augmentent, le liquide de cohésion des forces articulaires est vaincu et les bulles se cassent. Ces bulles se formeront à la surface de la plante, provoquant la rupture des membranes cellulaires et la libération du contenu [40]. Étant donné que les glandes contenant des HE sont généralement situées à la surface des plantes aromatiques, l'extraction détruit les glandes qui libèrent de l'huile dans le milieu environnant [41].

I.6.9 Extraction par enfleurage :

L'enfleurage est une technique originaire de l'Égypte ancienne. Il consiste en le dépôt de plantes, en particulier les organes délicats (fleurs d'oranger, plantes à fleurs) de la couche de graisse animale qui devient à essence entières. Le corps gras est ensuite imbibé d'alcool qui restaure l'odeur puis s'évapore [42] [43].

Cette technique difficile, qui demande une grande activité, est de moins en moins utilisée au profit de l'extraction liquide, du fait de son faible rendement et du volume élevé de main-d'œuvre nécessaire [43].

I.7 Activités biologiques des huiles essentielles :

Le rôle des huiles essentielles dans les végétaux est inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des constituants dans lesquels ils sont composés, donne des rôles très différents et des caractéristiques biologiques connues qui ont été utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation était basée sur des normes culturelles et des applications sans bases scientifiquement exactes. Actuellement, leur utilisation se fait sur une base scientifique et rationnelle car de nombreux travaux de recherche se concentrant sur les activités antimicrobiennes, antioxydants, antitoxiques, antivenimeuses, antivirales et antiparasitaires, récemment, sont également reconnus comme ayant des propriétés anticancéreuses [44].

I.7.1 Activité antioxydante :

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance active de faible puissance qui entre en compétition avec d'autres substances riches en oxygène et ainsi retarder ou empêcher l'absorption de ces substances. Ceux-ci sont produits quotidiennement par le corps [45]. Ce sont des composés très actifs constitués d'un seul électron nécessaire aux techniques importantes [46]. L'activité antioxydant des huiles essentielles est attribuable à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéole, le gèranial/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α - terpinène et γ -terpinène [47].

Certaines études ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques [48].

I.7.2 Activité antibactérienne :

Les huiles essentielles fonctionnent à la fois avec les bactéries Gram-positives et les bactéries Gram-négatives. Cependant, les bactéries Gram-négatives semblent être sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [49]. Les propriétés des huiles essentielles sont attribuées aux terpénoïdes et aux phénylpropanoïdes. L'activité des molécules bioactive dépend de lipophile de leur squelette hydrocarboné et du type hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les composés oxygénés sont généralement plus actifs que les composés hydrocarbonés [50]. Les huiles de ces plantes ont des caractéristiques générales,

elles sont riches en leurs composés phénoliques, tels que : l'eugénol, le thymol et le carvacrol, à activité antibactérienne [51].

I.7.3 Activité antifongique :

Les champignons, organismes saprophytes et omniprésents, se répartissent généralement en deux catégories : les levures et les petits champignons. Les infections fongiques chez l'homme sont appelées infections à levure. Ceux-ci peuvent être de plusieurs types : peau, cheveux, ongles, sous-cutanée ou systémique [52] [53].

Certaines huiles essentielles modifient la circulation cellulaire en incorporant des chaînes de graisse acétylées contenant des bicouches lipidiques et en empêchant la synthèse de l'ergostérol, qui à son tour perturbe les muqueuses. Le plasma entraîne des changements et des défauts dans l'adhérence des membranes cellulaires fongiques, réduisant ainsi leur dispersion et leur transmission [54].

Chapitre II

Etude botanique

II.1 Généralité sur *Mentha pulegium* :

Les menthes, nom latin *Mentha*, font partie de ce grand cortège de substances, ce sont des plantes vivaces, indigènes herbacées et très parfumées appartenant à la famille des *lamiacées*. Les menthes ont conservé une infinie variété d'utilisations depuis l'antiquité et occupent une grande place en thérapie [55].

Autant les senteurs sont facilement reconnaissables à leur parfum très spécifique, elles sont également difficiles à distinguer les unes des autres, en raison des formes intermédiaires et des racines hybrides qui les unissent. Parmi tous les *Lamiacées*, la menthe peut être identifiée, sauf par leur odeur particulière, par leurs petites fleurs, leurs tiges presque régulières [55].

Selon les principes de la chimie, la plupart des types de menthe ont leur propre odeur et leur propre activité dans leurs huiles essentielles [56]. Il existe un intérêt industriel important pour ces ingrédients hautement aromatisés. Ils sont généralement extraits de plantes d'espèces cultivées avec de bons rendements [57].

Menthe pouliot, *Mentha pulegium*, est une espèce la plus courante en médecine et les industries aromatiques [58].

Il est toxique à fortes doses et peut provoquer une fausse couche. La particularité de cette plante est qu'elle possède des insectes comme elle était auparavant utilisée pour repousser les insectes [59].

II.2 Description botanique :

La *Mentha pulegium* (Linné, 1753) appelée localement « Fliou » [60]. Est également appelée « pouliot » vient du latin *pulegium*, qui dérive de *pulex*, la puce car la plante a la propriété d'éloigner les puces [61].

Les menthes désignent une espèce de dicotylédones gamopétales, l'ordre des *Lamiales* et la famille des *Labiacées* [26]. La famille *Lamiaceae* ou *Labiatae* est une famille importante de plantes *dicotylédones*, qui comprend environ 4000 espèces et environ 210 genres dans le monde, mais principalement dans la région méditerranéenne [62].

Elle est représentée par deux sous espèces : *Mentha pulegiums sp. Vulgaris* et *Mentha pulegium ssp. Pulegium* [63].

II.3 La morphologie :

Mentha pulegium est une plante fertile dont la descendance semble assez homogène, se distingue des autres menthes par son port étiré, ses tiges en partie couchées sur le sol, ses fleurs rosées disposées au long de la tige et des rameaux, et son calice obturé [55].

C'est une plante de 10 à 30 cm de hauteur, à inflorescence formée de nombreux verticillés denses, feuillés et distants [63].

Les tiges à portion carrée sont dressées ou plus petites, vertes ou grises, et ont de branches. Les feuilles, opposées et petites, sont presque toutes ovales ou oblongues (légèrement dentelées) avec un court pétiole. Les fleurs, qui émergent en été, de mai à fin septembre, sont rose lilas, parfois blanches, et se rassemblent sous forme de feuilles de glomérules largement attachées à la tige. Chaque inflorescence, en cyme, est axillaire par une bractée foliacée. Elle englobe jusqu'à 30 fleurs. Deux prés feuillent, réduites, naissent à la base de chaque inflorescence. Le calice, persistant et finement velu, est en cloche. Il est faiblement bilabié, strié et à 5 dents subégales (les 2 dents inférieures sont plus étroites). La corolle est gamopétale formée de cinq pétales soudés. Le fruit est constitué de 4 akènes [63] [64].



Figure 4: la morphologie de *mentha pulegium* [65].

II.4 Nomenclature :

Nom commun :

- En français : Herbe aux puces, Herbe de saint Laurent, Bléchon, Pouliot.
- En anglais : *Pennyroyal*.

Nom botanique : *Mentha Pulegium L.*

Nom vernaculaire :

- En arabe : Feliou
- En targui ou berbère : Afligou, Félgou, Moursal, Temarsa [66] [67].

II.5 Classification botanique :

D'après [63] et [68], la classification botanique de *mentha pulegium* est la suivante :

Règne : Végétale

Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : *Lamiales*

Famille : Lamiacées

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha pulegium L*

Sous espèce : *Mentha pulegium ssp. Pulegium*

II.6 Distribution :

Pouliot (*Mentha pulegium*) est une plante vivace aromatique et est une plante commune sauvage ou de jardin. C'est une espèce spontanée dans toute l'Europe, trouvée dans les sols humides autour de la Méditerranée et de l'ouest de l'Asie (de Chypre au Turkménistan) et du nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte). En France, cette plante est très commune jusqu'à 1800 m d'altitude [65].

Mentha pulegium parmi les légumes recommandés dans le capitulaire De Villis au Moyen Âge [65].

II.7 Utilisation :

La partie aérienne florissante du pouliot est utilisée pour son effet antiseptique, mais aussi comme anti flatulent, carminatif, expectorant, diurétique, pour le traitement du rhume, de la sinusite, du choléra, des intoxications alimentaires, de la bronchite et de la tuberculose. Il fournit une huile essentielle connue sous le nom de *pennyroyal*. Ce dernier est utilisé outre-Atlantique comme arôme (fabrication de parfums et de savon) et comme insectifuge [3].

Elle a également une utilisation ancestrale pour aromatiser les sauces, les desserts et les boissons, elle est parfois cultivée comme plante condimentaire [67].

II.8 Composition des huiles essentielles du *Mentha pulegium* :

Les ingrédients de *Mentha pulegium*. Ont fait l'objet d'un certain nombre d'études qui ont montré une différence de son composition chimique selon la zone de culture et il présente quelques variations dans les composants de différents pays [65].

Les composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* d'Iran sont :

L'analyse de l'huile essentielle a révélé la présence de pipéritone (38,0%), de pipériténone (33,0%), d' α -terpinéol (4,7%) et de pulegone (2,3%) comme composants principaux [69].

Les composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* d'Uryguay sont :

Les résultats obtenus, vingt-deux composants différents ont été identifiés dans l'huile essentielle de *M. pulegium*, soit 99,3% de l'échantillon total. Les monoterpènes oxygénés (94,3%) étaient le principal groupe de constituants, le principal étant la pulegone (73,4%) suivie de l'isomenthone (12,9%) [70].

Les composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* d'Algérie sont :

L'huile essentielle de *Mentha pulegium*, 43 composés a été séparée par GC-MS, représentant 99,52% de la masse totale d'huile essentielle à partir de laquelle 29 composés ont été élucidés. Le composant majeur était la pulegone (38,815%), les autres composants présents dans des teneurs appréciables étaient : menthone (19,240%), pipériténone (16,528%), pipéritone (6,348%) et isomenthone (6,096%), Limonène (4,293%), Octaan- 3-ol (1,854%) [71].

Les composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* d'Egypt sont :

Les composants d'huile essentielle du *Mentha Pulegium* ont été isolés par hydrodistillation et analysés en utilisant GC-MS. L'huile contenait 53 composants. Les principaux composés étaient la pulegone (43,5%), la pipéritone (12,2%), le p-menthane-1,2,3-triol (6,5%), le γ -éléménène (3,6%), le guaiène (cis- β) (3,0%), l'acétate de carvacrol (2,6%) et l'alcool phényléthylique (2,4%) L'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. appartenait au chémotype pulegone car, l'huile est riche en pulegone (43,5%) [72].

Les composants de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Bulgarie sont :

La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* de Bulgarie a été déterminée par GC et GC / MS. Les composants de base, parmi les 21 identifiés, étaient la pulegone (42,9– 45,4%), la pipériténone (21,7– 23,1%) et l'isomenthone (11,3– 12,8%). Il n'y avait pas de différences qualitatives substantielles entre les huiles obtenues par distillation à l'eau ou à la vapeur [73].

II.9 Les activités biologiques des huiles essentielles de *mentha pulegium* :

II.9.1 Activité antioxydant :

L'étude de Hafedh H et ces collaborateurs en 2009 a montré que l'huile essentielle de *Mentha pulegium* a montré possèdent une grande capacité à éliminer les radicaux libres DPPH [4].

Les résultats sont en accord avec ceux présentés dans plusieurs études (étude d'El-Ghorab AH en 2006 [72] et étude de Barbara T et ces collaborateurs en 2012 [74]).

II.9.2 Activité antibactérienne :

L'étude de Mohaddese M et Ghasem H en 2008, les résultats ont montré une activité significative contre les micro-organismes en particulier les bactéries Gram-positives avec des zones d'inhibition, alors que les moins sensibles étaient les bactéries Gram-négatives en particulier *Escherichia coli* [69].

L'étude de de Hafedh H et ces collaborateurs en 2009, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *mentha pulegium* avait un grand potentiel d'activité antibactérienne contre les 10 bactéries (*S. epidermidis* CIP106510, *S. aureus* ATCC25923, *M. luteus* NCIMB 8166, *E. coli* ATCC 35218, *L. monocytogenes* ATCC19115, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium* LT2 DT104, *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* ATCC 14579) [4].

L'étude de Abdenour A et ces collaborateurs en 2012, Les données ont indiqué que *L. monocytogenes* EGD-e Gram-positif était la souche la plus sensible testée dans l'HE de *M. pulegium*. Cet HE possédait également le spectre antibactérien le plus large puisqu'il inhibait la croissance de cinq bactéries. HE de *M. pulegium* a montré une activité bactériostatique contre toutes les souches testées (à l'exception de *P. aeruginosa*) avec des valeurs CMI de (*E. faecium*) et (*S. aureus*, *L. monocytogenes* EGD-e et *E. coli* et *S. Enteritidis*) [75].

L'étude de Barbara T et ces collaborateurs en 2012, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* a été très efficace pour inhiber la croissance de toutes les bactéries testées (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. putrefaciens*, *P. putida*, *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta*, *L. innocua*) La CMI la plus basse a été trouvée pour *P. putida*, tandis que les valeurs les plus élevées ont été trouvées pour *S. typhimurium* et *L. innocua* [74].

L'étude de Habiba B et ces collaborateurs en 2011, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* présente de faibles effets inhibiteurs envers la plupart des bactéries testées. De plus, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 était résistant à l'huile essentielle. En général, les bactéries Gram négatives testées semblent plus résistantes que les bactéries Gram positives. Les deux espèces *Streptococcus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 étaient sensibles et ils étaient plus sensibles à l'huile de *M. pulegium* essentiel [71].

II.9.3 Activité antifongique :

L'étude de de Hafedh H et ces collaborateurs en 2009, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *mentha pulegium* avait un grand potentiel d'activité antifongique contre les 06 espèces fongiques testées (*Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*) [4].

L'étude de de Ivan M et ces collaborateurs en 2020, les résultats ont montré que l'huile essentielle de *mentha pulegium* présentait une forte activité contre *M. fructicola* et une activité modérée contre *B. cinerea*. L'HE est l'inhibiteur de croissance le plus actif contre les deux pathogènes [76].

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles de *M. pulegium* a été étudié contre deux champignons par Shama H et ses collaborateurs en 2011, il a provoqué une inhibition de la croissance d'*A. alternata* et *P. expansum* [77].

Sur la base de certaines études précédentes qui ont été mentionnées. Nous extrairons les huiles essentielles de menthe pouliot de deux régions différentes pour étudier leur composition et leurs activités biologiques.

Partie II

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et Méthodes

Ce chapitre est consacré à la description des différents matériels et méthodes expérimentales utilisés dans ce travail.

La partie expérimentale a été effectuée au niveau du laboratoire pédagogique de GP 2 du Département de génie des procédés de la Faculté des Sciences et Technologies université de Ghardaïa, au niveau du laboratoire de pédagogie microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ghardaïa, au laboratoire de microbiologie d'Ibn al-Heythem, Ghardaïa et le laboratoire de L.G.P (Laboratoire de Génie des Procédés) de l'Université Kasdi Merbah Ouargla.

Nous avons travaillé sur le protocole expérimental suivant :

- L'extraction de l'huile essentielle de la plante
- Analyses sur l'extrait tel que :
 - Paramètres physico-chimiques
 - Identification de la composition
- Activité antioxydante.
- Activité antibactérienne.

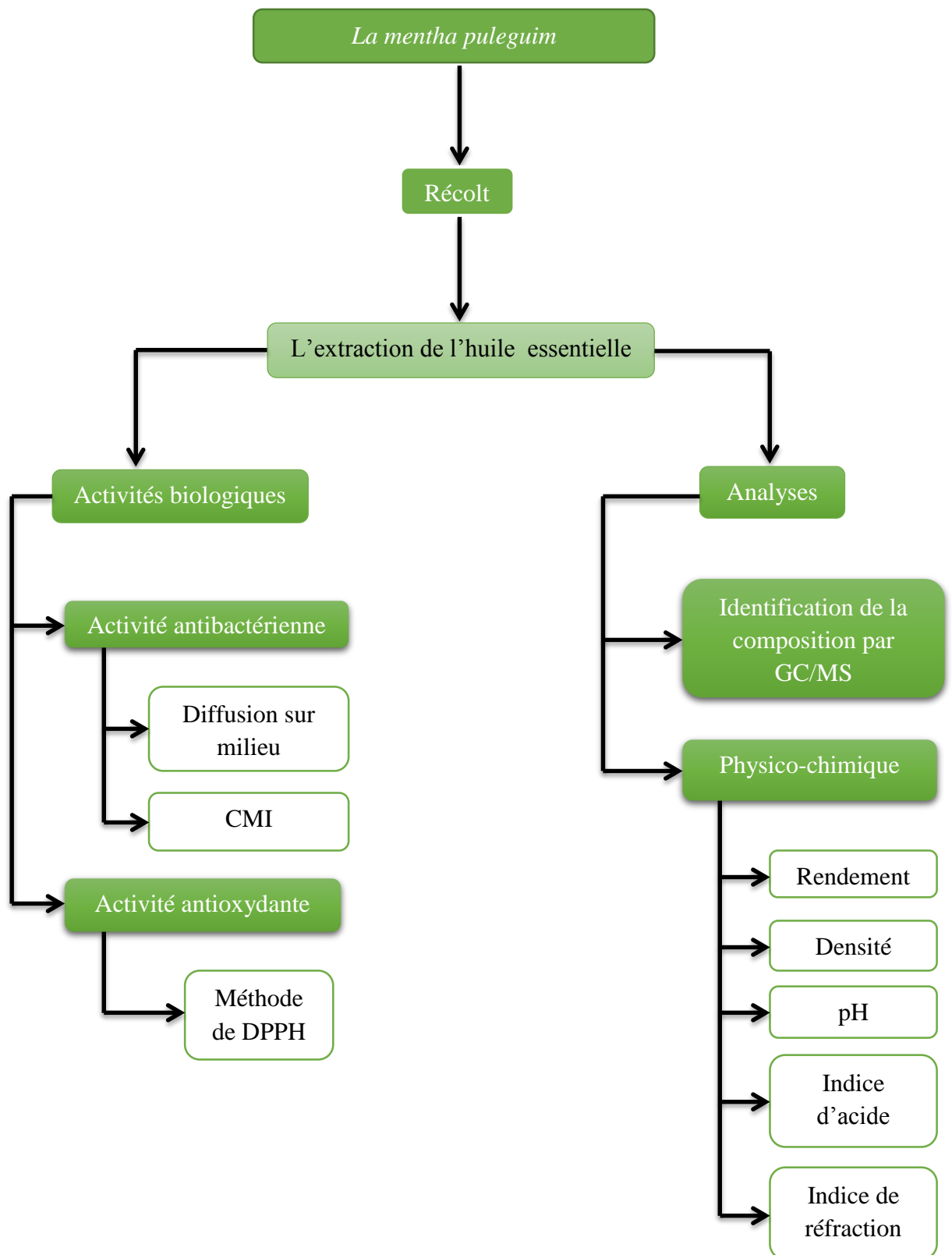


Figure 5: Plan générale de la partie expérimentale

III.1 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est la menthe pouliot (*mentha pulegium*). A été récolté dans les régions d’Ouargla au sud-est d’Algérie et de Ghardaïa dans le Nord du Sahara algérien en 31 janvier 2021 et séché pendant une semaine. La partie récoltée est constituée de feuilles, tiges et fleurs (partie aérienne). La plante a été nettoyée, lavée et séchée à l’air libre.



Figure 6: la plante *mentha pulegium*.

III.2 Extraction des huiles essentielles :

L’huile essentielle des *mentha pulegium* est été obtenue par hydrodistillation au sein du laboratoire pédagogique de GP 2.

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
<ul style="list-style-type: none"> - balance électrique ; - montage d’hydrodistillation (ballon de 2L, chauffe ballon, thermomètre, réfrigérant, l’ampoule à décanter) ; - flacons en verre. 	<ul style="list-style-type: none"> - la plante séchée ; - l’eau.

b. Mode opératoire :

100 grammes du volume de la plante sèche sont placés dans un ballon de 2 litres avec addition d'eau d'environ 2/3 du volume du ballon et porté à ébullition pendant 3h. La vapeur qui emporte l'huile essentielle avec elle monte et se condense par le réfrigérant pour descendre lentement sous forme de gouttelettes de (eau + huile) dans l'ampoule à décanter. L'huile essentielle est obtenue en la séparant de l'eau et en ajoutant une petite quantité de Na_2SO_4 pour en éliminer les résidus et les traces d'eau. L'huile est stockée est dans des flacons en verre scellés à une température de $5^{\circ}C$ et emballés pour les protéger de la lumière, pour éviter la dégradation.

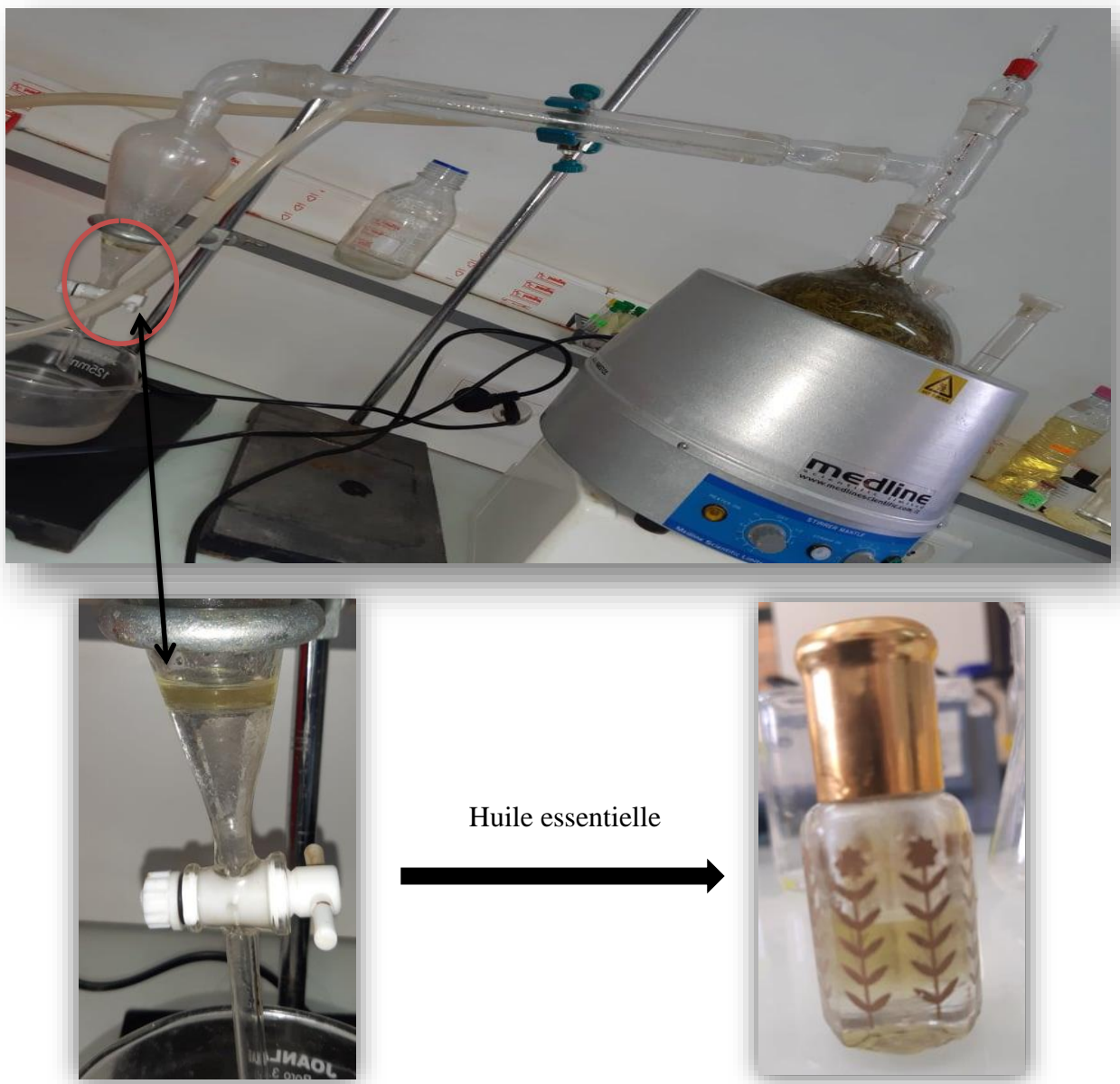


Figure 7: Montage d'extraction d'huile essentielle

III.3 Analyses des huiles essentielles :

III.3.1 Analyse physico-chimique :

III.3.1.1 Le rendement :

Selon [78] (AFNOR, 1986) Le rendement en huile essentielle est défini comme le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de matière végétale sèche utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{M_h}{M_p} \times 100 \quad (\text{A})$$

R : Rendement d'HE en (%)

M_h : Masse de l'huile essentielle

M_p : Masse de la plante sèche

III.3.1.2 Indice de réfraction :

L'indice de réfraction détermine la vitesse de propagation de la lumière dans l'huile essentielle. Il exprime le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans l'huile.

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule (AFNOR, 1999):

$$N_{20} = N_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C}) \quad (\text{B})$$

Avec :

N_{20} : indice à 20°C ;

N_t : indice à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
- Refractomètre (NAR-2T)	- Huiles essentielles ; - L'eau distillée.

b. Mode opératoire :

- Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée égale 0,333;
- Après ouverture du prisme secondaire, déposer 2 gouttes de l'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principale ;
- fermer délicatement le prisme secondaire et lire résultat.



Figure 8: Le réfractomètre.

III.3.1.3 Indice d'acide :

On appelle indice d'acide d'une huile, le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium alcoolique nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un (1) gramme (g) de matière grasse.

Le principe d'indice d'acide consiste à neutraliser les acides libres par une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium.

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
- Montage de titrage ;	- les huiles essentielles ; - KOH ; - éthanol ; - Phénolphtaléine.

b. Mode Opérateur :

Une prise d'essai de 1g d'huile est solubilisée dans un erlenmeyer contenant préalablement un 10ml d'éthanol. Le titrage des acides gras libres en solution est effectué avec une solution à 0,1N d'hydroxyde de potassium (*KOH*) dans de l'éthanol 95°, en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur coloré et cela sous agitation jusqu'au virage au rose. Noter le volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé [79] (AFNOR, 2000).

Le résultat est exprimé en mg de *KOH* par g d'huile.

$$\text{Indice d'acide} = [(V * T * 56,1) / P] \quad (C)$$

Avec :

V = volume de *KOH* en *mL* ;

T = titre de la solution de *KOH* en *mol/L* ;

P = prise d'essai en *g*.



Figure 9:Montage d'indice d'acidité.

III.3.1.4 la Densité :

La densité est le rapport de la masse volumique d'un liquide à celle de l'eau.

La densité est mesurée à l'aide d'un densimètre à la température ambiante puis ramenés à 20°C par la formule [79] (AFNOR, 2000):

$$D_{20} = D_t + 0,00068 (T - 20^{\circ}C) \quad (D)$$

Avec :

D_{20} : densité à 20°C ;

D_t : densité à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
- le densimètre.	- huiles essentielles ; - éthanol.

b. Mode Opérateur :

- Nettoyer soigneusement le densimètre rincé successivement au moyen d'éthanol ;
- Remplir le densimètre avec de l'huile essentielle ;
- lire résultat.



Figure 10: le densimètre.

III.3.1.5 Potentiel d'hydrogène (pH) :

pH L'abréviation de potentiel hydrogène mesure l'activité chimique des ions hydrogène H^+ en solution. Cette mesure est effectuée par un *pH*-mètre.

a. Matériels et réactifs :

Matériels	Réactifs
- <i>pH</i> -mètre ; - bécher.	- huiles essentielles.

b. Mode Opérateur :

Remplis le bécher par une quantité d'huile essentielle et mesuré le *pH* par *pH*-mètre.



Figure 11: le *pH*-mètre.

III.3.2 Analyse de la composition chimique des huiles essentielles :

L'analyse des huiles essentielles des plantes étudiées a été réalisée au L.G.P (Laboratoire de Génie des Procédés) de l'Université Kasdi Merbah Ouargla. Le chromatographe en phase gazeuse adopté est un **Bruker SCION 436 GC**, couplé à un spectromètre de masse à tension d'ionisation quadripolaire de 70 *ev*. La colonne utilisée est une HP-5MS ; 5% de phényl méthyl siloxane d'une longueur de 30 *m* et d'un diamètre intérieur de 0,25 *mm*. L'épaisseur du fil est de 0,25 *mm*.

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur (mode split 1: 50): 250 °C ;
- Programmation température : de 50 °C à 280 °C à une vitesse de 5 °C / min ;
- Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 1,2 ml / min.
- Les températures de la source quadripolaire sont fixées respectivement à 250 °C et 280 °C.
- Les indices de rétention linéaire (RI) pour tous les composés ont été déterminés en utilisant des n-alcanes comme étalons.

- L'identification des composés individuels a été réalisée en faisant correspondre leurs modèles de fragmentation spectrale de masse avec les données correspondantes disponibles (bibliothèque Wiley 275 (6^{ème} édition)).

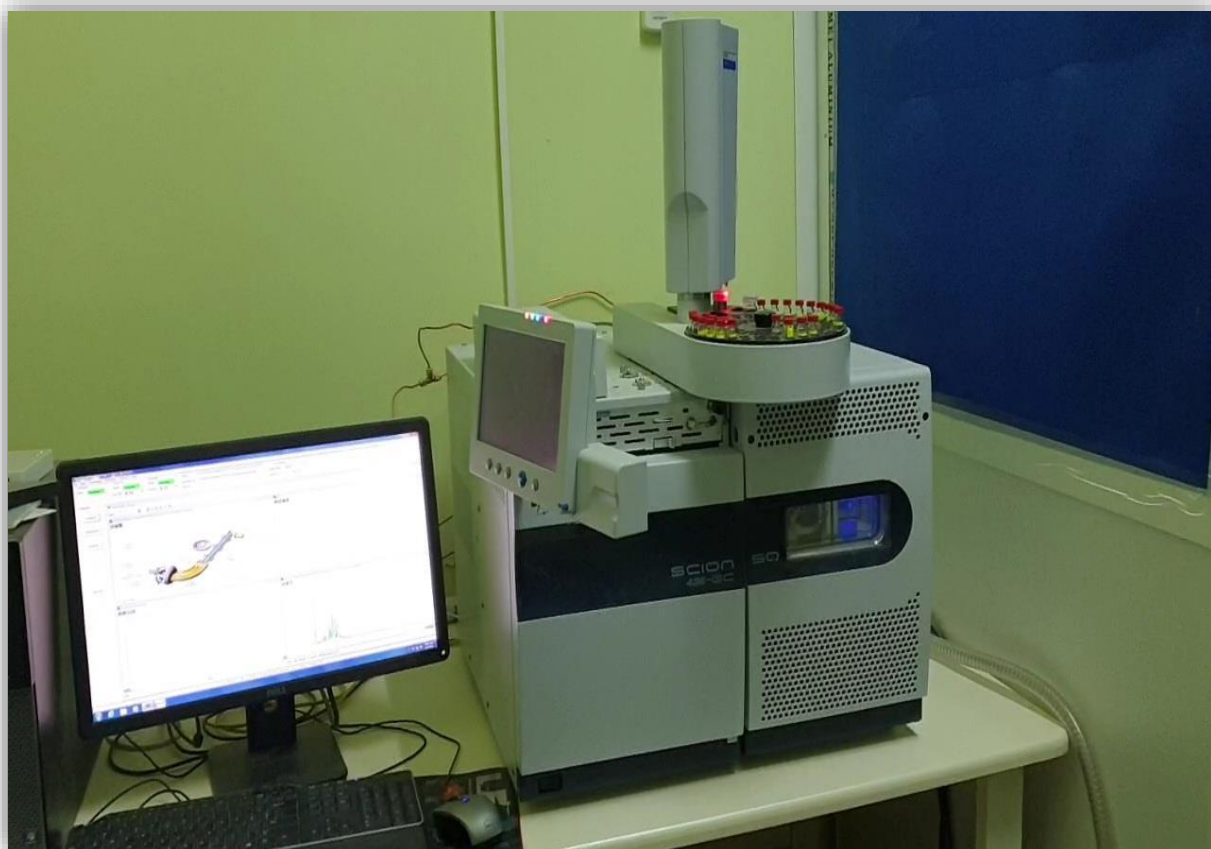


Figure 12: chromatographe en phase gazeuse adopté couplé à un spectromètre de masse GC/MS.

III.4 Activités biologique :

III.4.1 Activité antibactérienne :

Elles proviennent du laboratoire de microbiologie d'Ibn al-Heythem, Ghardaïa et du laboratoire de microbiologie de l'Université de Ghardaïa.

Les tests d'activités antimicrobiennes sont réalisés par la technique du contact direct méthode de diffusion sur milieu gélosé [80].

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
- Boîtes pétries ; - Pince ; - Autoclave ; - pipette pasteur ; - Ecouvillon ; - Disque de papier whatman ; - tubes à essai ; - Bec bunsen ;	- les souches bactériennes ; - Milieu Mueller Hinton ; - huile essentielle ; - Eau physiologique ;

III.4.1.1 Souches bactériennes :

Pour tester l'activité antimicrobienne d'huile essentielle de *mentha pulegium*. Quatre souches bactériennes ont été utilisées.

Ces souches sont :

- ✓ Bactéries à Gram positive : *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ACC19114.
- ✓ Bactéries à Gram négative : *Pseudomonas aeruginosa* IPA1, *Escherichia coli* E195.

a. Définitions :

- ***Escherichia coli*** : est également appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, en forme de bâtonnet, très commune chez l'être humain. *E. coli* est une bactérie anaérobie facultative que l'on trouve dans l'intestin des vertébrés [81].
- ***Pseudomonas aeruginosa***: Les bacilles à Gram négatif du genre *Pseudomonas* sont des habitants communs du sol, de l'eau douce et des milieux marins. *Pseudomonas aeruginosa* reçoit plus d'attention puisqu'il s'agit également d'un pathogène opportuniste, à l'origine de maladies humaines. La plupart des souches synthétisent des bactériocines. L'intérêt pour cette bactérie est attesté par la réalisation du séquençage complet du génome en 2000 [82].
- ***Listeria monocytogenes*** : est un pathogène intracellulaire Gram positif causant la méningite et la septicémie, qui affecte principalement les personnes âgées et immunodéprimées. La principale voie d'infection est l'ingestion d'aliments infectés. *L. monocytogenes* peut se développer dans les aliments à faible teneur en humidité et à forte concentration de sel, et à des températures de réfrigération [83].

- *Staphylococcus aureus* : est un agent pathogène polyvalent et virulent chez l'homme (Gram positif), qui sert de réservoir naturel à cet agent pathogène. Les taux d'infections causées par les staphylocoques, souches communautaires et hospitalières, augmentent régulièrement [84].

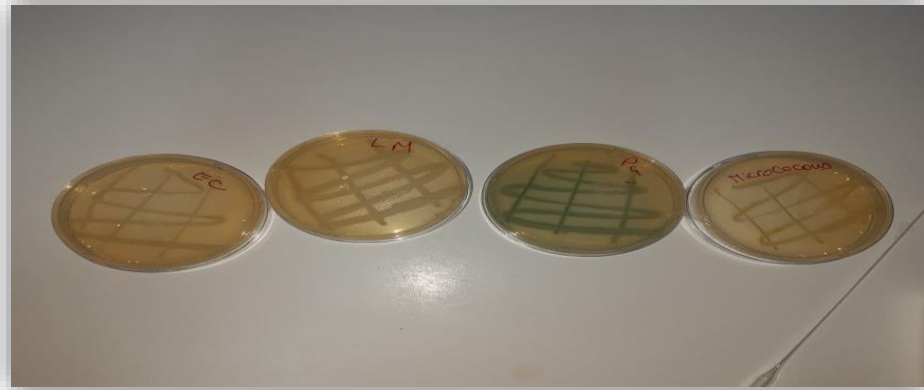


Figure 13: les souches bactériennes.

III.4.1.2 Préparation des boîtes de gélose :

a. Préparation zone stérile :

Avant de commencer le travail, la zone de travail doit être soigneusement nettoyée avec de l'eau Javel et utilise bec bunsen pour réaliser une zone stérile.

Nous préparons des disques de 6 mm à partir de papier Whatman 3 et les mettons dans un étuve pour les stériliser à 120 °C pendant 20 minutes.



Figure 14: Zone stérile.

b. Fusion de la gélose :

Figure 15: Réchauffement le contenu des bouteilles de Mueller Hinton à 95 °C.

c. Couler la gélose dans les boîtes :

Ce travail est effectué dans la zone stérile qui ne dépasse pas 15 cm sur le bec bunsen.

Nous versons la gélose dans les boîtes pétrie à raison d'environ 20 mL par boîte. Nous la laissons refroidir jusqu'à ce qu'elle se solidifie et soit prête.



Figure 16:boîtes pétries coulé par gélose.

d. Dépôt de disques :

À chaque changement d'huile essentielle ou changement de bactérie, la pince doit être ré-stérilisée.

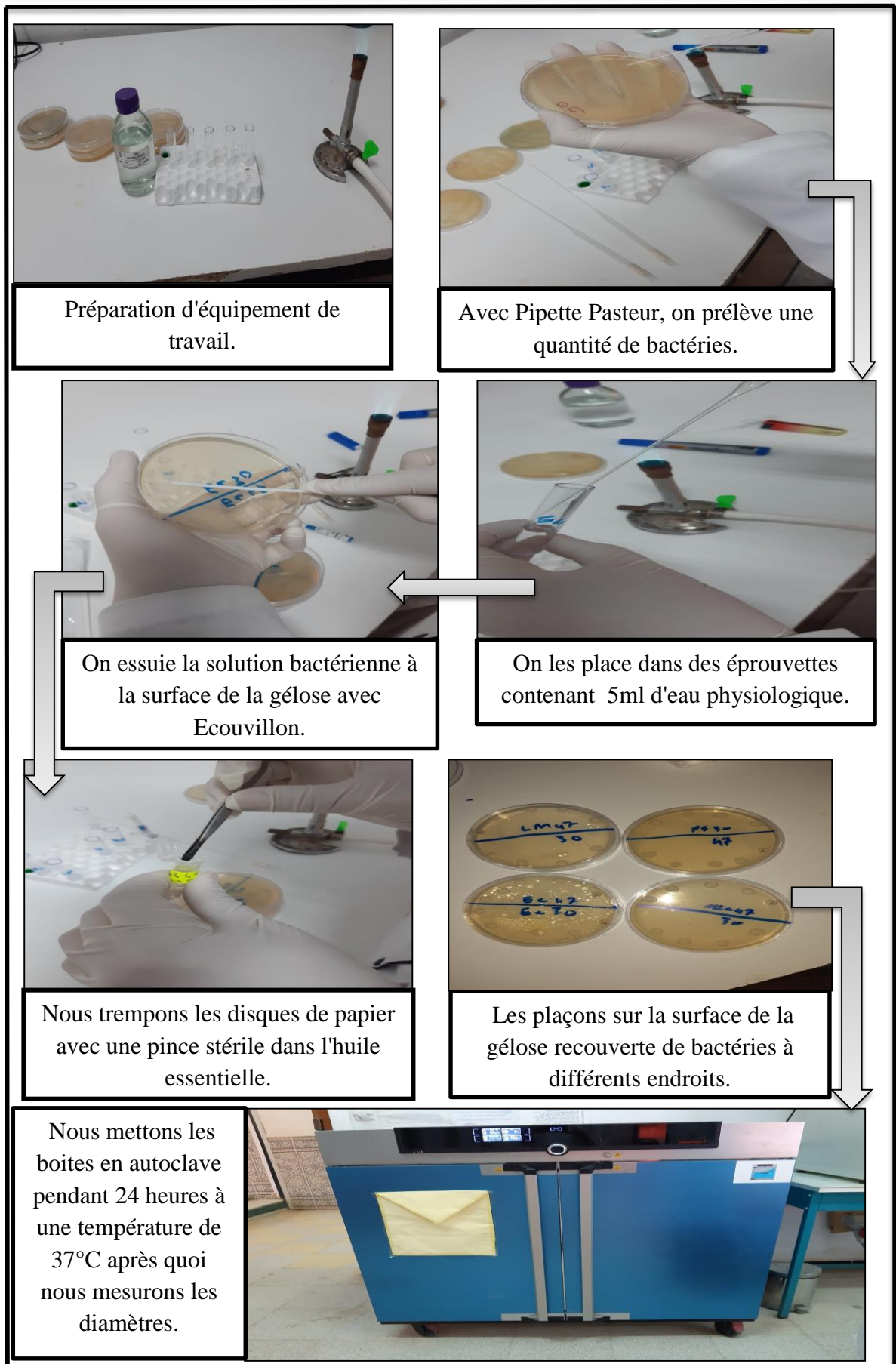


Figure 17: Protocole du test de l'activité antimicrobienne.

III.4.1.3 Détermination de CMI :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne de 90% [85].

Afin de déterminer le MIC, nous avons effectué les mêmes étapes de travail pour évaluer l'activité des bactéries à la surface de la gélose en modifiant la concentration des huiles essentielles.

Chaque huile a été concentrée et diluée par *DMSO* à 3 concentrations :

- 25 μ L d'huile + 75 μ L de *DMSO* ;
- 50 μ L d'huile + 50 μ L de *DMSO* ;
- 75 μ L d'huile + 25 μ L de *DMSO* ;

III.4.2 Activité antioxydante :

L'activité antioxydant est un processus complexe qui peut se produire au moyen de plusieurs mécanismes. En raison de sa complexité, plusieurs tests doivent être effectués lors de l'évaluation de l'activité antioxydant des composés purs ou extraits [86]. Une telle méthode qui est actuellement populaire est basée sur l'utilisation du radical libre (*DPPH*) stable.

III.4.2.1 Méthode de *DPPH* :

Afin d'évaluer l'activité antioxydant d'huile essentielle de *Mentha Pulegium*, nous avons appliqué la méthode *DPPH* suggérée par [87] [88] avec des modifications.

a. Matériels et produits :

Matériels	Produits
<ul style="list-style-type: none"> - balance électrique ; - tubes à essais ; - fiole; - Micro-seringue ; - vortex ; - UV. Visible (UVILINE 9400C). 	<ul style="list-style-type: none"> - huile essentielle ; - <i>DPPH</i> ; - éthanol.

b. Mode opératoire :

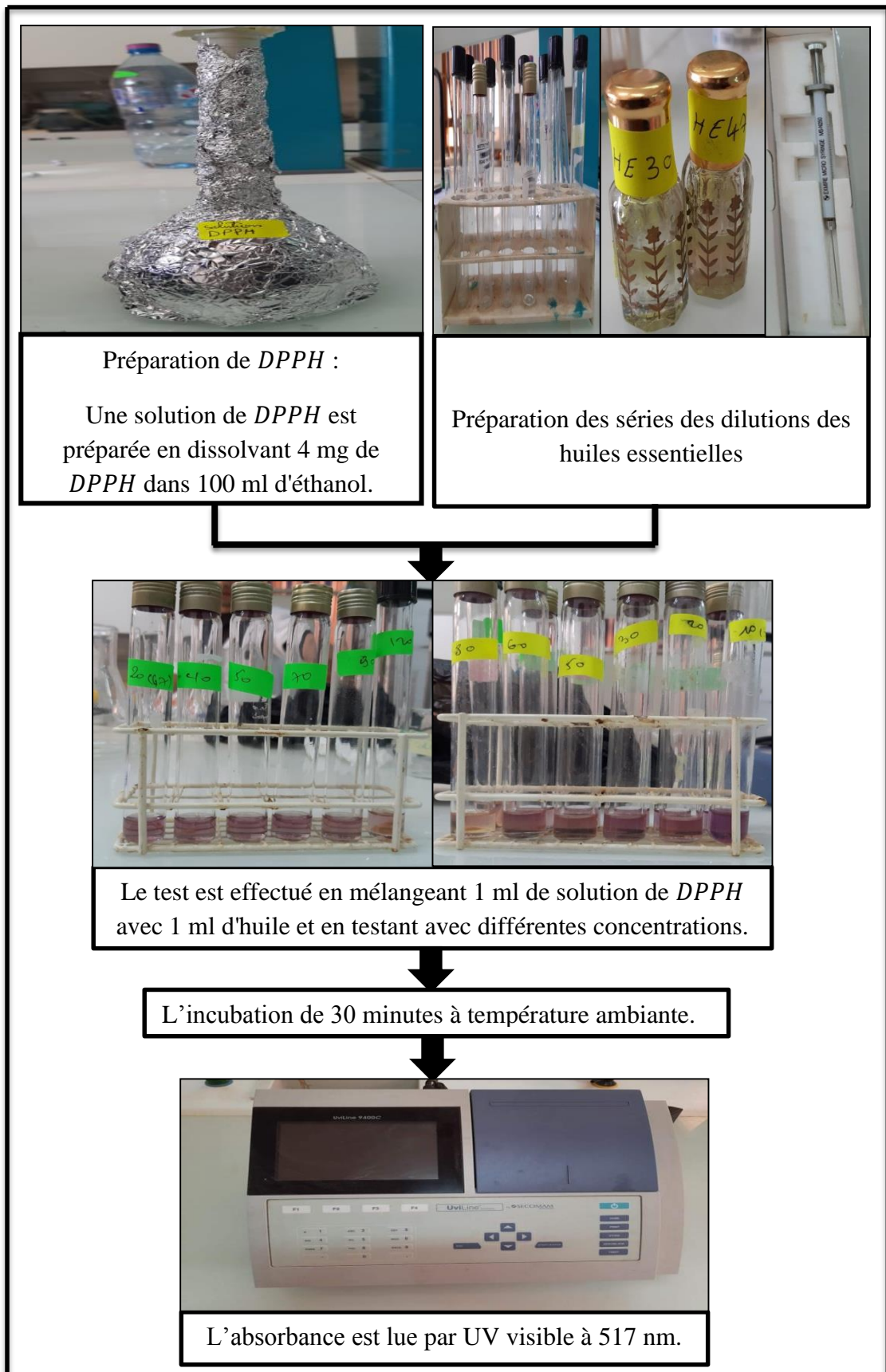


Figure 18: Protocol de test antioxydant.

L'activité antioxydant, qui exprime les capacités à piéger le radical libre, est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol (Inhibition% ou I%) selon la formule :

$$\text{Inhibition \%} = [(ABS_{control} - ABS_{test}) / ABS_{control}] \times 100$$

Avec :

$ABS_{control}$: Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517 nm;

ABS_{test} : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517 nm.

La valeur IC_{50} est définie comme étant la concentration de l'échantillon nécessaire pour donner une réduction de 50% des radicaux du DPPH. Les valeurs de IC_{50} ont été calculées par régression linéaire où la coordonnée X est représentée par la concentration des composés testés et ordonnée par (I %) le pourcentage d'inhibition [89].

Chapitre IV

Résultat et discussion

IV.1 Détermination de rendement :

Le rendement d'huile essentielle de Ghardaïa (HE 47) et huile essentielle d'Ouargla (HE 30) de la plante *Mentha pulegium* est calculé par rapport à 100 g de matérielle végétale sèche par la relation (A). Le tableau 1 montre le rendement des huiles essentielles.

Tableau 1: Rendement des huiles essentielles de *mentha puleguim* de différentes régions :

HE	<i>M.pulegium</i> de 47	<i>M.pulegium</i> de 30
Rendement (%)	1,77	1,79

A partir de ces résultats, on note qu'il existe une légère différence de rendement en huiles essentielles de *Mentha pulegium* entre les deux régions, *M.pulegium* de 30 le rendement le plus élevée (1,79%) que de *M.pulegium* de 47 (1,77%).

Ces résultats ne sont pas loin de ceux mentionnés par Elhoussine D et ces collaborateurs en 2010 avec une valeur de 1,66% [90].

Notre rendement est considéré comme inférieure par rapport aux résultats que certains chercheurs de la région du Maroc, incluent Benayad N en 2008, Nadia Z et ses collaborateurs en 2013 et Abdenour A et ses collaborateurs en 2012, qui sont des valeurs estimée 2,33% ,5,29% à 6,2% et 2,7% respectivement [12] [91] [92].

Notre huile essentielle est considérée comme ayant un rendement beaucoup plus élevé par rapport à certaines études obtenues par FAREH K et ABOU N en 2016 à la région de Bordj Bou Arreridj à rendement 0,64% [93], par A Stoyanova et ses collaborateurs en 2005 à la région de Bulgarie à rendement 1,54% et 1,48% [73], par Mohammad B H et ses collaborateurs en 2011 à la région de Iran à rendement 1,2% [94].

De ces différents résultats, on peut déduire la différence de rendement en huile essentielle de la plante *mentha pulegium* pour plusieurs raisons dont les plus importantes sont les différentes régions, la durée de séchage et la technique d'extraction.

IV.2 Analyses des huiles essentielles :

L'huile essentielle que nous avons obtenue par méthode d'extraction de plante de *mentha pulegium* pour deux régions différentes, il a les propriétés organoleptiques et propriétés physico-chimique.

IV.2.1 Analyses organoleptiques :

Tableau 2 : les propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *mentha pulegium* :

Caractère Organoleptique	Huile essentielle	HE de 47	HE de 30
Aspect		Liquide	Liquide
Couleur		Jaune pâle	Jaune pâle
Odeur		Menthe odeur	Menthe odeur

IV.2.2 Analyses physico-chimique :

Tableau 3:Caractéristiques physico-chimique d'huile essentielle de *mentha pulegium* :

Caractère Physico-chimique	Huile essentielle	HE de 47	HE de 30
La densité		0,9187	0,8951
Le pH		6,66	6,65
Indice de réfraction		1,4651	1,4652
Indice d'acidité		2,244mg/g	2,805mg/g

IV.2.2.1 La densité :

La densité de l'huile essentielle de *M.pulegium* de 47 et *M.pulegium* de 30 est 0,9187 et 0,8951, respectivement. Donc la densité de *M.pulegium* de 47 est supérieure à la densité de *M.pulegium* de 30.

Ces résultats sont supérieurs aux résultats obtenus par kada F et Bouhaddouda N avec une valeur de 0,87 [95] [96], et inférieurs aux résultats obtenus par Lahrech F avec une valeur de 0,998 [97] et par avec une valeur 0,974 [98].

IV.2.2.2 Le pH :

Le pH de l'huile essentielle de *M.pulegium* de 47 est 6,66 et *M.pulegium* de 30 est 6,65. Il était presque identique.

Les valeurs obtenues sont supérieures aux valeurs obtenues par Lahrech K ($pH = 5,77$) [97].

IV.2.2.3 Indice de réfraction :

L'indice de réfraction est calculé par la relation (B) pour chaque huile, Il était presque identique *M.pulegium* de 47 et *M.pulegium* de 30 (1,4651 et 1,4652, respectivement).

L'indice de réfraction de l'huile essentielle de la *mentha pulegium* à 20°C est conforme aux normes données par AFNOR (1999) (de 1,464 à 1,486).

Nos valeurs d'indice de réfraction sont proches de ceux relevés par Bouhaddouda N et Tahri B avec des valeurs 1,4643 et 1,461, respectivement [96] [98].

Quant à la valeur d'indice de réfraction obtenu par Lahrech K à un taux de 1,4869 [97] est supérieur à la valeur que nous avons obtenue.

L'indice de réfraction est inversement proportionnel au degré d'instaurations de l'huile. Plus l'indice de réfraction est bas, meilleure est la qualité de l'huile essentielle [99].

IV.2.2.4 Indice d'acide :

L'indice d'acidité est calculé par la relation (C) pour chaque huile, nous avons 2,244 mg/g de *M.pulegium* 47 et 2,805 mg/g de *M.pulegium* 30. Donc I_A de *M.pulegium* 30 est supérieure à I_A de *M.pulegium* 47.

Nos résultats sont considérés comme inférieurs à ceux de Lahrech K et Tahri B (4,48 et 8,6, respectivement) [97] [98].

Nous concluons donc que l'huile essentielle de *mentha pulegium* dont nous disposons a une meilleure conservation que les huiles d'autres chercheurs.

IV.2.3 Détermination de composition chimique des huiles essentielles :

Les résultats obtenus à partir de l'analyse chromatographique GC/MS des huiles essentielles de *M.pulegium* montré dans la figure 19 et 20.

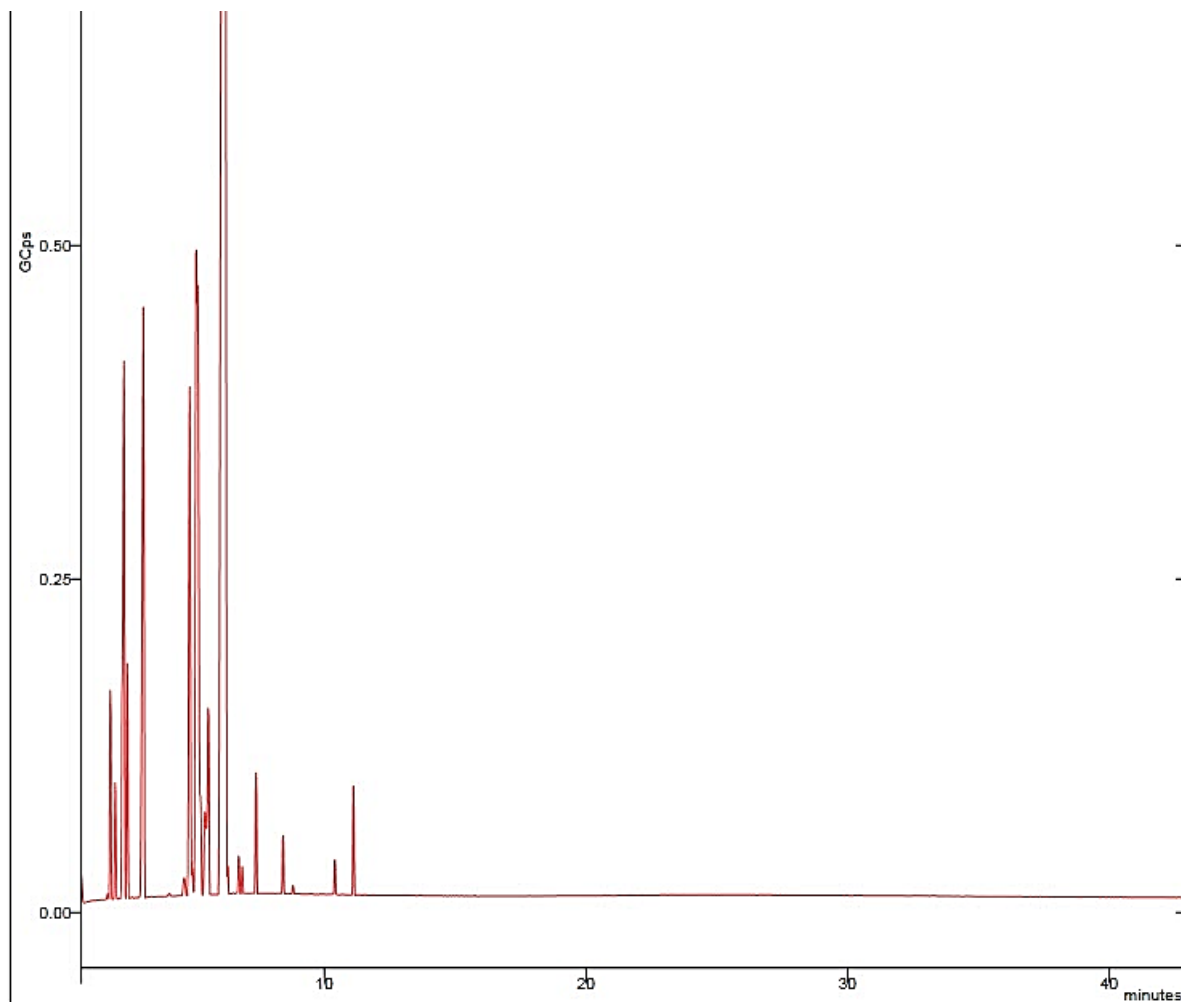


Figure 19 : Chromatogramme en GC/SM d'HE de *M.pulegium* de 47.

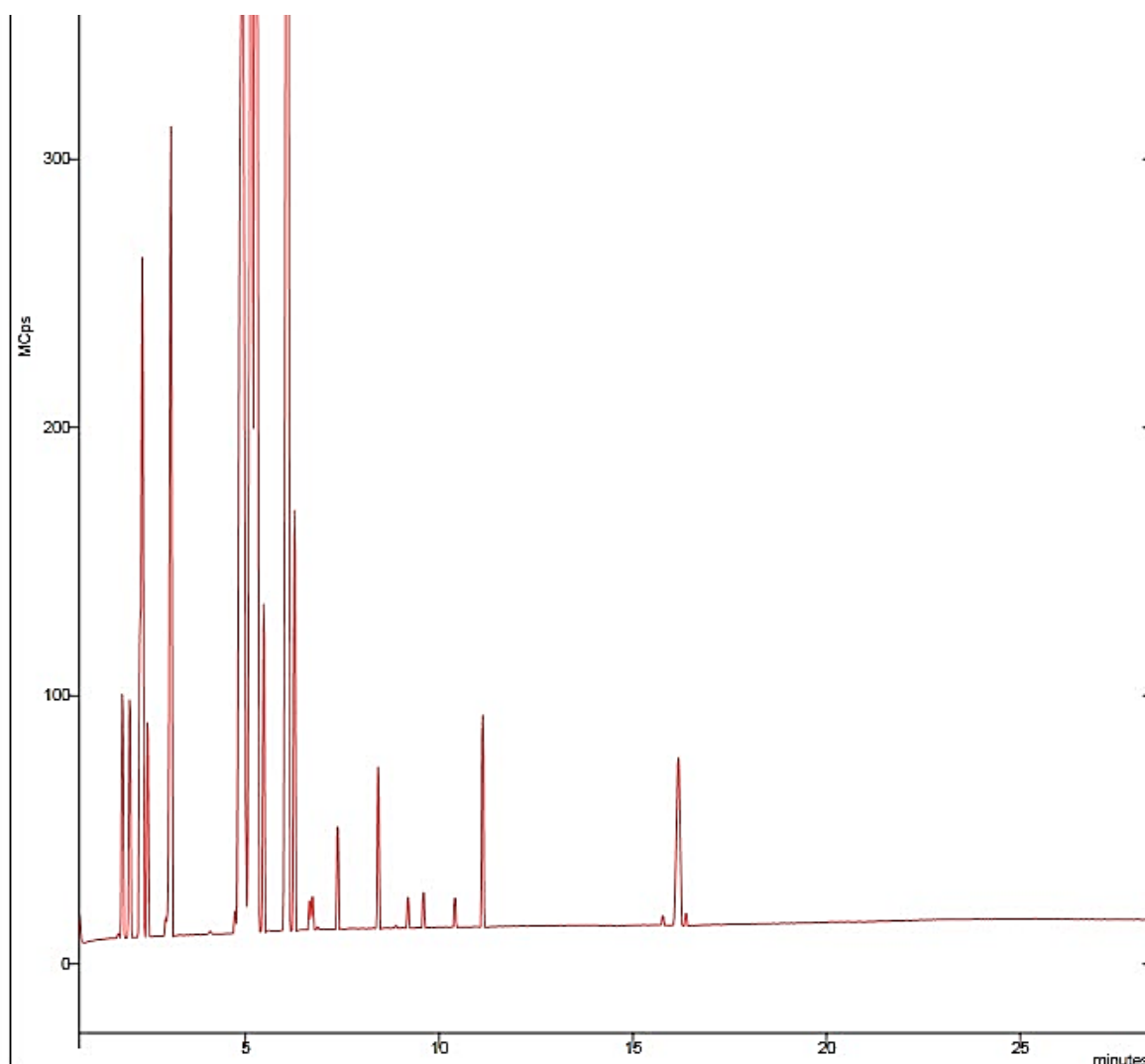


Figure 20 : Chromatogramme en GC/SM d'HE de *M.pulegium* de 30.

Le composé majorité dans l'huile essentielle 47 est l'iso pulégone, à 39,47%. Et le composé majorité dans l'huile essentielle 30 est I-menthone, à 24,11%.

D'après des études précédentes, on note que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *mentha pulegium* diffèrent d'une étude à l'autre [69] est trouver le composé majorité dans HE de *mentha pulegium* est piperitone 38%, [70] et [75] qui sont le composé majorité est monoterpènes oxygénés 94,3% et 78,6%, respectivement. Le composé majorité pulégone 38,815%, 43,5%, à 45,4% et 61,11% trouver par [71], [72], [73] et [4] respectivement.

IV.3 Activités biologique :

IV.3.1 Activité antibactérienne :

Le pouvoir antibactérienne des huiles essentielles de *M. pulegium*. A été étudié par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé (Mueller Hinton).

Les huiles essentielles de *mentha pulegium* par déférents concentrations ont été contestées contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, dont le but était d'évaluer leurs propriétés antibactériennes par la présence ou l'absence de zones cultivées d'inhibition et de calculer le diamètre de la zone. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux 4 ,5 et 6.

Tableau 4 : Activité antibactérienne d'HE *M. pulegium* de 47 :

Bac	Staphylococcus aureus (Gram positive)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram négative)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram positive)	<i>Escherichia coli</i> (Gram négative)
C				
	Diamètre des Zone (mm)			
100%	20	11	25	20
75%	14		14	12
50%	13		11	10
25%	8		8	8

Le tableau 4 montre le diamètre d'inhibition des différentes concentrations d'huile essentielle de *M.pulegium* 47 dans le *DMSO* contre les bactéries. La concentration à 100% montre une forte activité bactérienne sur *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (25mm, 20mm et 20mm respectivement) et plus faible valeur de *CMI* < (0,25 mg/mL), Le souche de *Pseudomonas aeruginosa* se révèle être le plus résistante avec un diamètre d'inhibition 11 mm.

Les données ont indiqué que *Listeria monocytogenes* gram positif était la souche la plus sensible testée dans l'huile essentielle de *M.pulegium* 47.

Tableau 5 : Activité antibactérienne d'HE *M.pulegium* de 30 :

C	Bac	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positive)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram négative)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram positive)	<i>Escherichia coli</i> (Gram négative)
	Diamètre des zone (mm)				
	100%	20	12	23	23
	75%	17		14	13
	50%	14		13	10
	25%	8		8	8

Quant au tableau 5, il montre les valeurs le diamètre d'inhibition des différentes concentrations d'huile essentielle de *M.pulegium* 30.

La concentration à 100% montre une forte activité bactérienne *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (23mm, 23mm et 20mm respectivement), et plus faible valeur de CMI < 0,25 mg / ml sauf contre *Pseudomonas aeruginosa* (12mm).

Les données ont indiqué que *Listeria monocytogenes* gram positif et *Escherichia coli* gram négatif étaient les souches la plus sensible testée dans l'huile essentielle de *M.pulegium* 30.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* était résistante à HE de 30 sauf à une concentration de 100% par valeur faible de 12 mm.

Tableau 6 : résultat d'activité antibactérienne d'HE *M.pulegium* par photos :

C		100%	75%	50%	25%
Bac					
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gramme positive)					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gramme négative)					
<i>Listeria monocytogenes</i> (Gramme positive)					
<i>Escherichia coli</i> (Gramme négative)					

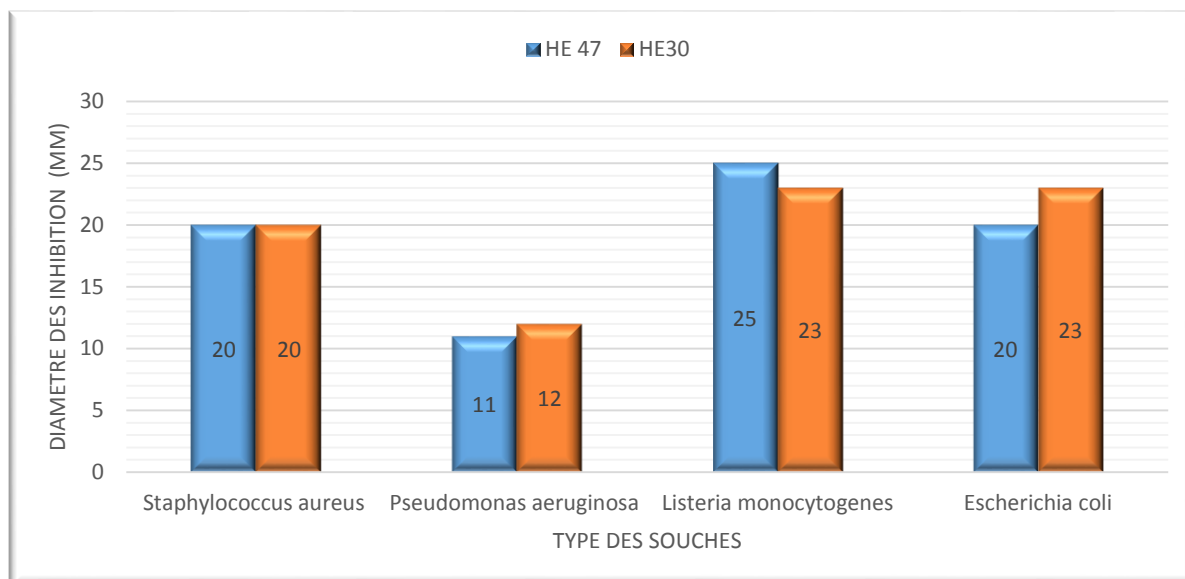


Figure 21 : résultats des huiles essentielles de *mentha pulegium*.

Le *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* étaient plus sensibles à l'huile essentielle de *M.pulegium* 30 que l'huile essentielle de *M.pulegium* 47. Quant *Listeria monocytogenes*, il était plus sensible à l'huile essentielle de *M.pulegium* 47 que l'huile essentielle de *M.pulegium* 30. *Staphylococcus aureus* était plus sensible aux deux huiles à même valeur.

On peut donc dire que l'huile essentielle de *mentha pulegium* est efficace et inhibitrice des quatre souches étudiées avec des valeurs différentes.

D'après les études précédentes, nous notons que les résultats que nous avons obtenus sont proches des résultats de [69], car il a été prouvé que l'huile de *M.pulegium* a une efficacité significative contre les bactéries Gram-positives avec des régions inhibitrices et des valeurs de concentration inhibitrices de l'ordre de 8 – 21 mm, tandis que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à Gram négatif étaient moins sensibles.

Les résultats obtenus par [71] montrent une résistance de la *Pseudomonas aeruginosa*. Contrairement à nos résultats, nous avons constaté qu'il y avait une activité sur *Pseudomonas aeruginosa* à valeurs de 11 à 12 mm. Quant à *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, ils y avaient une faible activité de 10 mm et 12.5 mm, respectivement par rapport nos résultats 23 – 20 mm d'*Escherichia coli* et 20 mm de *Staphylococcus aureus*.

[4] Il a été prouvé qu'il existe une activité contre les bactéries *Escherichia coli* (13,66mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8mm), *Listeria monocytogenes* (11,6mm) et *Staphylococcus aureus* (10,66mm), mais cette activité est considérée comme faible par rapport à ce que nous avons obtenu d'*Escherichia coli* (23 – 20mm), *Pseudomonas aeruginosa* (12-11mm), *Listeria monocytogenes* (23 – 25mm) et *Staphylococcus aureus* (20 mm).

Quant à l'étude [75], il montre que *Listeria monocytogenes* est la souche la plus sensible. Le résultat est similaire par rapport à notre étude. Quant au *Pseudomonas aeruginosa*, il était résistant, contrairement à notre étude où il avait une activité, et *Escherichia coli* avait une activité mais moins que la nôtre et *Staphylococcus aureus* avait une activité plus que notre.

IV.3.2 Activité antioxydante :

Nous avons évalué l'activité antioxydante des huiles essentielles de *mentha pulegium* par la méthode de DPPH.

On sait que la solution de DPPH, lorsqu'elle est mélangée avec une substance contenant des antioxydants, change de couleur du violet foncé à la cause de la conversion des radicaux libres indépendants DPPH en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine et elle est mesurée à 517 nm [100].

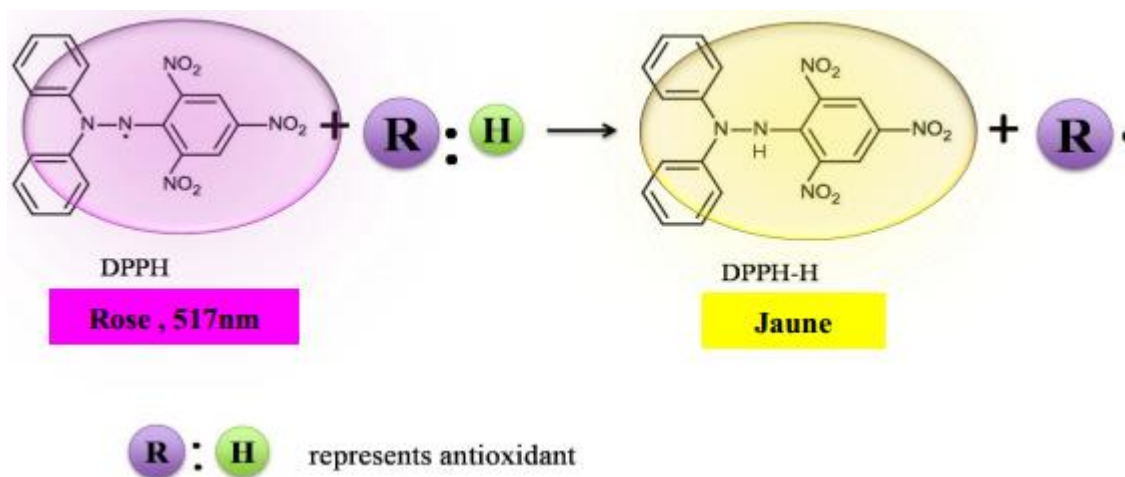


Figure 22 : Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (RH) [101].

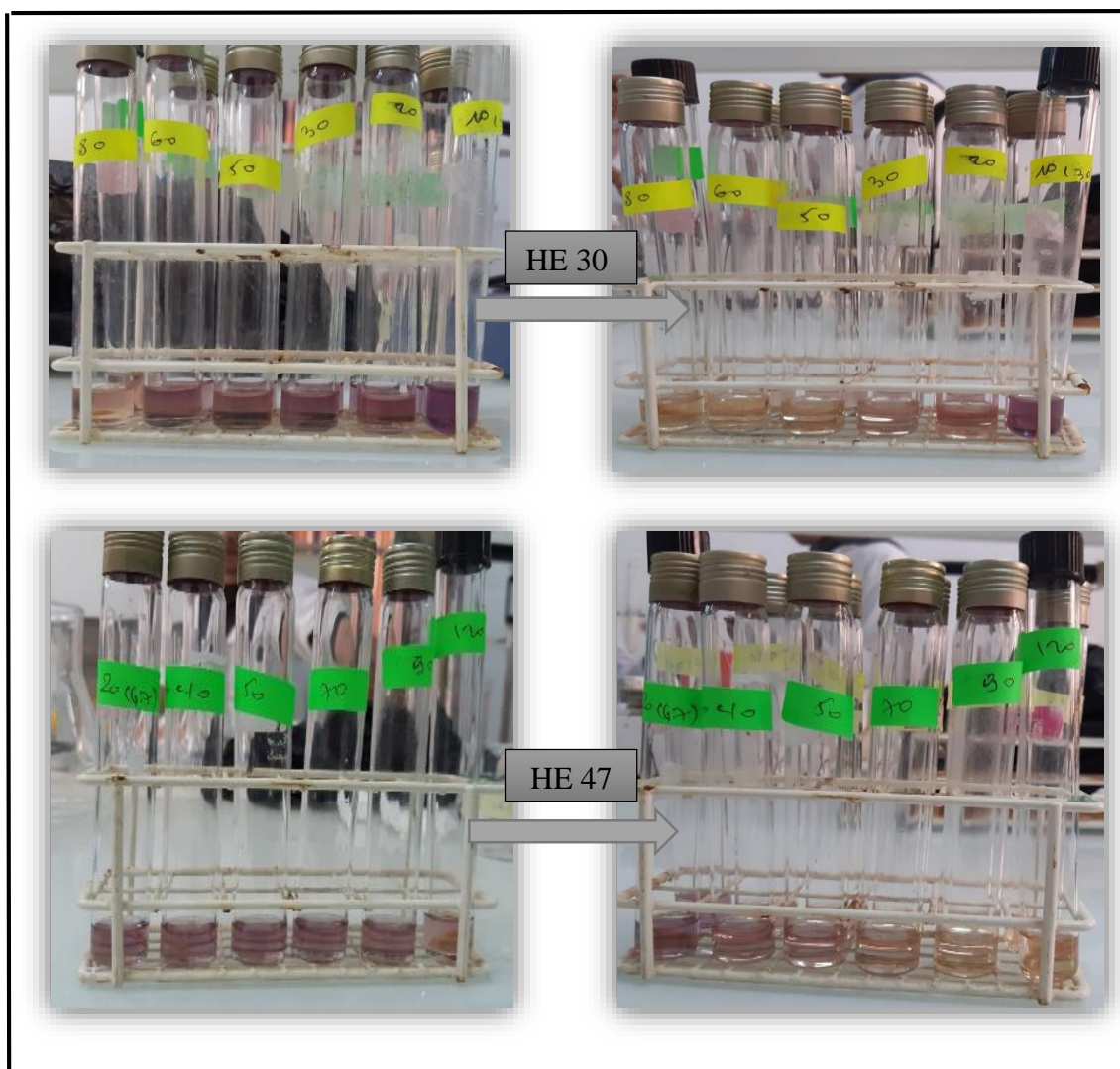


Figure 23 : Les résultats obtenus de l'activité antioxydante par la méthode de *DPPH*

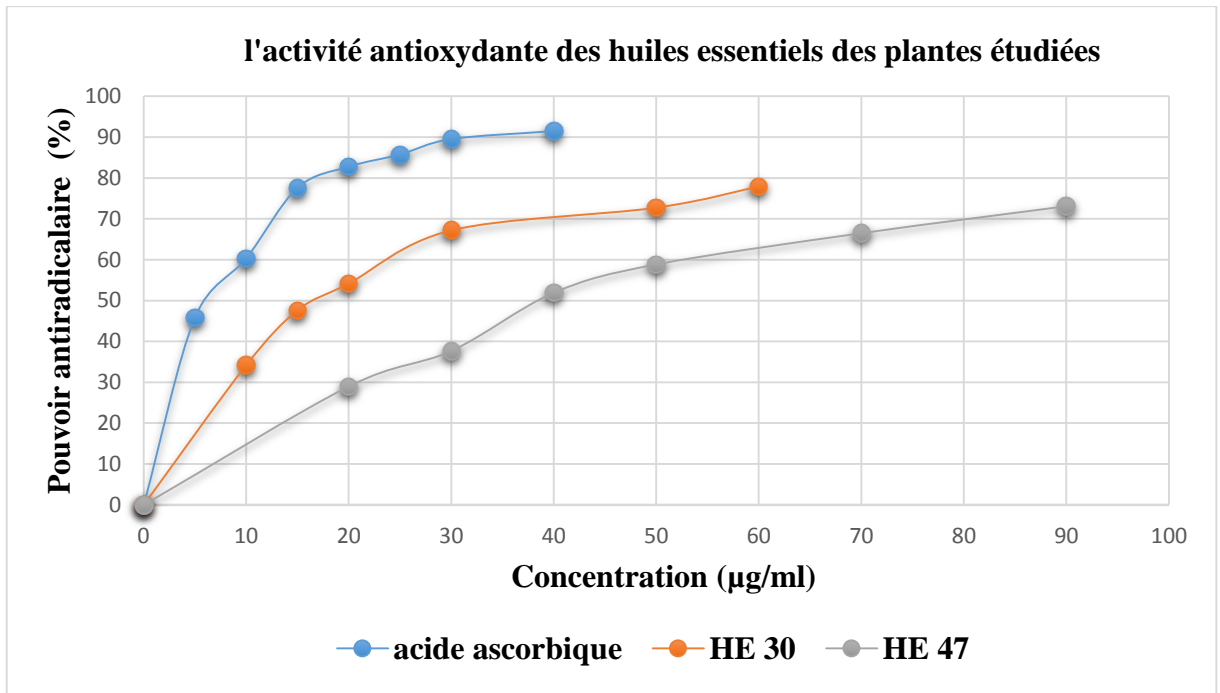


Figure 24 : Activité antioxydante des huiles essentielles de 30 et de 47 et acide ascorbique.

La figure 24 montre le pourcentage d’inhibition des radicaux libres avec augmentation de concentrations d’acide ascorbique et d’huiles essentielles 30 et 47, où l’on note que le pourcentage pour inhibition d'acide ascorbique est plus élevé que les huiles essentielles.

IC50 est la concentration inhibitrice de 50%, qui est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante, ce qui signifie que plus sa valeur est faible, plus l'activité antioxydante est élevée.

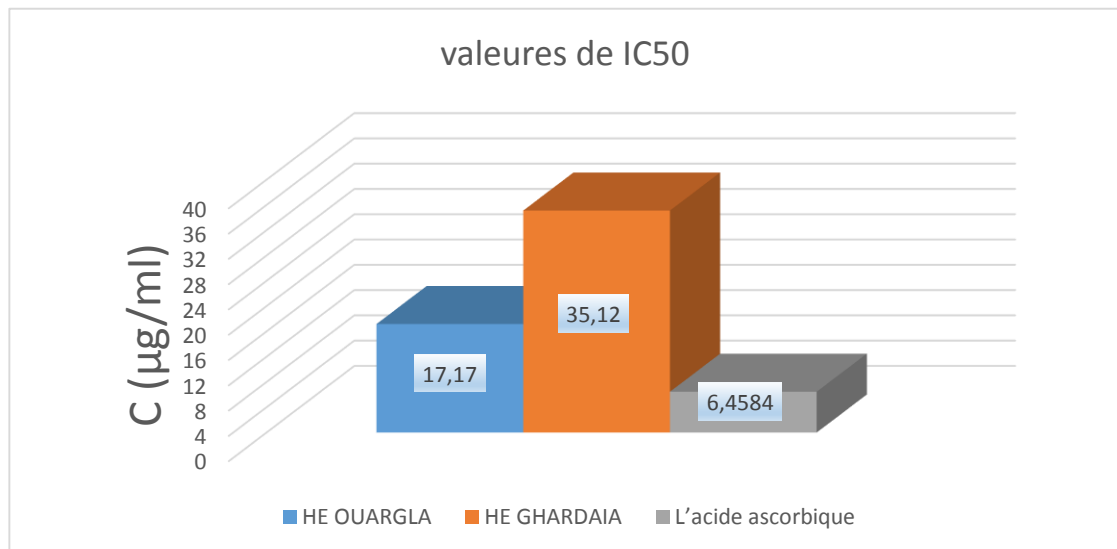


Figure 25 : Concentration inhibitrice à 50% des huiles essentielles et de l’acide ascorbique.

La figure 25 montre les valeurs d' IC_{50} pour l'acide ascorbique et les huiles essentielles 30 et 47. La valeur IC_{50} pour l'huile essentielle 30 ($17,17\mu g/mL$) de moins que pour l'huile essentielle 47 ($35,12\mu g/mL$).

La valeur IC_{50} pour l'acide ascorbique ($6,4584\mu g/mL$) est inférieure aux valeurs IC_{50} pour les huiles essentielles de 30 et 47.

D'une manière générale l'acide ascorbique possède une activité antioxydant plus fort qu'HE 30 et HE 47

Des études antérieures confirment une variation significative de l'activité antioxydante d'huiles essentielle de *mentha pulegium*. [4] La forte activité antioxydante de l'huile essentielle a été rapportée avec valeur de $IC_{50} = 10\mu g/mL$ étant l'activité antioxydante la plus élevée par rapport à nos résultats. Quant à la valeur d'activité antioxydante d'HE qu'il a évoquée [102], il s'avère que $l'IC_{50} = 69,60\mu g/mL$ est donc considérée comme moins active pour celle que nous avons obtenue.

L'huile essentielle de *mentha pulegium* en Iran et en Algérie s'est avérée avoir une faible activité antioxydante ($IC_{50} = 14736\mu g/mL$ et $IC_{50} = 9258,18\mu g/mL$) [103], [96].

IV.4 Effet synergique des huiles essentielles :

Pour améliorer les résultats obtenus, nous avons mélangé les huiles essentielles entre elles en trois concentrations différentes :

- 50% HE 47 avec 50% HE 30
- 75% HE 47 avec 25% HE 30
- 75% HE 30 avec 25% HE 47

IV.4.1 Activité antibactérienne :

Nous avons testé ces trois huiles sur les mêmes quatre types de bactéries, les résultats obtenus dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Activité antibactérienne d'effet synergique des huiles essentielles :

C	Bac	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positive)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram positive)	<i>Escherichia coli</i> (Gram négative)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram négative)
	Diamètre des		Zone (mm)		
50% HE 47	25	29	35	8	
50% HE 30					
75% HE 47	30	40	40	0	
25% HE 30					
75% HE 30	28	32	20	0	
25% HE 47					



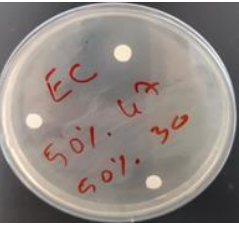
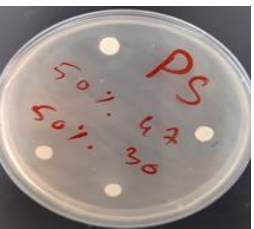


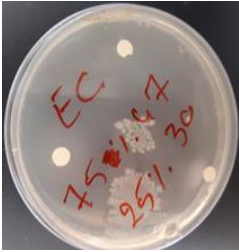
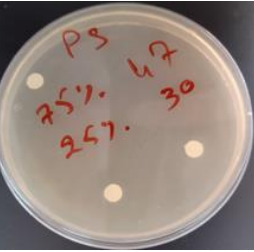
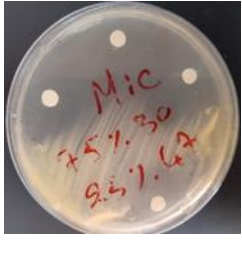


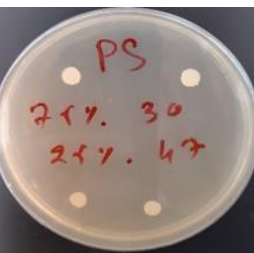
On note d'après les résultats que l'huile composée 50% HE 47 50% HE 30 a montré un effet sur toutes les souches testées *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec une valeur de 25, 29, 35 et 8mm, respectivement.

La composition 75% HE 47 avec 25% HE 30 a montré un effet sur trois souches *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* avec une valeur de 30, 40 et 40 mm, respectivement. La souche *Pseudomonas aeruginosa* était résistante à la composition huileuse.

Concernant la composition 75% HE 30 avec 25% HE 47, il a également montré un effet sur les trois souches de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* avec une valeur 28, 32, 20mm. Le *Pseudomonas aeruginosa* lui était résistantes.

À partir des résultats, nous concluons que la composition huileuse 75% HE 47 et 25% HE 30 à de meilleurs résultats que les deux autres compositions huileuses et est également meilleur que les huiles basiques HE30 avec HE47.

Tableau 8: activité antibactérienne d'effet synergique des huiles essentielles par photos :

Bac C	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gramme positive)	<i>Listeria monocytogenes</i> (Gramme positive)	<i>Escherichia coli</i> (Gramme négative)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gramme négative)
50% HE 47 50% HE 30				
75% HE 47 25% HE 30				
75% HE 30 25% HE 47				

IV.4.2 activités antioxydante :

Nous avons testé ces trois huiles sur activité antioxydante par la méthode de *DPPH*, les résultats obtenus dans les figures 25, 26 et 27.

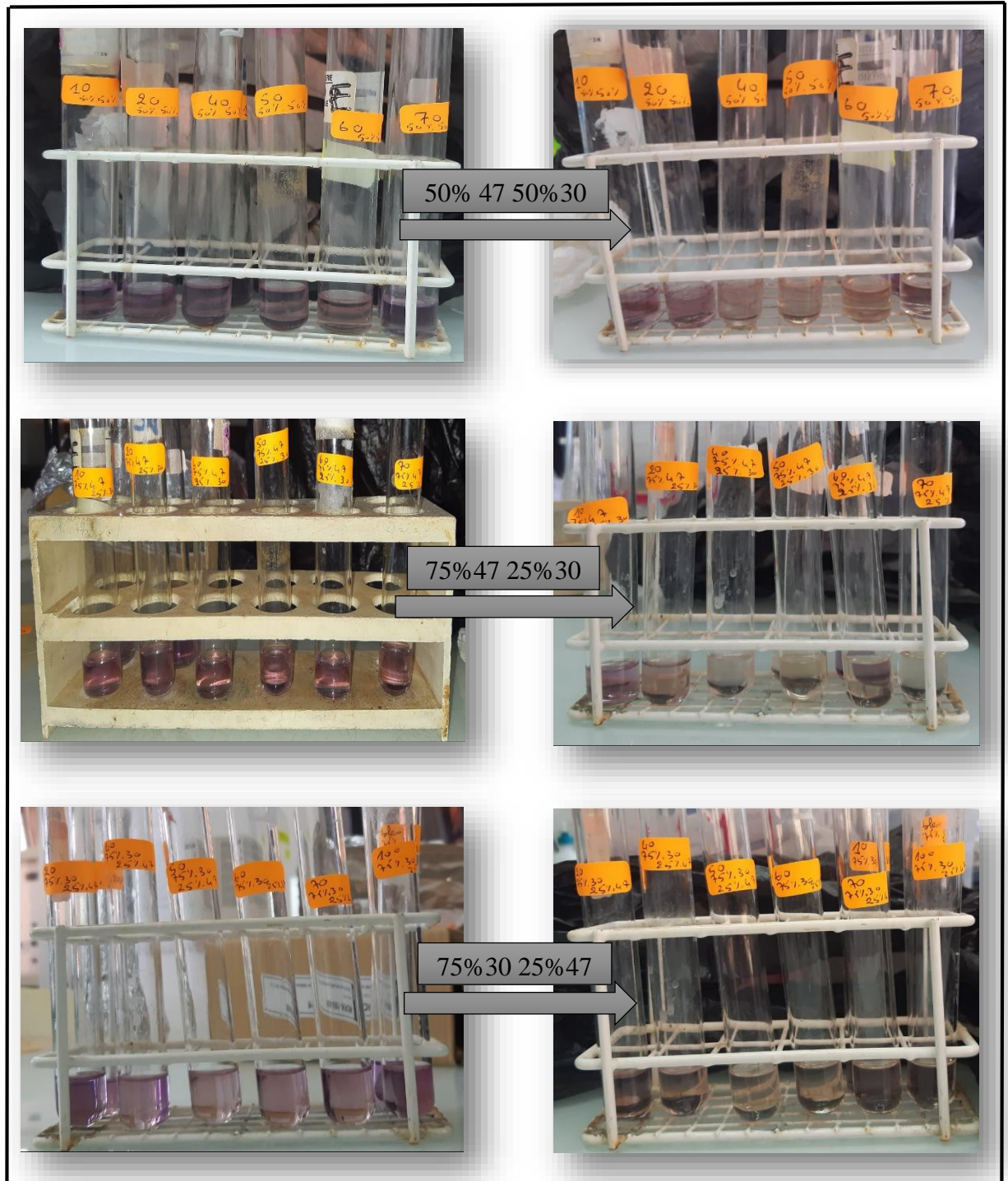


Figure 26 : Les résultats de l'effet synergique obtenus de l'activité antioxydante par la méthode de *DPPH*.

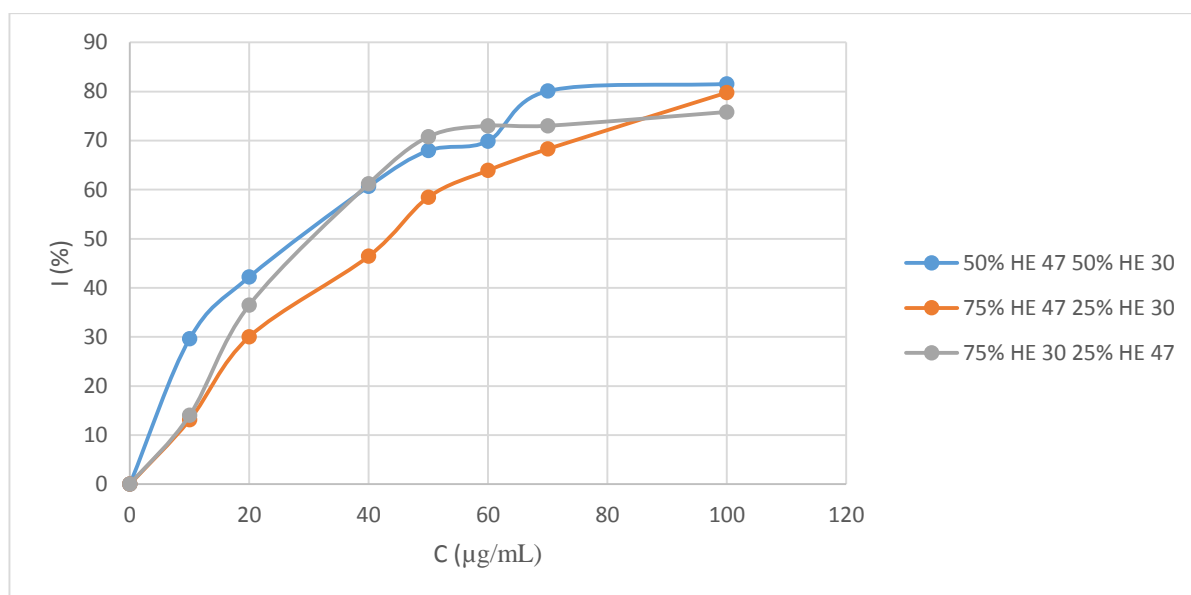


Figure 27 : Activité antiradicalaire des trois compositions d'huile essentielle de *mentha pulegium*.

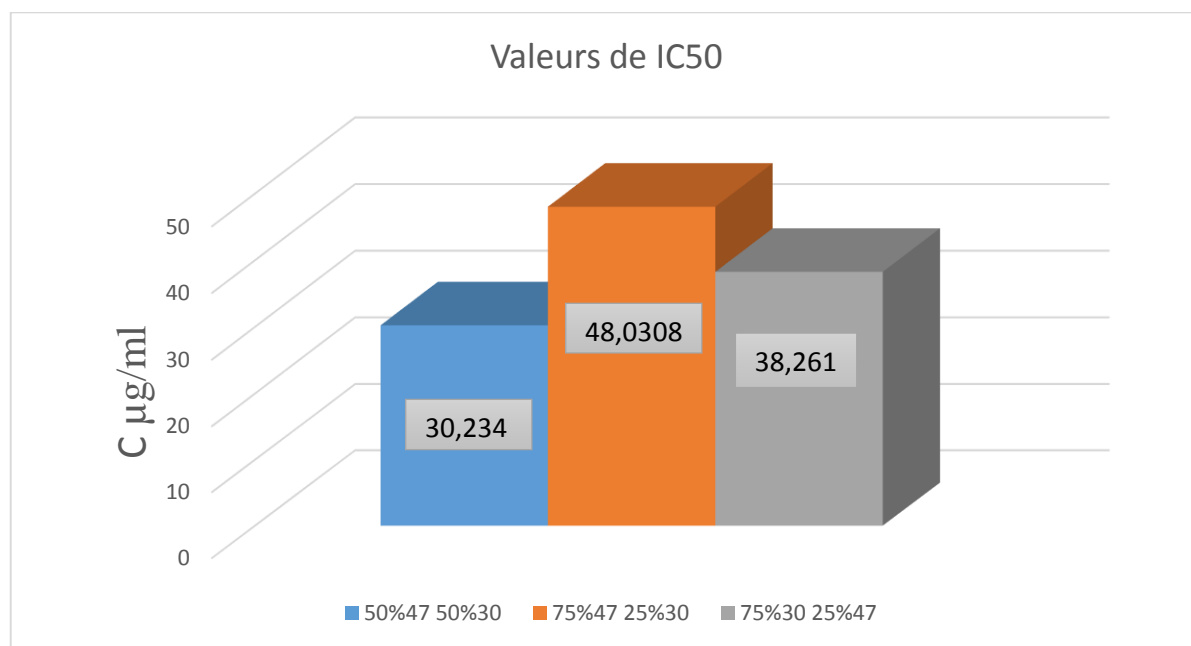


Figure 28 : Les valeurs de **IC 50** des trois compositions d'huile essentielle *mentha pulegium*.

D'après les résultats obtenus, nous concluons que la composition 75% HE 47 avec 25% HE 30 a un IC50 supérieur, suivi de 75% HE 30 avec 25% HE 47 puis 50% de chaque huile. Donc la meilleure composition est de (50% 50%).

Conclusion

L'Algérie possède de nombreux types de plantes à capacité thérapeutique, de sorte que l'exploitation du potentiel biologique de ces plantes est d'une grande importance.

Dans notre travail, la plante a été sélectionnée est *Mentha pulegium* dans la famille de *Lamiaceae*, qui a été collectée dans deux régions différentes Ouargla et Ghardaïa, en janvier 2021.

Notre but était une étude biologique des huiles essentielles extraites de la partie aérienne de *Mentha pulegium* et une comparaison entre les résultats des deux régions, où différentes analyses de cette plante ont été appliquées :

- Extraction des huiles essentielles de *Mentha pulegium*, calculer leur rendement et les analyser par GC / MS.
- Son activité antibactérienne est déterminée sur quatre souches différentes qui sont: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.
- Évaluation de son activité antioxydante par la méthode DPPH.

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation nous a donné un rendement de 1,77% et 1,79% pour *M.pulegium* 47 et *M.pulegium* 30, respectivement.

Les analyses chimiques des huiles essentielles de *M.pulegium* par GC/SM prouvent pour avoir le composé majoritaire dans HE 47 est iso pulégone à 39,47% et dans HE 30 est I-menthone à 24,11%.

Les résultats d'activité antibactérienne ont montré que l'huile essentielle de *M.pulegium* 30 et l'huile essentielle de *M.pulegium* 47 étaient efficaces sur toutes les souches de bactéries Gram-positives et Gram-négatives étudiées mais étaient plus efficaces sur *Listeria monocytogenes*.

En ce qui concerne les résultats de l'activité antioxydante, nous avons constaté que l'huile essentielle 30 ($IC_{50} = 17,17\mu g/mL$) avait une activité antioxydante plus élevée que l'huile essentielle 47 ($IC_{50} = 35,12\mu g/mL$).

Enfin, nous avons mélangé ces deux huiles entre elles dans trois formulations différentes (50% 50%), (75% 25%), (25% 75%) pour étudier l'effet synergique et les avons restaurées à

l'activité biologique (antibactérienne et antioxydante). Les résultats ont prouvé que la première composition avait une activité pour toutes les souches, tandis que le deuxième et la troisième composition avaient une activité sur trois souches *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, quant au *Pseudomonas aeruginosa*, il y était résistant. Quant à l'activité antioxydante, les résultats ont été à une activité antioxydante à de faibles concentrations sur les trois composés.

Ainsi, à partir de cette étude, nous concluons que la plante *Mentha pulegium* contient des fors activités antioxydantes et antibactériens. Ces propriétés biologiques peuvent être exploitées dans les préparations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Cependant, des recherches et des tests supplémentaires sont nécessaires, tels que:

- Étude des huiles essentielles de la *M. pulegium* d'autres régions d'Algérie.
- Etude des autres activités biologiques de cette plante, à savoir les propriétés antifongiques, antiinflammatoires, antivirales.
- Etude la toxicité de cette huile.

Références

Bibliographie :

- [1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- [2] Lahlou, M. (2004). *Flavour and Fragrance. Journal*, 19, 159–165.
- [3] Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- [4] Hajlaoui, H., Trabelsi, N., Noumi, E., Snoussi, M., Fallah, H., Ksouri, R., & Bakhrouf, A. (2009). Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(12), 2227-2238.
- [5] Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., & Viano, J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 7115-7121.
- [6] Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12), 4364-4370.
- [7] Seigler, DS. (1998). *Plant secondary metabolism*. Kluwer, Boston, p 759.
- [8] Sallé J.L. (2004). *Les Huiles Essentielles Synthèse d’aromathérapie*, 2ième édition revue, complétée et corrigée. Paris.
- [9] Baudoux, D. (2010). *Pour une cosmétique intelligente huiles essentielles et végétales: les huiles essentielles sur la peau, au travers de la peau, au-delà de la peau*. Editions Amyris, Bruxelles.
- [10] Baudoux, D. (2008). *L’aromathérapie: Se soigner par les huiles essentielles*. Amyris. Bruxelles.
- [11] Garneau, F. X. (2002). *Le matériel végétal et les huiles essentielles*. LASEVE-UQAC, Chicoutimi, Québec.
- [12] 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. Université Mohammed V- Agdal. Laboratoire des Substances Naturel
- [13] Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- [14] Guenther, E. (1948). *The essential oils, Vol. 1: History-Origin in plants production-Analysis*. Litton Educational Publishing, INC. 427 p.
- [15] Anna, H. (02/2012). *HUILES ESSENTIELLES POUR TOUS LES JOURS-Artemis*, p 24.
- [16] Bernard, T., Perneau, F., Bravo, P., Delmas, M., et Gaset, A. (Oct 1988) « Informations chimie », n° 298., pp. 179-184.
- [17] Degryse, A.C., Delpla, I., et Voinier M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- [18] Duraffourd, C., D'Hervicourt, L., and Lapraz, J. C. (1990). *Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris*.
- [19] Bellakhdar, J. (1997). *La pharmacopée marocaine traditionnelle*. Idis PRESS (Ed). Paris, p. 764.
- [20] Franchomme, P., Pénéol. (1990). "L'Aromathérapie Exactly" fondements démonstration illustration et applications d'une science médicale naturelle, édition Roger Jollois. ed. Limoges.
- [21] Boelens Aroma Chemical information Service (BACIS) (1999) - ESO 2000, the complete Database of Essential Oils. Leffingwell and Associates publisher, Georgia, USA.
- [22] Carole, Minker. (2013). *200 plantes qui vous veulent du bien*. Franc, p 120-214.
- [23] Finar, I.L. (1994). « *Organic chemistry* ». Ed. Longman Scientific et Technical , Vol. II.
- [24] Paris, M., et Hurabielle, M. (1981). *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome*. Ed, Masson 339 p.
- [25] Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Hellal, A., Boutekdjiret, C., Fernandez, X. (2012). Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles , In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*. Ed. Vuibert, Paris, pp. 212–24.

- [26] Bruneton J. (1993). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 2 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier. Paris, 632-915p.
- [27] Chalchat, J.K., Carry, L. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret ,R. and Chopineau, J. (1997). Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.
- [28] Hernandez Ochoa, L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- [29] Neffati, A. (2010). Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*.
- [30] Fekih, N.(2015). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie [thèse].Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid.
- [31] Elhaib, A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique [thèse] Toulouse : Université de Toulouse.
- [32] Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotiprux, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, Vol. 54; pp 44-50.
- [33] Lagunez Rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, institutnational polytechnique de Toulouse. 15-35.
- [34] Belaiche, P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd.Maloine. Paris.
- [35] Duraffourd, C., D'Hervicourt, L. and Lapraz, J. C. (1990). Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson,Paris.
- [36] Lorrain E. (2013). 100 questions sur la phytothérapie. Ed. La boétie, Italie.
- [37] Peron, L., Richard H. (1992). Epices et aromates, techniques et documentations Lavoisier.
- [38] Martini,M.C., Seiller,M.(1999). Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales Paris. Lavoisier, 563.

- [39] Chaintreau, A., Joulain, D., Marin, C., Schmidt, C.O. and Vey, M. (2003). GC-MS, Quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reaction. *Journal of Agriculture Food Chemistry* (51): 398-403.
- [40] DOLATOWSKI Z. J., STADNIK J. et STASIAK D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Scientiarum Polonorum*. 63(6) : 89–99.
- [41] VEILLET S., TOMAO V. et CHEMAT F. (2010). Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chemistry*. Volume 123. Issue 3, pp : 563-958.
- [42] France-Ida, J.(1996). Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*; 3: 5-6.
- [43] Abou Zaid, E. N. (1998). *Aromatic and medicinal plants—their agricultural and medicinal products*. El–Dar El–Arabia for Publishing, Cairo.
- [44] Valnet, M. (2005). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth *International Journal of Food Microbiology*.85, 73-81.
- [45] Shahidi, F. (1997). *Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications*, Ed aocs mission statement. 174-197.
- [46] Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *comments on toxicology*. 9 : 5-21.
- [47] Edris, A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* 21, 308-323.
- [48] Hussain, AI., Anwar, F., Chatha, SAS., Jabbar, A., Mahboob, S. and Nigam, PS. (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 1070-1078.
- [49] Burt, S.(2004). *Int. J Food Microbiol*, 94: 223-253.
- [50] Guinoiseau, E. (2010). *Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action*. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.
- [51] FABIAN, D., SABOL,, M., DOMARACKA K. et BUJNAKOVA, D. (2006). Essential oils--their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *20(8):1435-45*.
- [52] Hay, R.J. (2006). Fungal infections. *Clinics in Dermatology* 24, 201–212.

- [53] Lupi, O., Tying, S.K., McGinnis, M.R. (2005). Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 53, 931–951.
- [54] Kaloustian, J, Hadji-Minaglo, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie*. Paris. Edition Springer.
- [55] Jahandiez, E. & Marie, R. (1934). *Catalogues des plantes du Maroc, spermatophytes et ptéridophytes. Tome III*. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- [56] IL IDRISSE, A. (1982). *Etude des huiles essentielles de quelques Espèces Salivia, Lavandula et Mentha du Maroc*. Thèse de troisième cycle, Faculté des Sciences de Rabat.
- [57] Raybaud, E. (1985). *Critique de la systématique des menthes*. Thèse de Doctorat d'état, faculté de pharmacie, Marseille.
- [58] Rana, B.K., Singh, U.P. & Taneja, V. (1997). Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.* 57: 29–34.
- [59] Lahrech, K. (2010). *Extraction et analyses des huiles essentielles de Mentha pulegium L. et de Saccocalyx satureioides. Tests d'activités antibactériennes et antifongiques*. Theses, Université d'Oran Es-Senia, Oran.
- [60] Lemordant, D., Boukef, K., Bensalem, M. (1977). *Plantes utiles et toxiques de Tunisie*, *Fitoterapia*, 48, p : 191-214.
- [61] Bekhechi, C. (2008). *Analyse des huiles essentielles de quelques espèces aromatiques de la région de Tlemcen par CPG, CPG-SM et RMN 13 C et étude de leur pouvoir antibactérien*. Thèse Doctorat. Univ. Tlemcen, 205 p.
- [62] Guignard, J-L. (2001). *Botanique systématique moléculaire*. Masson, Paris, 290.
- [63] Quézel, P., & Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome 1. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.
- [64] Arvy, M.P. & Gallouin, F. (2003). *Epices, aromates et condiments*. Ed. Belin, Paris. 412 p.
- [65] Bencheikh, D. (2012). *Polyphenols and antioxidant properties of extracts from Mentha pulegium L. And Matricariacamomilla L., magister en biochimie., université ferhat abbes setif*. 89 p.
- [66] Dellille, L. (2007). *les plantes médicinales d'algérie*. Berti editions, Alger, 240.

- [67] Sutour, S. (2010). étude de la composition chimique d'huile essentielles et d'extraits de menthe de corse et de kumquats. Thèse de doctorat, spécialité : Chimie Organique et Analytique.
- [68] Guignard, J.L., et Dupont, F. (2004). Botanique : Systématique moléculaire, 13 ème éd. Ed. Masson, Paris. 237 p.
- [69] Mohaddese, M., Ghasem, H. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. ethnopharmacology* 119 (2), 325-327.
- [70] Daniel, L., Daniel, P., Eduardo, D., Philip, D., Roser, V., Salvador, C. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian archives of biology and technology* 45 (4), 519-524.
- [71] Habiba, B., Adel, N.C., Hani, B., Farida, S., Messaoud, R., Hocine, L., Daoud, H. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre* 3 (4), 267-275.
- [72] Ahmed, H El-Ghorab. (2006). The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *J. Essential Oil Bearing Plants* 9 (2), 183-195.
- [73] Stoyanova, A., Georgiev, E., Kula, J., Majda, T. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Bulgaria. *J. Essential Oil Research* 17 (5), 475-476.
- [74] Bárbara, T., António, M., Cristina, R., Irineu, B., Carmo, S., Olívia, M., Nuno, R.N., José, M.F.N., Jorge, A.S., Maria, L.N. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties.
- [75] Abdenour, A-O., Susana, L., Abdelhay, A., Amin, L., Carmen, R., Antonio, H., Rafael, P., Pilar, C. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco Food.
- [76] Iván, M., Bastián, S., Patricio, G., Ximena, B., Carol, P., Katy, D. (2020). Antifungal activity of essential oil and main components from *Mentha pulegium* growing wild on the Chilean central coast. *Alejandro Madrid Agronomy* 10 (2), 254.
- [77] Shama, H., Mohamed, R., Zakaria, H., Badr, S., Mohamed, G., Mustapha, E.A. (2011). Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus Camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de laB.

- [78] AFNOR (Association Française de Normalisation). (1986). Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. AFNOR, Paris, 57p.
- [79] AFNOR. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles ». Vol. Tome 2, paris.
- [80] Deans, S. and G. Ritchie. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International journal of food microbiology*, 52, 165-180.
- [81] Olivier, Tenailon., David, Skurnik., Bertrand, Picard., et Erick ,Denamur. (mars 2010). « The population genetics of commensal *Escherichia coli* », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no 3, p. 207–217.
- [82] C.K. Stover., X.Q. Pham., A.L. Erwin., S.D. Mizoguchi., P. Warrenner., M.J. Hickey., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen, *Nature* 406 ;959–964.
- [83] Merel, M.K., Merijn, W.B., Matthijs, C.B., Diederik, B., Arie, E. (2017). *Listeria monocytogenes* meningitis in the Netherlands, 1985–2014: a nationwide surveillance study, *Journal of Infection* 75 (1), 12-19.
- [84] G. Ralph Corey. (May 2009). *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: Definitions and Treatment, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 48, Issue Supplement_4, Pages S254–S259.
- [85] Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1011-1022p.
- [86] Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research*. 523-524, 9-20.
- [87] Chen, C.-N., et al. (2004). Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12, 175-185.
- [88] Leitão, G.G., S.G. Leitão, and W. Vilegas. (2002). Quick preparative separation of natural naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 5711-12, 1051-1055.
- [89] Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reine, A.S., Santos, T.C., Coube, C.S., and Leitão, S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy-totherapy research*. 15, 127-130.

- [90] Elhoussine, D., Zineb, B., Rachid, T. (2010). GC/MS analysis of volatile compounds of the essential oil of the leaves of *Mentha pulegium* growing in Morocco .Chem Bull POLITEHNICA Univ 55 (69), 103-106.
- [91] Nadia, Z., Smail, A., Ahmed, B., Mohamed, A., Touria, Z. (2013). Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae* Mediterranean Journal of Chemistry 2 (4), 607-619.
- [92] Abdenour, A., Susana, L., Abdelhay, A., Amin, L., Carmen, R., Antonio, H., Rafael, P., Pilar, C. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco.Food.
- [93] Abou, N.,Fareh, K. (2016). Activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Mentha pulegium* L . Mémoire de master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.p 40.
- [94] Mohammad, B.H., Amir, B.A., Mohammad, A.A., Javid, E.P. (2011). New menthone type of *Mentha pulegium* L. volatile oil from Northwest Iran. Czech Journal of Food Sciences 29 (3), 285-290.
- [95] Kada, F., Drider, N.H. (2018). Etude des activités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles de *Salvia officinale*,*Juniperus phoenicea* et *Mentha pulegium*. Mémoire de master en microbiologie appliquée. Université de akli mohand oulhadj-bouira.p.
- [96] Bouhaddouda, N. (2015). Activités antioxydante et antimicrobiennes de deux plantes du sol local: *origanum vulgare* et *Mentha pulegium* thèse doctorat en biochimie. Université badji mokhtar annaba.p 82.
- [97] Lahrech, K. (2010). Extraction et analyse des huiles essentielles de *Menthapulegium* et *Saccocalyxatureiode*, teste ed'activitésantibacteriennes et antifongiques.ORAN: université d'oran Es-Senia.2010. 88p.
- [98] Tahri, B.,Saadou, Z. (2014). Détermination des propriétés organoleptiques et physicochimiques des huiles essentielles: *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Mentha pulegium* (Lamiacees).mémoire de master. Université djilali bounaama khmis miliana. P 60.
- [99] Gacem, D., Cherif, D., Mekhtoui, K. (1995). Evaluation de la qualité de l'huile d'olive à travers la wilaya de tizi-ouzou. thèse de Magistère en biochimie appliquée et biotechnologie de tizi-ouzou.
- [100] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxydant activity. Songklanakar J. Sci. Technol. 26(2): 211-219.

- [101] Liang, N. and D.D. Kitts. (2014). Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19(11): p. 19180-19208.
- [102] Meriem, A., Houria, M., Assia, A., Rachida, M. (2016). Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities, *Industrial Crops and Products* 94, 197-205.
- [103] Kamkar, A., Javan, A.J., Asadi, F. & Kamalinejad M. (2010). The antioxidative effect of.