



**MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE « Abbes Laghrou » DE KKHENCHLA
FACULTE SCIENCE ET TECHNOLOGIE**



Département des sciences de la matière

N° de série :

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de master (L.M.D)

Filières : chimie

Spécialité : chimie analytique et environnement

Intitulé :

*Extraction et activités antibactérien de
l'huile essentielle de menthe*

Réalisé par : - DIF Djamai

- MENCHAR Youcef

Membres de jury :

-B.Houda	MAA Univ-khenchla	Président
-T.Radhwane	MCA Univ-khenchla	Encadreur
-B.Zakaria	MAA Univ-khenchla	Examineur

-Présenté le 27/06/2022

Remerciement :

ALLAH le tout puissant de nos avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Car l'homme propose mais ALLAH dispose Seigneur veuillez toujours dirige nos pas.

Nous tenons à adresser nos très sincères remerciements à notre encadreur et directeur de mémoire Dr Takouacht Radhwane qui nous a guider dans notre travail. Merci pour nous avoir accordé votre temps, Merci pour d'avoir mis votre expérience à notre profit, Merci pour votre disponibilité et vos conseils judicieux.

Nous tenons à présenter notre sincère et vif remerciement à les membres du jury, docteur badis zakaria et docteur houda boussekin, qui ont accepté de juger notre travail.

On tient à remercier les responsables des laboratoires de l'université abbas laghrour kenchla.

Enfin, nos remerciements s'adressent à tous ceux et celles qui nous ont guidé à bien réaliser cette modeste recherche.

Dédicaces

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à mes chers parents, qui m'avez dirigé et suivi pondant toute mes années d'étude et surtout ma mère pour ses sacrifices de tous les instants, sa patience sans limite et l'éducation qu'elle m'a donnée, je lui dit merci mille fois.

A ma famille.

A ma grand-mère : Aldjia

A mon neveu : Ayoub- Nadim

A mes frères : Zaki, Sifou, Hako

A mes sœurs.

A mes chères amies : Daoud , Midou ,Issam , Amer , Amine ,Mossab ,Jaber,Koko,Adile,Kimo , Kraouch ,Yacine ,Rochdi , Sifo, Hamza, Sofiane, Kamal , Youba , Khaled , Nounou ,Mourad, Athmane .

A mes camarades de promotions.

A la famille de l'alliance pour le renouvellement étudiant national .

Djamai

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mon cursus scolaire et universitaire, ainsi qu'à ma femme et ma fille : rana razan

A mes frères: dr karim,fatah

A mes sœurs

A la femme de mon frère.

A mes amis : Oussama Rezaimia, Khaled, Naim Sadam ,Soufiane ,Issam ,Jalal Bourabha ,Aziz, Massi.

youcef

Sommaire

Chapitre 01 :

Introduction générale.....	1
Généralité sur le menthe.....	3
1. Introduction :	3
2. Origine :	3
3. Dans le Monde :	3
a) Menthe crépue (spearmint) :	3
b) Menthe poivrée :	3
c) Menthe du Brésil	4
d) Menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i>)	4
e) Menthe verte (<i>Mentha viridis</i>)	4
4. En Algérie :	4
5. Caractéristique de la plante :	4
a) Classification botanique de la plante:	4
b) Description :	5
c) Les nutriments les plus importants :	5
d) Aspect morphologique de la plante :	6
6. Les variétés :	7
a) Menthe poivrée (<i>Mentha X piperita</i>) :	8
b) Menthe verte (<i>Mentha spicata</i>) :	8
c) Menthe aquatique (<i>Mentha aquatica</i>) :	9
d) Menthe pouliot (<i>Menthapulegium</i>) : « fliou »	9
e) Menthe des champs (<i>Mentha arvensis</i>) :	9
f) Menthe odorante (<i>Mentha suaveolens</i>) :	10

g) Menthe verticillée (<i>Mentha verticillata</i> L.)	10
h) Menthe velue (<i>Menthavillosa</i> Huds). (Pro sp.)	10
7. Cycle de végétation de la menthe :	11
a) Multiplication végétative :	11
b) Phase reproductrice :	11
8. Exigences écologiques de la menthe	12
a) Photopériode :	12
b) Température :	12
c) Sol :	12
d) Altitude :	12
9. Propriétés de la menthe :	13
10. Utilisation :	13
a) En Cosmétique	13
b) En médecine :	14
c) En cuisine :	14

Généralités sur les huiles essentielles..... 17

1. Définition	17
2. Origine des huiles essentielles	17
3. Composition chimique	19
• Les terpénoïdes	19
• Les monoterpènes	20
• Les sesquiterpènes	21
4. Facteurs influençant la composition chimique (qualité)	22
5. Propriétés physiques	22
6. Activité antibactérienne des huiles essentielles	22
7. Mode d'action des huiles essentielles	23
8. Procédés d'obtention des huiles essentielles:	24
La distillation:	24
Extraction par micro-ondes:	25
Extraction par solvants volatils:	26
Expression à froid:	27
Extraction par CO ₂ super critique:	28

9.	Conservation des huiles essentielles :	29
10.	Critère de qualité	29
11.	Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles :	30
a)	Chromatographie en phase gazeuse : [48, 49]	31
b)	Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O) :	31
c)	Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)	31
12.	Domaines d'utilisation des huiles essentielles	32
a)	Dans les industries agro-alimentation :	32
b)	La médecine et l'industrie pharmaceutique	32
c)	L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique	33
d)	Dans diverses industries:	34
Matériels et méthodes.....		37
1.	Objectifs	37
2.	matériel végétal :	37
a)	Menthe verte (<i>Mentha spicata</i>)	37
b)	Classification botanique:	37
c)	Principaux constituants actifs de son huile essentielle :[59]	38
d)	Ses propriétés thérapeutiques : [59]	38
3.	Matériel du laboratoire	39
4.	Méthode d'extraction des huiles essentielles	39
a)	L'hydrodistillation	40
b)	Extraction liquide-liquide (décantation)	41
c)	Évaporation rotative	42
1.	Calcul du rendement :	43
Résultats et Discussion.....		45
1.	Propriétés organoleptiques de l'HE	45
2.	Évaluation du rendement de l'extraction	45
Conclusion :.....		47

Liste des figures :

- Figure N°1 : la floraison de menthe..... 5
- Figure N°2 : la morphologie de la menthe poivrée.....7
- Figure N° 03: variété la Menthe poivrée 8
- Figure N ° 04: variété la menthe verte..... 8
- Figure N ° 05: variété la menthe aquatique..... 9
- Figure N ° 06: variété la menthe des pouliot 9
- Figure N ° 07: variété la menthe des champs10
- Figure N ° 08: variété la menthe odorante10
- Figure N°09 : produits cosmétologiques.....13
- Figure N°10 : Médicaments 14
- Figure N°11 : le thé 15
- Figure N°12 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles18
- Figure N°13 : Biosynthèse des terpènes.....20
- Figure N°14 : Structures de monoterpènes, incluant des composés insecticides (α - et β -pinene pyrethrin), des pollinisateurs (linalool et 1,8-cineole), et des agents anti-herbivores (1,8- cineole)..... 20
- FigureN°15:Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle...24
- Figure N°16: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante... 25
- Figure N°17 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes 26
- Figure N° 18: L'extraction par solvants volatils 27
- Figure N° 19 : Extraction par CO₂ super critique..... 29
- Figure N° 20: des médicaments à base d'HE 33
- Figure N° 21: utilisation d'HE dans la cosmétique 33
- Figure N° 22 : Mentha spicata (Menthe verte37
- Figure N°23 : Mesure de la masse de menthe à l'aide d'une balance électronique .38
- Figure N° 24 : montage d'hydrodistillation.....41
- Figure N°25 : montage de séparation liquide-liquide (décantation)42
- Figure N° 26 : montage de l'évaporateur rotatif...43
- Figure N°27 : mesure le poids de l'huile essentielle 45

Liste des abréviations :

**AFNOR: association française
de normalisation**

C : degrés de Celsius

COV : composé organique volatile

CONV : composé organique non volatile

Cm : centimètres

CPG :chromatographie en phase Gazeuse

CCM :chromatographie sur couche mince

EX. aq : Extrait aqueux

**FAO : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations
unies pour'alimentationet l'agriculture)**

GN : gélose n

G : grammes

HE : huiles essentielles

IR : indice de réfraction

Mg :milligramme

R :répétition

SM :souche mère

u.m.a : unité de masse atomique

Liste des tableau :

Tableau01 : Santé Canada. Fichier canadien sur les éléments nutritifs, 2005 6

Tableau 02: classification de la menthe poivrée39

Tableau 03 Rendements en huiles essentielles chez certaines plantes ... 41

Introduction générale

Introduction générale :

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner, et parfois les utilise dans des rites religieux. Elles sont exploitées dans diverses industries telles que : la parfumerie, l'agro-alimentaire, les cosmétiques et la pharmaceutique. La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles en quantités variables, ce qui confère à la plante un pouvoir odorant et aromatique.

La science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'application sont très variés et qui sont très utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs et dans les cosmétiques, les parfumeries, les industries de savon et de détergents en volume impressionnant. Elles rentrent également dans la composition de plusieurs médicaments, sous forme de crèmes, gélules et suppositoires [57].

Les huiles essentielles, se trouvent dans diverses parties de la plante : bois, feuilles, fruits, graines et racines. De nos jours, les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes, et médecins en raison de leurs utilisations dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins actifs ou dans la préservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimiques de synthèse.

De manière générale, l'extraction des huiles essentielles préalable à l'analyse chimique se compose de deux étapes : l'extraction et l'analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures [58].

Notre objectif dans ce travail est de faire l'extraction des huiles essentielles d'une plante aromatique.

Le présent travail est scindé en deux parties. La première partie est théorique, portant deux chapitres. Premier qui illustre la plante de menthe . Deuxième, les huiles essentielles et les techniques d'extraction.

Seconde partie est expérimentale, portant sur deux chapitres. Dans le premier, On y décrira les protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction des huiles essentielles de menthe. Le deuxième a été réservé aux résultats obtenus, suivie par une conclusion.

Chapitre 01 : généralité sur le menthe

Chapitre : 01

Généralité sur le menthe

1. Introduction :

La menthe appartient à la famille des Lamiacées comme de nombreuses autres plantes aromatiques telles que le thym, le basilic ou encore la lavande. Elle comprend environ 3000 espèces, Les menthes forment un genre (*Mentha*) et ce genre comprend environ 70 espèces dont certaines sont très connues telle que la menthe pouliot qui éloigne les fourmis. [1]

2. Origine :

La menthe est une plante vivace appartenant à la famille des labiées. La menthe est présente dans plusieurs régions qui sont considérées comme ses pays d'origine. Ainsi, la liste comprend l'Afrique du Nord, l'Asie et l'Europe mais elle s'est répandue à travers le monde entier. [1]

3. Dans le Monde :

La production mondiale de menthe est modeste, comparativement aux spéculations agricoles alimentaires, mais sa valorisation en termes d'exploitation des huiles essentielles extraites est l'une des plus importantes parmi les produits agricoles. Plusieurs industries sont dépendantes des produits extraits à partir de la menthe.

Devant l'importance du marché et la plus-value du produit récolté, nombreux sont les pays qui se sont orientés vers la production et la valorisation de la menthe. Une certaine spécialisation de ces pays est observée et concerne un nombre limité d'espèces cultivées.

La spécialisation de certains pays dans la production de la menthe peut être résumée comme suit :

- a) **Menthe crépue (spearmint)** : les U.S.A sont parmi les plus importants producteurs des huiles essentielles de la menthe (10000 à 12000 ha) et assurent plus de 90% de la production mondiale (2000 T environ) [2] Le reste de la production est récolté en Chine, au Japon et en Russie.
- b) **Menthe poivrée** : (*Mentha piperita*) ou (peppermint) : c'est une plante septentrionale qui se développe bien dans des zones situées au nord du 40° parallèle. Les U.S.A

dominent la production mondiale l'Europe de l'Est fournit certains tonnages à côté d'autres pays producteurs tels que l'Italie, la France et l'Afrique du sud.

- c) **Menthe du Brésil** : (*Mentha arvensis*) : elle est cultivable sous des climats tropicaux et subtropicaux. Au Brésil les conditions idéales pour la culture de la menthe assurent une rentabilité d'exploitation exceptionnelle, elle en occupe plus de 30 000 hectares dont 90% dans la région de Panama [3]. Le Paraguay produit également cette menthe. Elle fait l'objet d'exploitations relativement importantes en Chine, Taiwan, et en Corée.
- d) **Menthe pouliot (Mentha pulegium)** : c'est une plante méridionale et même méditerranéenne, elle est produite en Espagne, mais la production marocaine était jadis importante et provenait essentiellement de la cueillette dans les bords de champ.
- e) **Menthe verte (Mentha viridis)** : le Maroc est considéré comme étant un important producteur, au point qu'en France, le label « menthe verte » est souvent associé au Maroc.

4. En Algérie :

La menthe cultivée est une plante très consommée en Algérie. Son usage quasi-quotidien dans l'aromatisation du thé est associé aux us et coutumes des Algériennes et symbolise même la culture du pays et la générosité de son peuple. Sa culture est traditionnellement pratiquée dans les ceintures vertes entourant les grandes villes du pays. Elle est installée sur de petites superficies qui pour la plupart, ne dépassent pas 315 ha [4].

5. Caractéristique de la plante :

a) Classification botanique de la plante:

Règne : *Planta*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Super-division : *Spermatophyta*

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Steridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Mentha L.*

Espèce : *Mentha spicata L.*



Figure N°1 : la floraison de menthe [5]

b) Description :

La menthe est une plante herbacée rustique. Les principales caractéristiques des espèces de menthe impliquent une tige quadrangulaire et très ramifiées, les feuilles simples et opposées. Les fleurs rosées violacée ou blanches de petite taille sont disposées en épis ou en capitules terminaux ou en verticilles axillaires.

Les fleurs qui poussent en grappes à l'aisselle des feuilles sont de couleur rose [6]

c) Les nutriments les plus importants :

La menthe est une source des éléments nutritifs qui jouent des rôles essentiels dans l'organisme va au-delà de ses propriétés antioxydants elle contribue aussi à la santé des os, des cartilages, des dents et des gencives. De plus elle est utilisable contre les infections...

Le tableau suivant montre clairement cette appréciation :

Poids/volume	Menthe poivrée fraîche, 15 ml / 2 g	Menthe poivrée fraîche, 15 ml / 2g	Menthe poivrée fraîche, 15 ml / 2 g
Calories	5,0 g	3,0 g	5,0 g
Protéines	0,1 g	0,2 g	0,3 g
Glucides	0,2 g	0,5 g	0,8 g
Lipides	0,0 g	0,0 g	0,1 g
Fibres alimentaires	0,1 g	0,4 g	0,5 g

Tableau01 : Santé Canada. Fichier canadien sur les éléments nutritifs, 2005.

d) Aspect morphologique de la plante :

a) Tiges :

Tiges feuillées et fleuries de forme dressées ramifiées quadrangulaires ascendantes pouvant atteindre 1,20m de haut [7] .

b) Les feuilles :

Feuilles persistantes, opposées, courtement pétiolées, elliptiques ou presque ovales, de 3 cm de long, poilues, au limbe soit entier, soit découpé en 6 dents, couleur verte souvent ridées par fois du ventuelles desquelles se dégage une forte odeur [8].

c) Les fleurs :

Les fleurs sont réunies en inflorescences compactes et d'aspect globuleux de couleur blanc bleuté, mauves, roses, au calice veiné à 5 dents aiguës, Corolle tubuleuse à 4 lobes ovales étalés en général poilus extérieurement, 4 étamines à anthères pourprées saillantes comme le style [9].

d) Le fruit :

Le fruit est un tétrakène (4 akènes) chaque akène renfermant une graine d'environ

0,5mm de long et d'un brun brillant [[8].

e) La floraison :

Floraison en épis court, cylindrique a lieu de juin/ juillet à septembre [8].

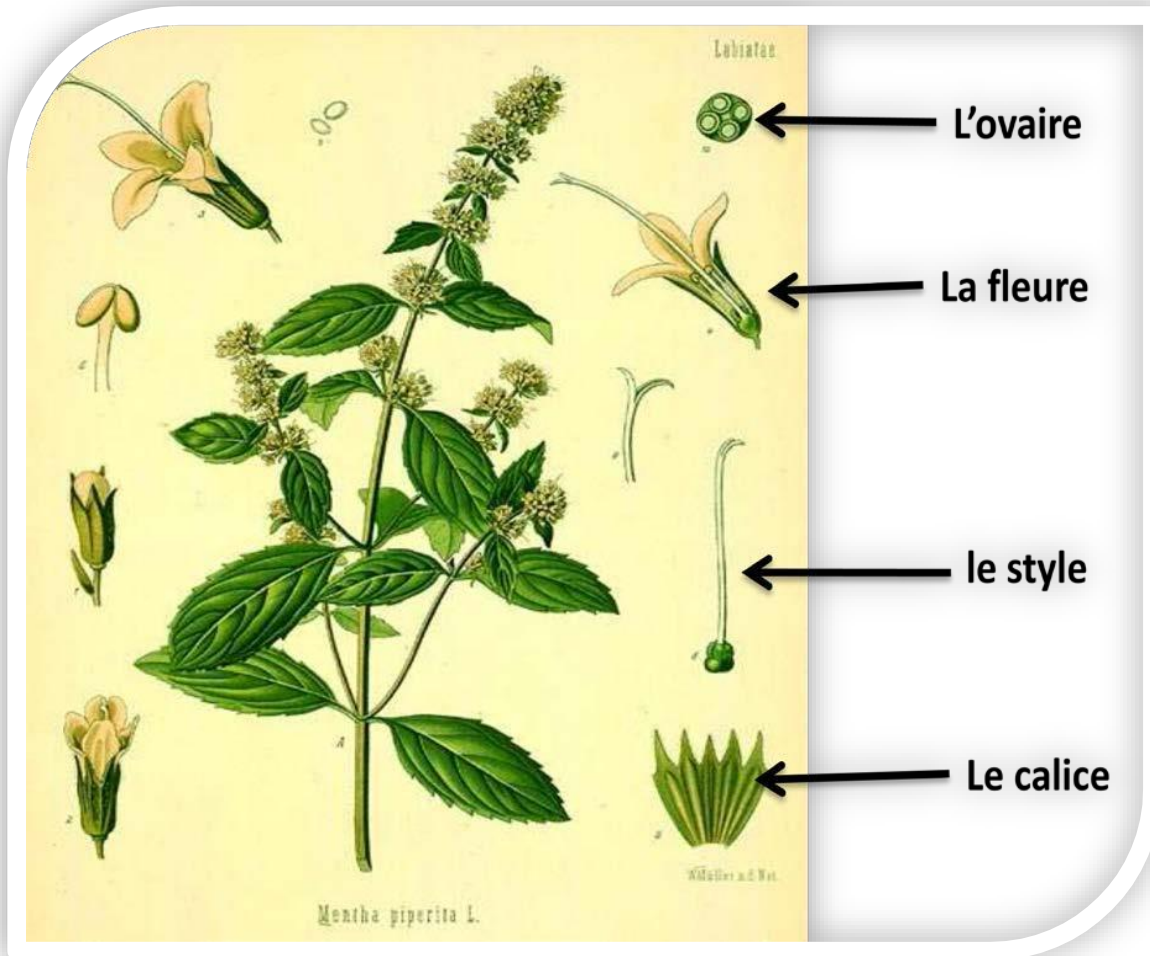


Figure N°2 : la morphologie de la menthe poivrée [5]

6. Les variétés :

Existe environ 70 espèces, dont les plus connues :

a) Menthe poivrée (*Mentha X piperita*) :

La menthe poivrée est une plante hybride issue du croisement de la **menthe aquatique** (*mentha aquatica*) et la **menthe verte** (*mentha spicata*).



Figure° 03: variété la Menthe poivrée [5]

b) Menthe verte (*Mentha spicata*) :

La Menthe Verte est la variété de menthe typiquement utilisée dans le thé à la menthe oriental.



Figure° 04: variété la menthe verte [5]

c) **Menthe aquatique (*Mentha aquatica*) :**

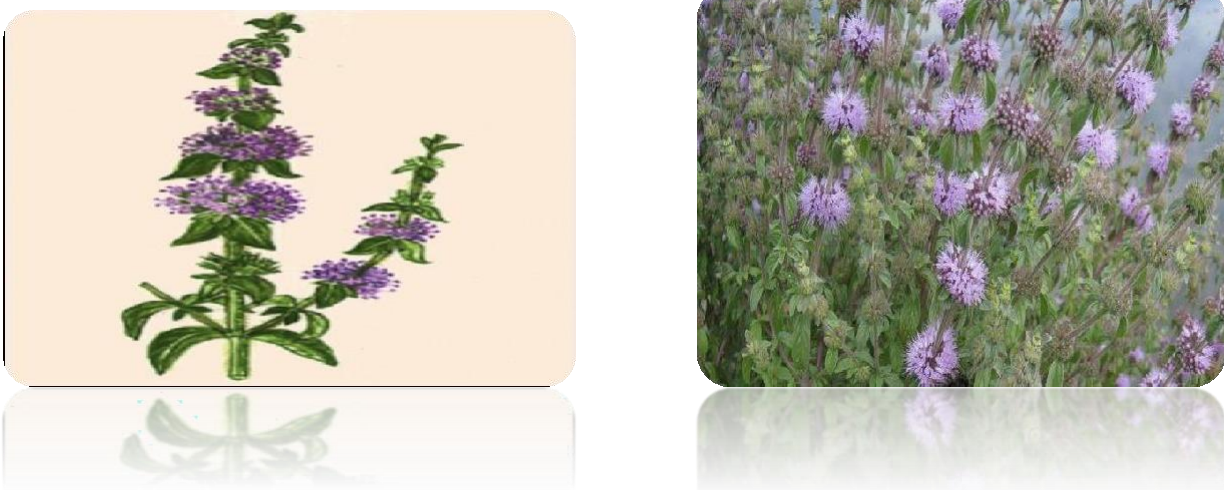
C'est une plante de berge, originaire d'Europe, d'Afrique du Nord, du Proche-Orient et du Caucase, elle a une odeur de menthol.



Figure° 05: variété la menthe aquatique [5]

d) **Menthe pouliot (*Menthapulegium*) : « fliou »**

C'est une menthe à l'odeur citronnée que les anciens utilisaient surtout pour provoquer des avortements, très utilisée en Espagne et En Italie



Figure° 06: variété la menthe des pouliot [5]

e) **Menthe des champs (*Mentha arvensis*) :**

La menthe des champs pousse dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère Nord, originaire d'Amérique du Nord et d'Asie orientale.



Figure° 07: variété la menthe des champs[5]

f) Menthe odorante (*Mentha suaveolens*) :



Figure° 08: variété la menthe odorante[5]

g) Menthe verticillée (*Mentha verticillata* L.)

h) Menthe velue (*Menthavillosa*Huds). (Pro sp.)

7. Cycle de végétation de la menthe :

a) Multiplication végétative :

La multiplication végétative est une voie de propagation incontournable lorsque l'on est en présence d'une plante stérile, cas de la menthe le cycle commence par la germination, les feuilles trifoliées apparaissent ensuite une nouvelle tige se développe et le premier nœud commencent à se former.

La multiplication végétative reste cependant la meilleure alternative pour la culture de la menthe. Pour ce faire, on se procurera une racine de la plante que l'on la sectionnera avant de la replanter.

b) Phase reproductrice :

La menthe est une plante facile à reproduire :

b).1.La reproduction de la menthe à partir des graines:

Il est possible de reproduire la menthe directement à l'aide de graines. Cependant, la multiplication de la menthe par semence n'est pas la façon la plus facile de reproduire cette plante. Les grainetiers ne peuvent pas garantir l'uniformité des plantes de menthe obtenues à partir de semence. Certaines plantes seront beaucoup plus parfumées et contiendront plus de flavonoïdes que d'autres. La reproduction de cette plante à l'aide de graines est la façon la plus longue d'obtenir de la menthe.

b).2.La reproduction de la menthe à partir des boutures:

La reproduction de la menthe par bouturage permet de conserver les propriétés odorantes et gustatives identiques à celle de la plante d'origine. Le temps d'enracinement d'une bouture est assez court et très facile à réaliser.

b).3.La reproduction de la menthe à partir des stolons:

Les stolons sont des tiges latérales souterraines qui permettent à la plante de se propager dans son milieu. Il est possible de reproduire la menthe à partir d'un stolon. La plante obtenue aura les mêmes propriétés gustatives et odorantes que celle de la

plante-mère.

8. Exigences écologiques de la menthe

a) Photopériode :

La menthe douce n'a pas d'exigence stricte en matière de photopériode. Par contre, la menthe poivrée (*Mentha piperita*) exige une longueur de jour de l'ordre de 16 heures pour fleurir. La croissance végétative de la menthe est fortement diminuée en période froide (photopériode inférieure à 10 heures températures inférieures à 10°C et à 25°C, respectivement pour le minimum et pour la maximum).[10]

b) Température :

La sensibilité de la menthe à la température est accentuée par le caractère vivace de la plante. Le seuil de 10 °C est souvent cité en tant que zéro de végétation. La menthe poivrée est une plante pérenne à feuillage caduc, il est possible qu'elle ait un léger besoin en froid.

En hiver il semble que les stolons soient très résistants au froid mais si le sol gèle profondément et longtemps il peut y avoir une destruction mécanique des racines [2]. Des observations sur le terrain ont montré que des températures maximales de l'ordre de 30°C donnent une croissance optimale, pour autant que la fertilisation azotée et l'irrigation soient suffisantes. L'odeur et la flaveur sont plus prononcées en présence de températures élevées.

c) Sol :

Menthe poivrée et menthe douce sont indifférentes au pH du sol. La menthe pouliot est acidophile. A la limite, la menthe aquatique (*Mentha aquatica*) peut vivre dans l'eau. Le système racinaire de la menthe est peu profond. Il exige donc un sol peu compact, perméable et légèrement argileux. Le sol sablonneux n'est pas conseillé pour la culture de la menthe. Celle-ci nécessite un sol à forte teneur en matière organique. Elle est par ailleurs peu sensible à la salinité du sol (5,5 à 8).

d) Altitude :

La menthe peut être cultivée en climat montagnard tempéré humide jusqu'à 900-1000m d'altitude et en climat montagnard méditerranéen à condition d'arroser pendant la

sécheresse d'été [2]

9. Propriétés de la menthe :

La menthe poivrée a un effet antispasmodique sur le système digestif car elle stimule la sécrétion des sucsgigestifs et de la bile, elle décontracte les muscles intestinaux, elle possède également des vertus antiseptiques.

Cette plante est efficace en infusion pour traiter les troubles de la digestion comme les nausées et les ballonnements.

L'huile essentielle de menthe poivrée est connue depuis longtemps pour ses propriétés toniques et stimulantes générales, anti-inflammatoires pour l'intestin et le système urinaire et surtout antalgiques et anesthésiantes par l'effet réfrigérant du menthol : de ce fait, elle permet de calmer certaines douleurs, comme les maux de tête par exemple. Enfin, elle est fortement antibactérienne. Cependant, elle est également irritante et ne doit pas être utilisée pour les bébés et par les femmes enceintes.

10. Utilisation :

a) En Cosmétique

On trouve de la menthe dans de nombreux produits cosmétiques, des crèmes, des shampoings, des lotions, du dentifrice et pour parfumer les savons.



Figure N°09 : produits cosmétologiques

b) En médecine :

la menthe est connue et utilisée depuis très longtemps comme plante médicinale.

Elle est efficace contre les affections similaires aux bronchites (Problèmes respiratoires), troubles digestifs (efficace en cas de constipation ou de diarrhée), troubles urinaires, toux et rhume, soulage les douleurs liées aux piqûres d'insectes et d'animaux, contre les maux de tête.

Utilisation des feuilles et des sommités fleurie qu'en prépare en infusion (prendre de tasse par jour) a montré ses bons effets dans les vomissements, les crampes d'estomac, les maux de tête, la toux [11]



Figure N°10 : Médicaments

c) En cuisine :

La menthe est une plante indispensable dans la cuisine et utilisée pour aromatiser les glaces des sorbets et des confiseries : bonbons, chocolats, fondants, chewing-gums.

La menthe verte est connue en Afrique du Nord sous le nom de « Nanah » il s'agit de la menthe de référence pour faire du vrai thé à la menthe maison.

La menthe verte est employée très couramment comme herbe aromatique par exemple dans le thé à la menthe ou le taboulé et asiatiques et les salades. Elle contient une forte quantité de menthol à l'origine de la sensation de fraîcheur ou de froid (car stimulant les mêmes récepteurs que ceux qui dans la bouche sont sensibles au froid). Elle est utilisée dans plusieurs recettes en cuisine à cause de leur richesse des éléments nutritifs. En Algérie on l'apprécie beaucoup, si bien qu'on s'en sert

pour préparer un plat traditionnel : le ragout de pomme de terre au pouliot « batata fliou » [9]



Figure N°11 : le thé (l'utilisation de menthe dans la cuisine)

chapitre 02

généralité sur les huiles essentielle

Chapitre : 02

Généralités sur les huiles essentielles

1. Définition

Le terme huiles essentielles (HEs) dérive de « quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante [12].

Une huile essentielle est définie comme le produit obtenu d'une plante ou certaines parties de celui-ci par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage (par exemple pour les agrumes) [13]. Ce sont des liquides huileux aromatiques, volatils, caractérisés par une forte odeur, souvent colorés, et généralement avec une densité inférieure à celle de l'eau. Ils peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires.[14 ,16] .

Les huiles essentielles ne représentent qu'une petite fraction de la composition de la plante néanmoins, elles confèrent les caractéristiques par lequel les plantes aromatiques sont utilisées dans l'alimentation, le domaine de la cosmétologie et les industries pharmaceutiques [15]

2. Origine des huiles essentielles

Toutes les parties des plantes aromatiques et compris leurs organes végétaux peuvent contenir de l'huile essentielle.

- les fleurs: oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang);
- les feuilles: eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin ;
- les organes souterrains: racines (vétiver, angélique), rhizomes (gingembre, acore) ;

- les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus ;
- les graines : noix de muscade;
- le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, cellules à poils sécréteurs -la menthe- et canaux sécréteurs) et ont vraisemblablement un rôle défensif : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores.

La concentration dans les plantes est en général faible, aux alentours de 1 à 2% voire moins, mais il y a des exceptions comme le clou de girofle avec 15% d'huile essentielle ou la noix de muscade, 5-15%

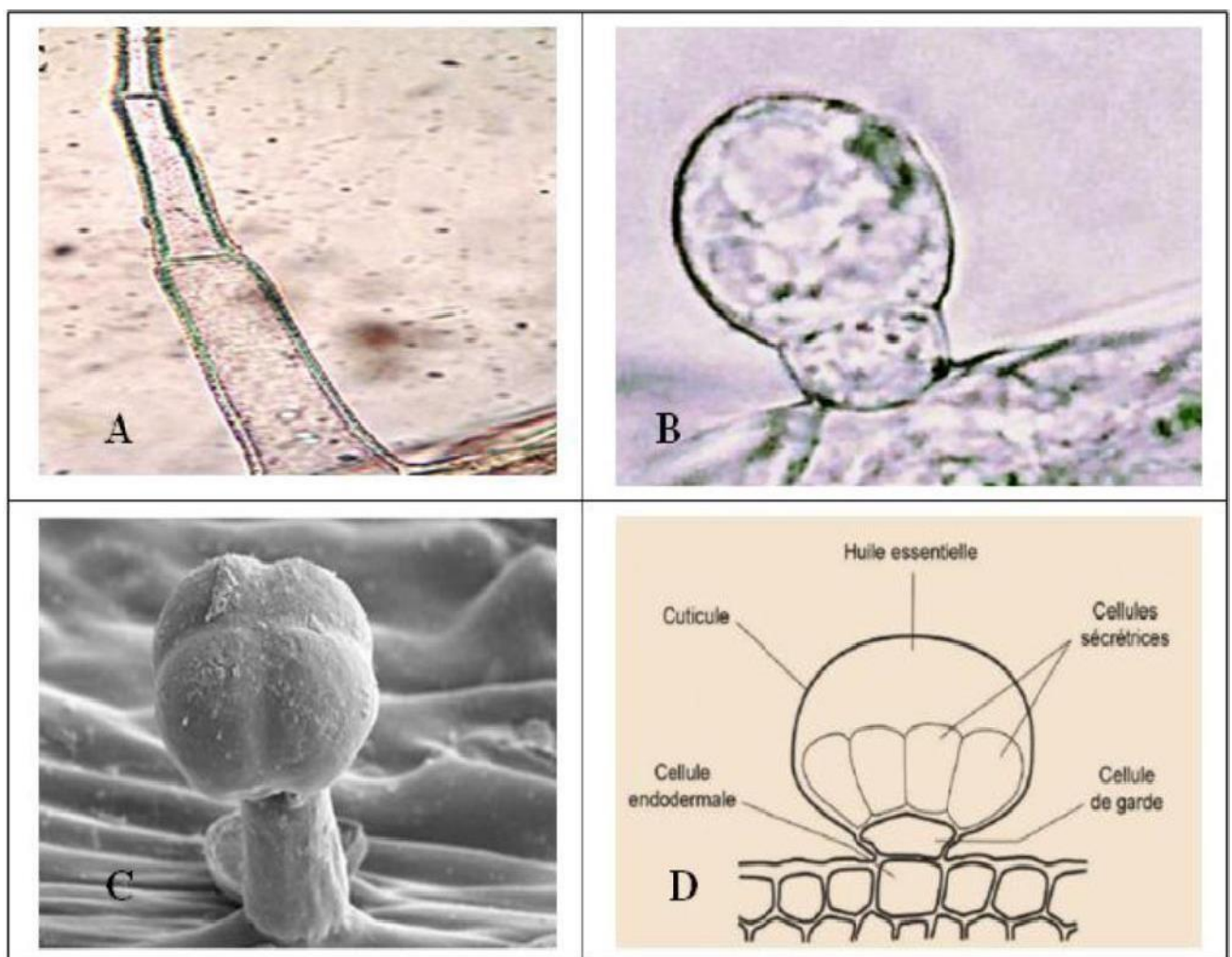


Figure N° 12 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles [29]

- (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*,
- (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*,
- (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima*

(D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris*.

3. Composition chimique

La composition chimique des HEs est complexe ; car elles sont constitués d'un mélange de composés qui appartiennent principalement à deux grands groupes chimiques caractérisés par des origines biogénétiques distinctes qui sont : le groupe des terpénoïdes (prédominants) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquents). Mais elles peuvent aussi contenir en plus des constituants non volatils issus de processus de dégradation [40]

Plusieurs études reportent que l'analyse de la composition chimique des HEs se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC) ; et ce pour l'analyse quantitative, et par chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ; pour l'analyse qualitative, cette analyse peut également être réalisée par la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) [41]

- **Les terpénoïdes**

Les terpènes constituent une famille de composés qui sont vraisemblablement les composés naturels des végétaux les plus variés structurellement, le terme terpénoïdes ou terpène dérive du fait que ces composés ont été extraits pour la toute première fois de la térébenthine ("terpentin" en allemand)[42].

Les terpénoïdes sont synthétisés à partir de cinq unités de carbone du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère, le pyrophosphate de diméthylallyle (β,β -diméthylallyle) qui sont tous deux issus de l'acide mévalonique, leur combinaison donne le pyrophosphate de géranyle (GPP) qui se transforme en géraniol et autres monoterpènes. La synthèse des autres terpènes s'effectue à la suite de condensations d'autres unités d'IPP, ce qui est montré par la figure 3. [43]

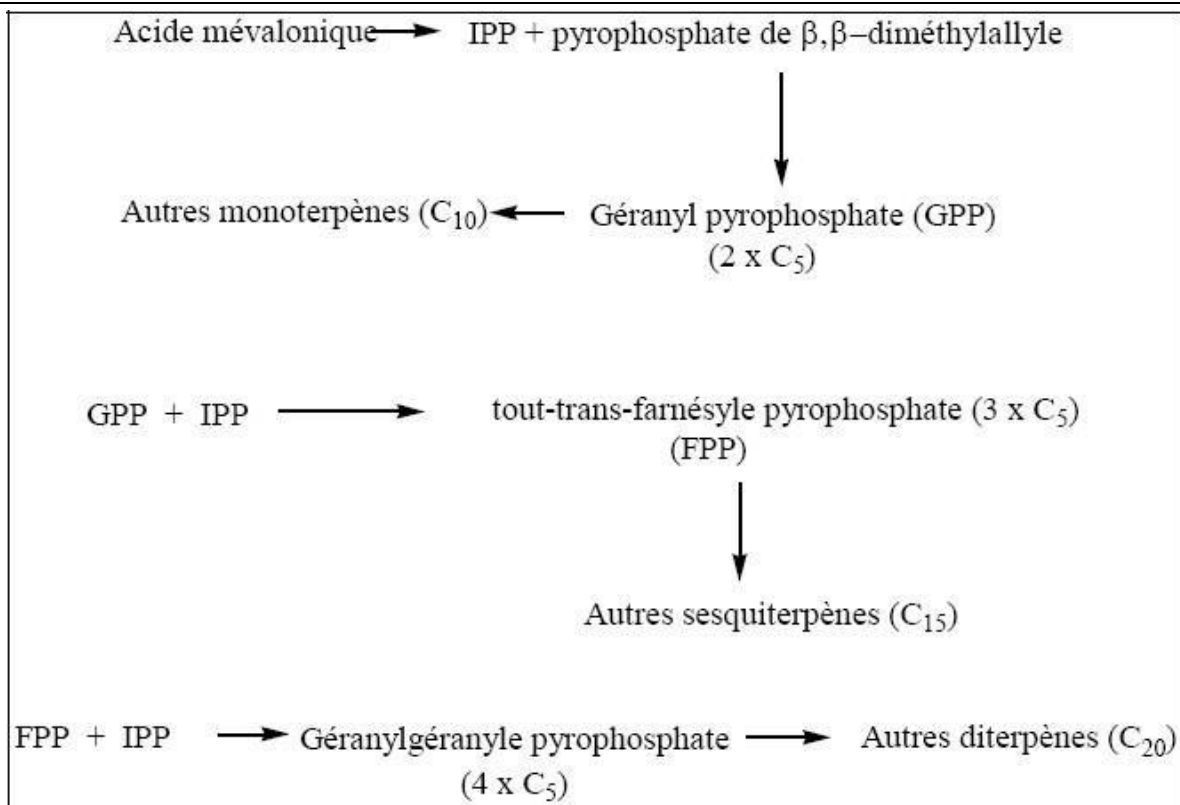


Figure N° 13 : Biosynthèse des terpènes [44] .

Selon SVOBODA *et al.* (2000) ainsi que COUIC-MARINIER et LOBSTEIN (2013),

les terpènes ont une structure cyclique ou linéaire et répondent généralement à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant le nombre d'unités isopréniques on a les hémiterpènes, monoterpènes, sesquiterpènes...

Les terpènes qui sont rencontrés dans les HEs sont les terpènes les plus volatiles c.-à-d. ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, il s'agit des mono- et sesquiterpènes [45]

- **Les monoterpènes**

Les monoterpènes en C10 sont constitués de deux unités isoprène, ils sont parfois majoritaire dans l'HE par exemple ils constituent 90% de l'HE de *Citrus*. Ils peuvent être classés selon leur structure en : composés acycliques (myrcène, ocimènes), monocycliques (α - et γ -terpinène, p-cymène) ou bicyclique (pinènes, Δ^3 - carène, camphène, sabinène), ou bien selon leur fonction en : alcools (géraniol, linalol), aldéhyde (géraniol, néral), cétones, esters, éthers, peroxydes, phénols [45]

Ils sont surtout présents chez les conifères et sont considérés comme

étant des agents anti-infectieux (bactéricides, fongicides et virucides), ainsi que d'excellents immunostimulants et de bon analgiques à action percutané [46].

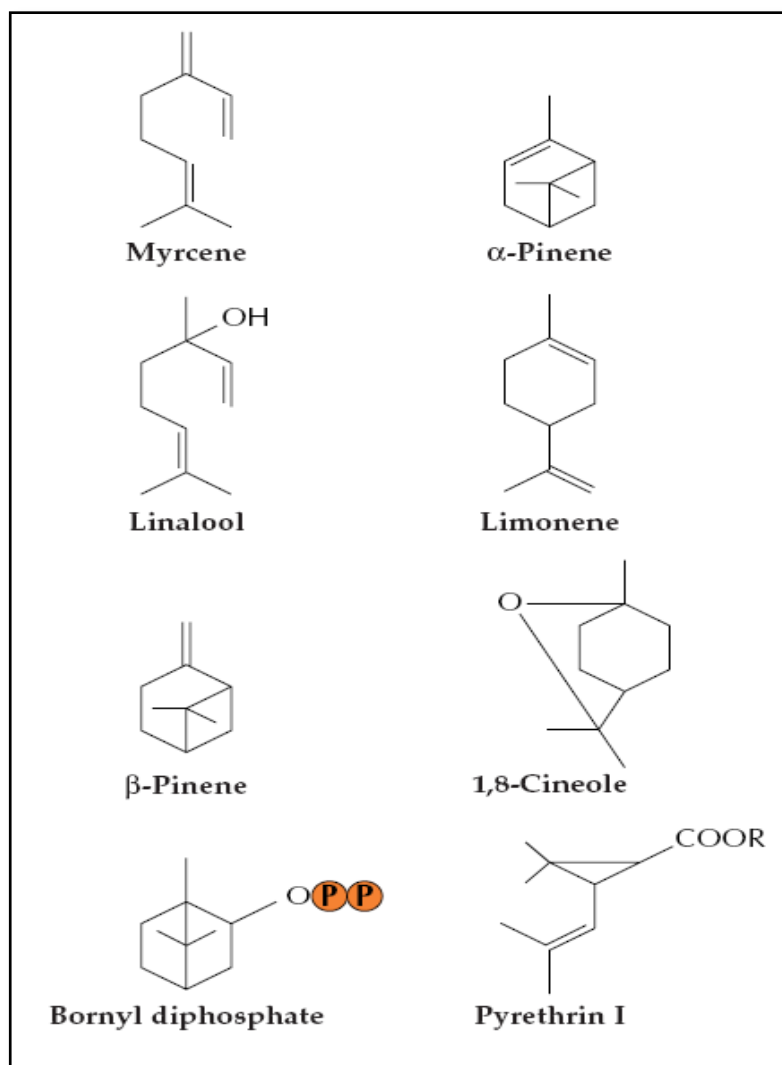


Figure N° 14 : Structures de monoterpènes, incluant des composés insecticides (α - et β -pinene pyrethrin), des pollinisateurs (linalool et 1,8-cineole), et des agents anti-herbivores (1,8-cineole) [42].

- **Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes en C15 comportent trois unités d'isoprènes, il faut noter que les variations structurales dans cette classe de terpènes sont de

même nature que chez les monoterpènes (alcools, cétones...) mais le nombre de cyclisation possible augmente d'où l'existence d'une très grande variété de structures connues.

Exemples de certains sesquiterpènes : carbures mono ou polycycliques (β -bisabolène, longifolène), alcools (farnésol, β -santalol), ester (acétate de cédryle) [45].

Ils sont légèrement hypotenseurs, calmants et anti-inflammatoires mais peuvent être néphrotoxiques [46]

4. Facteurs influençant la composition chimique (qualité)

La composition chimique, la qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent de plusieurs paramètres à savoir :

- Intrinsèques: les facteurs génétiques, la localisation et le degré de maturité
- Extrinsèques : le sol, le climat et l'environnement
- Technologiques : type de culture, mode de récolte et mode d'extraction.

Par conséquent la composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'un même genre botanique. Parfois ces variations peuvent s'observer au sein d'une même espèce, on parlera alors de chémotypes : il s'agit d'un polymorphisme chimique [18].

5. Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont volatiles et liquides à température ambiante, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels et elles sont liposolubles. Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau et elles sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette (on parle d'eau aromatique) [19]

6. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Au cours des dernières décennies, la résistance développée par les microorganismes aux antibiotiques constitue un phénomène biologique délicat et la médecine se trouve incapable

pour établir des solutions permanentes à ce problème. L'évolution des antibiotiques ne permet aux bactéries que de s'adapter et la recherche de nouvelles molécules actives et plus puissantes est indispensable. A cet égard, les produits naturels des plantes, à effet antimicrobien, ont gagné un grand intérêt [20] et la recherche des agents bioactifs naturels pour combattre les infections est une nécessité absolue pour résoudre les problèmes de résistance. Dans ce contexte, les huiles essentielles des plantes, qui se caractérisent par leur grande richesse de molécules naturelles tant en nombre qu'en variété, peuvent constituer une alternative à l'usage des antibiotiques inefficaces et ouvrir de nouvelles perspectives [20,22]. De plus, les huiles essentielles, comme agents antimicrobiens, sont des produits naturels qui assurent plus de sécurité pour les consommateurs et sont considérées moins risqué vis-à-vis de la résistance développée par les microorganismes pathogènes [23] éventail de bactéries. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives [24]. Cependant, Burt (2004) a rapporté que les bactéries Gram+ ne sont pas toujours les plus sensibles aux huiles essentielles. A cet égard, il existe quelques exceptions. La bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* a été décrite résistante à l'effet de l'huile de *S. officinalis* et *T. algeriensis* [25]. La bactérie Gram négative *Escherichia coli* est très sensible à l'huile de *S. officinalis* [26]. Dans leur étude Nikolic [27] ont observé que la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* et la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* sont toutes les deux sensibles à l'action de l'huile de *T. algeriensis*. Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré que la souche bactérienne la moins sensible à l'effet des huiles essentielles de *S. officinalis*, *R. officinalis* et *T. algeriensis* est la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* [28].

7. Mode d'action des huiles essentielles

De façon générale, l'activité antibactérienne de plusieurs huiles essentielles testées est plus puissante sur les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives [29]. Mais, le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement établi [30]. Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs composés majeurs, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi cellulaire ou la membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne [21]. Compte-tenu de la variabilité des constituants chimiques présents dans les huiles essentielles, leur activité antibactérienne est attribuée à la combinaison de plusieurs modes d'action au niveau de la cellule bactérienne [14, 21]. Selon Burt (2004), l'action des constituants des huiles essentielles sur la cellule bactérienne réside dans l'augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique ce qui entraîne un

relargage des éléments cytoplasmiques (ions et métabolites) et une fuite de protons, ce qui provoque une chute de la force protomotrice et une coagulation du cytoplasme. Si les constituants cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie et si leur perte est importante, cela provoque la mort de la cellule bactérienne [21].

8. Procédés d'obtention des huiles essentielles:

8.a La distillation:

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. [37]

a) L'hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition (Figure 13). Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

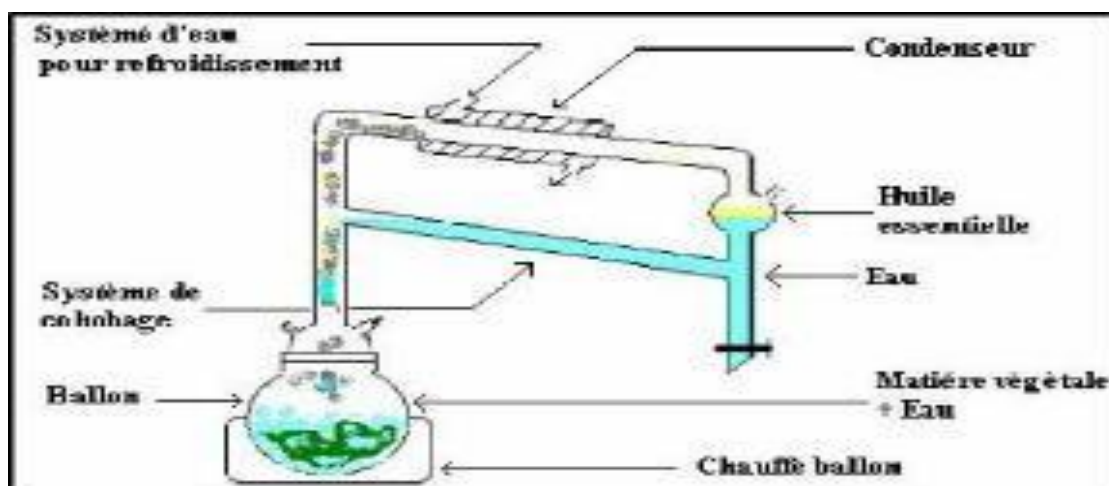


Figure N°15: Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle: [39]

b) La distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [34].

c) L'hydrodiffusion:

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils

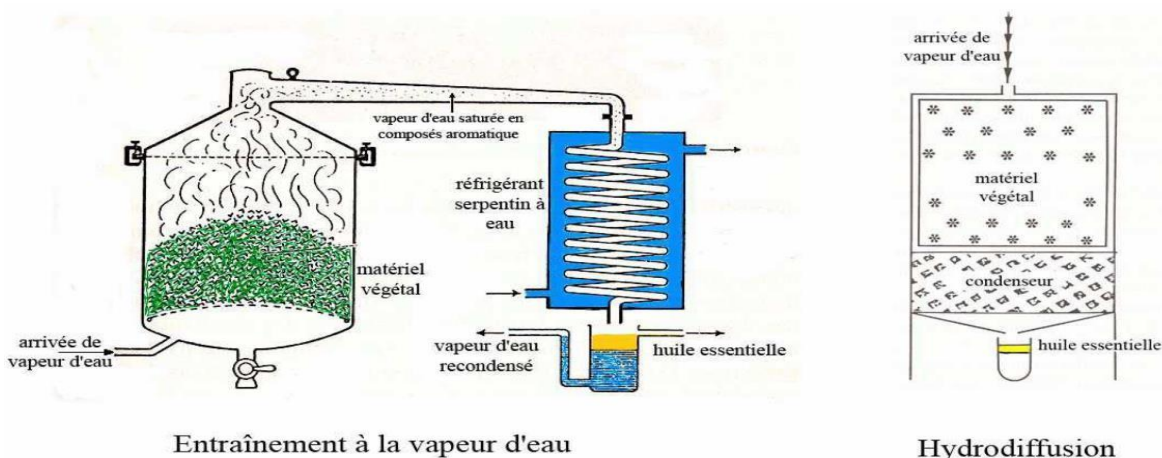


Figure N° 16: Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante [31, 32]:

8.bExtraction par micro-ondes:

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. [38]

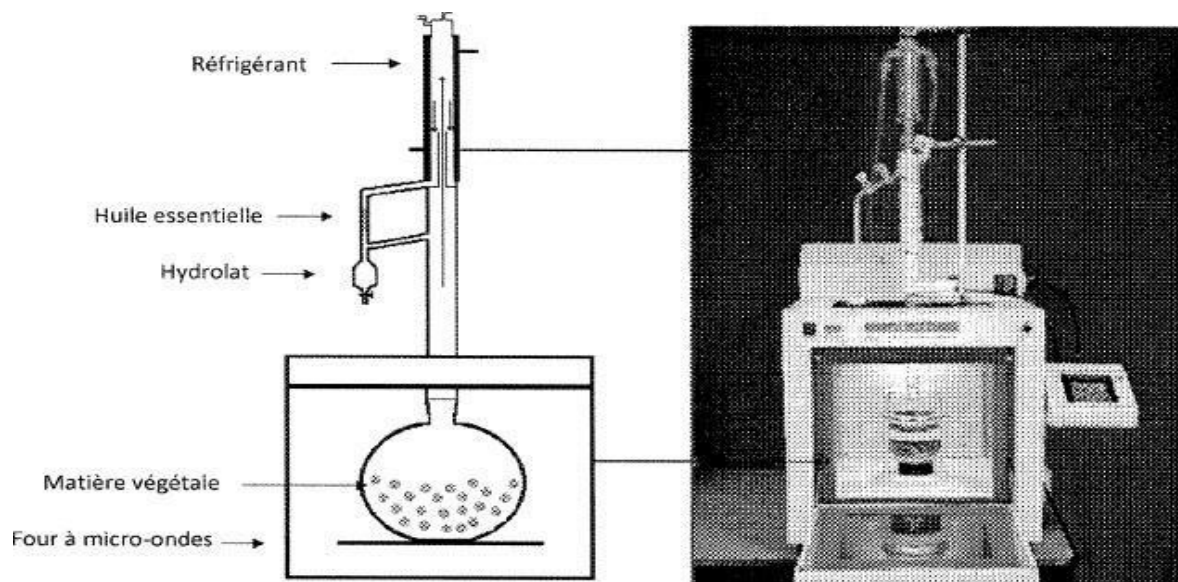


Figure N° 17 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes (LUCCHESI *et al.*,2007).

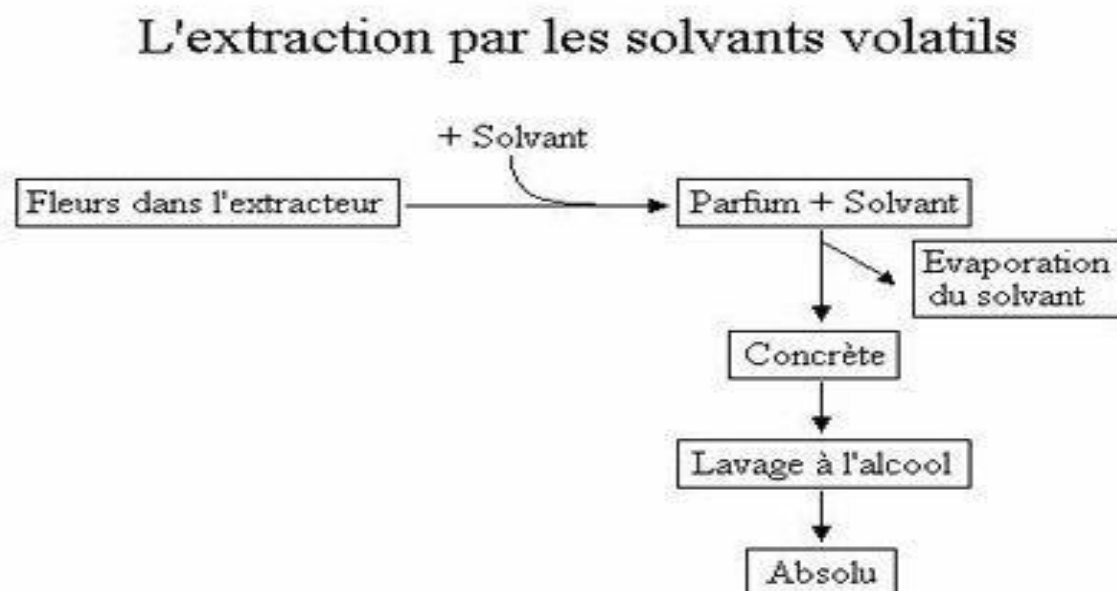
8.c Extraction par solvants volatils:

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense: le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydro distillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet sont les principales. [33]

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant

de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux microondes et aux ultra-sons.

Figure N° 18: L'extraction par solvants volatils [31, 32]:



8. dExpression à froid: [36]

Les huiles essentielles de fruits d'hespéridés ou encore d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes.

C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid.

Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois desacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois.

Alors que jusqu'à une époque récente, l'huile essentielle constituait le produit majeur obtenu à partir des fruits de Citrus, désormais c'est le jus qui représente le produit le plus important, l'huile essentielle étant devenue un sous-produit de la production de jus de fruits d'agrumes. De plus l'expression de type manuel dite « à l'éponge » a laissé place à des procédés beaucoup plus

industrialisés et mécanisés afin de diminuer les coûts, d'augmenter les rendements et de préserver le fruit en vue de l'extraction de son jus. Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans la majeure partie de ces procédés peut altérer les qualités des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes. C'est pourquoi les constructeurs cherchent en permanence à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors de telle extraction.

L'extracteur est une machine permettant l'expression à froid de l'huile essentielle des hespéridés sans emploi d'eau, ce qui évite ainsi des altérations telles les hydrolyses ou les solubilisations des certaines classes de composés aromatiques.

Le principe de cette machine est basé sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression.

La sfumatrice provoque la libération de l'huile essentielle des sacs oléifères au moyen de zones de vibrations ce qui a pour effet de restituer de façon intacte l'écorce de fruit (sans traces de blessures). L'huile essentielle est ensuite entraînée par un jet d'eau avant d'être séparée de la phase aqueuse par centrifugation.

La machine d'extraction « in line », relativement complexe, permet à la fois l'extraction du jus et de l'huile essentielle du fruit sans que ces deux produits soient en contact.

8.e Extraction par CO₂ super critique: [35]

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

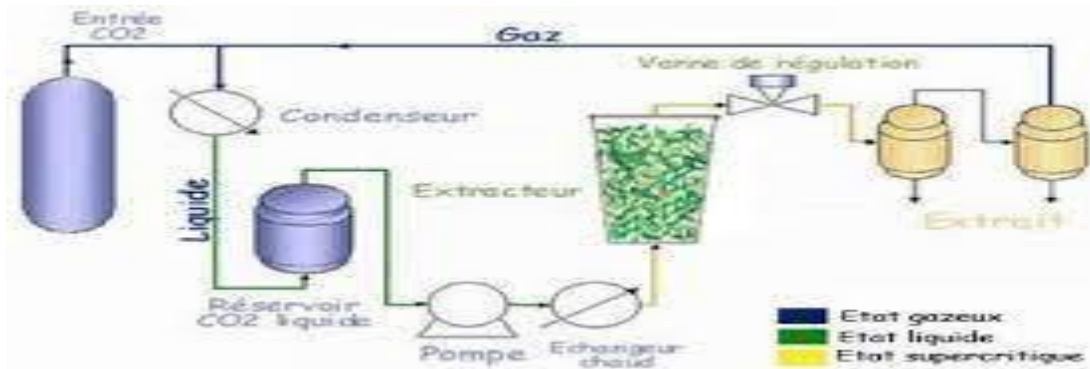


Figure N° 19 : Extraction par CO2 super critique

9. Conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps (à l'exception des huiles essentielles extraites des zestes d'agrumes qui ne se conservent pas plus de 2 ans).

Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, il faut bien refermer les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère. Tenir les flacons hors de portée des enfants. Les flacons doivent être stockés en position verticale, en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles ont une action corrosive sur le plastique). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années.

10. Critère de qualité

L'huile essentielle utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité: [34]

- L'espèce botanique:

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce.

-L'organe producteur :

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs...) distillée (ou pressée pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes.

-L'origine géographique.

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes.

Le mode de culture :

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage. Il est souvent représenté par un label si la plante provient d'une culture biologique.

Le chémotype : [47]

Il définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle.

Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat, son sol.

Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles. On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles.

11. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles :

Une fois l'extrait obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants.

a) Chromatographie en phase gazeuse : [48, 49]

Elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées. [49]

b) Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O) :

Les huiles essentielles obtenues renferment très souvent des centaines de composés volatils. Le couplage CPG/O combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, une partie des composés élués est envoyée vers un cône de détection nasale qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme.

c) Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

- Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence.

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes. [50]

- **Ionisation:** les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ.
- **Accélération :** Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation :** Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge.
- **Détection:** après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- **Traitement du signal :** le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des

constituants séparés par la CPG.

12. Domaines d'utilisation des huiles essentielles :

a) Dans les industries agro-alimentation :

Les huiles essentielles sont utilisées comme condiments, aromates ou épices. C'est le cas des essences de gingembre, de girofle, de vanille, de basilic, de poivre, de citrus. Les huiles essentielles extraites de citrus, par exemple, trouvent leur utilisation dans la confiserie, les sirops, les biscuiteries. On note leur intégration aussi dans les boissons, les produits laitiers, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries ainsi que la nutrition animale. [50]

b) La médecine et l'industrie pharmaceutique :

Les propriétés pharmacologiques des HE leur confèrent un pouvoir antiseptique contre les bactéries, champignons et levures, en plus des propriétés bactériostatiques, bactéricides, vermicide, fongicides, antiseptiques, insecticides. Les HE de thym, girofle, lavande, eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus Antiseptique que le phénol. [51, 52]

L'huile essentielle de Malaleuka a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydante.

Des propriétés spasmolytiques et sédatives: Certaines drogues à HE (menthe, verveine) sont réputées efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux.

Des propriétés irritantes: De nombreuses crèmes, pommades à base d'HE sont destinées à soulager entorses, courbatures ou claquages musculaires, certaines HE ex: oléorésine dans la térébenthine) augmentent la microcirculation, induisent une sensation de chaleur et dans certains cas une légère anesthésie locale.



Figure N° 20: des médicaments à base d'HE: [53]

c) L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique:

Utilise fréquemment les huiles essentielles. La cosmétique est le secteur des produits d'hygiène naturels et synthétiques pour consommateurs. Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires [55]. On les retrouve aussi dans les préparations pour bains. Intégrées aux huiles de massage, leur teneur ne doit pas passer 3 à 4%. Le menthol, par exemple, trouver une utilisation variée dans les produits tels que les dentifrices, mousses, nettoyantes, aliments, cigarettes et des préparations pharmaceutiques orales. L'huile de menthe poivrée est la troisième saveur mondiale, derrière les saveurs vanille et citron. [53, 54]



Figure N° 21: utilisation d'HE dans la cosmétique:

d) Dans diverses industries:

Ce sont surtout des industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des HE) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc.... [56]

Citons ainsi l'utilisation des isolats linalool, D-limonène dans des shampoings et sprays insecticides pour les chats et les chiens.

Partie pratique

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes :

1. Objectifs

L'objectif du présent travail a consisté principalement en la valorisation des huiles de la menthe vertcommerciale et extraite

Les principaux objectifs sont :

- Extraction des huiles essentielles.

Calcule le rendement des huiles essentielles de menthe

2. matériel végétal :

a) Menthe verte (*Mentha spicata*).

C'est l'espèce la plus souvent plantée dans nos jardins, comme condiment et pour les infusions. On la cultive aussi pour son huile essentielle qui sert à aromatiser chewing-gum, dentifrices, etc. La menthe verte appelée aussi menthe douce, a des feuilles très odorantes, d'un vert-gris brillant, qui sont presque rondes et presque démunies de duvet, les fleurs sont violacées[59].



Figure 22 : *Mentha spicata* (Menthe verte)

b) Classification botanique:

Règne	<i>Plantae</i>
-------	----------------

Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha spicata</i>

Tableau 02: classification de la menthe poivrée

c) Principaux constituants actifs de son huile essentielle :[59]

- Monoterpènes : limonène (env.30%).
- Cétones : carvone (env. 60%).

d) Ses propriétés thérapeutiques : [59]

- Anti-inflammatoire
- Calmante nerveuse
- Anticatarrhale, mucolytique
- Tonique digestive Cicatrisante



Figure N° 23 : Mesure de la masse de menthe à l'aide d'une balance électronique

3. Matériel du laboratoire

Verrerie

- Ballons de 1000 ml et 500 ml à fond rond
- Erlenmeyer de 250 ml
- Éprouvette graduée
- Réfrigérant
- Coude verrerie
- Ampoule à décanter
- Entonnoirs
- Béchers
- Fioles 1000 ml
- Tubes de prélèvement avec bouchon

Produits chimiques

- Eau distillée
- Cyclohexane

Appareils

- Chauffe-ballon
- Rotavapor
- Balance

Autres

- Para film
- Source d'eau
- Support
- Pince

4. Méthode d'extraction des huiles essentielles.

La quantité des huiles essentielles contenues dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle, ce qui explique leur coût élevé. Cependant, les huiles essentielles sont généralement diluées avant d'être utilisées à cause de leur toxicité à trop fortes concentrations

Pour 100 kg de plantes fraîches	Quantité d'huile essentielle obtenue à la distillation
Eucalyptus globuleux	2 à 3 kg
Lavande officinale	Env. 1 kg
Marjolaine à coquilles	300 à 400 grammes
Géranium roast	100 à 300 grammes
Mélisse officinale	15 à 20 grammes
Rose de Damas	3 à 8 grammes

Tableau .3 Rendements en huiles essentielles chez certaines plantes (Anonyme1, 2011).

a) L'hydrodistillation

La matière végétale (40 g), constituée des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries) de menthe, est introduite dans un ballon de 1 L rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de sa capacité. Ce dernier est ensuite mis à ébullition pendant 3 heures. Sous l'action de la chaleur, les cellules sécrétrices de l'huile essentielle éclatent et libèrent des composés organiques volatils. La vapeur d'eau formée entraîne avec elle les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant où ils se condensent sous forme de gouttelettes. L'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité en deux phases :

- Phase organiques : huileuse et très odorante appelée « huile essentielle » contenant la majorité des composés odorants.
- Phase aqueuse : odorante appelée « eau aromatique » contenant que très peu des composés odorants.



Figure N° 24 : montage d'hydrodistillation.

b) Extraction liquide-liquide (décantation)

À cette phase, on verse le distillat obtenu dans une ampoule à décanter de 1 L et on ajoute une quantité suffisante du solvant (cyclohexane). Ensuite, on agite énergiquement le mélange puis on dégaze et laisse reposer jusqu'à l'obtention de deux phases : une phase supérieure (phase organique) qui est le mélange huile-solvant et une phase aqueuse représente l'eau odoré. Enfin, on sépare les deux phases dans deux récipients différents.



Figure N° 25 : montage de séparation liquide-liquide (décantation)

c) **Évaporation rotative**

Pour récupérer l'huile essentielle brute, il ne reste plus qu'à évaporer le solvant. Cela se fait à l'évaporateur rotatif. L'huile est récupérée dans un tube opaque et conservée à 4°C.

En pratique, on utilise évaporateur rotatif qui permet d'éliminer le solvant (cyclohexane) sous vide. Le Protocole d'évaporation est le suivant :

- Mettre le thermostat du bain en route. La température sera adaptée au solvant à extraire (80 .75 °C température d'ébullition de cyclohexane)
- Mettre l'eau dans la colonne de condensation
- Déclencher la trompe à eau.
- Placer le ballon contenant l'huile essentielle de menthe et son solvant (cyclohexane).
- fixer le ballon par sécurité par une pince.
- Fermer le robinet
- Mettre le ballon en rotation.

- Descendre le ballon pour le mettre en contact avec la solution.
- Attendre les premières gouttes de solvant dans le ballon de recueillement.
- Vérifier que le solvant est distillé et le ballon doit être froid.
- Arrêter le tout en prenant garde de ne pas faire un retour d'eau en coupant la trompe à eau en premier.
- Récupérer l'HEs de menthe dans un tube opaque.



Figure N° 26 : montage de l'évaporateur rotatif

1. Calcul du rendement :

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en

pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = (M'/M) \times 100$$

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

1. Propriétés organoleptiques de l'HE

Les huiles essentielles renferment plusieurs composés : les phénols, les cétones et les hydrocarbures terpéniques qui leurs confèrent divers caractères. Parmi eux ceux qui font impression sur les organes de sens, plus particulièrement sur le goût, l'odorat et la couleur : ils ont été groupés sous la qualification d'organoleptiques. Nous avons donc noté l'aspect, l'odeur et la couleur de l'huile essentielle de la menthe.

D'après les nos résultats, l'huile essentielle obtenue est un liquide limpide incolore à jaune pâle avec une odeur herbacée fraîche et forte. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés dans la littérature (Bardeau, 2009 ; Sylvain, 2010)

2. Évaluation du rendement de l'extraction



Figure N°27 : mesure le poids de l'huile essentielle

Le rendement de l'HE obtenue par hydrodistillation est estimé à :

$$R_{HE} (\%) = (2,296 / 240) \times 100$$

$$R_{HE} (\%) = 0,956\%$$

Le rendement obtenu ($0,956 \pm 0,014$) est haut que ceux trouvés dans la région Sétifde 0.9% (Boukhebti et al., 2011) et bas que se trouvé d'autre régions Bejaia avec un rendement de 1.1% (Brahmi et al., 2016)Saida de 1.3% (Allali et al., 2013). Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment la saison de récolte et les conditions environnementales (Hussain et al., 2010) ; l'écotype, la phénophase, la température, l'humidité relative, la photopériode, l'éclairement, le génotype et les conditions agronomiques (plantation, temps de récolte et densité des cultures [60]

Conclusion

Conclusion :

L'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique [61].

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. [62]

Parmi les métabolites secondaires on peut citer les HEs, qui elles sont destinées en effet à quatre grands secteurs industriels (Grysole, 2004) qui sont : Secteur parfumerie, cosmétique, Secteur parfumerie technique, Secteur alimentation et Secteur médecine.

Ces HEs ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits : Elles entrent dans la composition de parfums, de cosmétiques (shampooings, gel-douches, crèmes, laits, déodorants corporels), de produits d'entretien (savons, détergents, lessives, assouplissants de textile) et de tout autre produit, comme par exemple insecticides, désodorisants d'ambiance, diffuseurs, bougies. Elles sont aussi utilisées comme arômes pour ajouter aux aliments des odeurs et/ou des saveurs

La disparition de nombreuses substances actives de synthèse en protection des cultures a entraîné un regain d'intérêt pour les substances d'origine naturelle.

En parallèle à ces disparitions, le contexte réglementaire incite fortement à développer l'utilisation des méthodes alternatives à la lutte chimique : directive cadre sur l'utilisation durable des pesticides, règlement 1107/2009 sur la mise en marché des produits phytosanitaires, plan Ecophyto 2018. Parmi ces méthodes, on peut citer l'emploi de bio-pesticides et en particulier des huiles essentielles.

De ce fait un autre secteur a vu la lumière ces dernières années c'est les biopesticides à base des HES Bien qu'accessibles à tous, les huiles

essentielles peuvent représenter certains dangers et malgré leur image de produits naturels elles ne sont pas dépourvues de toxicité. En effet, les chercheurs signalent chaque année des problèmes de santé dus à l'utilisation des huiles essentielles.

Référence bibliographique :

- [1](Medine.Ch, 2015) , la culture de la menthe
- [2](Gilly, 1989),.les menthes cultivées.
- [3](Huet, 1972)
- [4](FAO, 2015) Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculteur
- [5] (*Emerso, 2004*)
- [6] (Morigane, 2004). ,grimoire des Plantes.
- [7] NT et Beniston, 1984). plantes aromatiques et médicinales
- [8] (Eberhard, 2005) *Mentha spicata* L
- [9] (Baba Aissa, 1999) , encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). EdLibrairie moderne. ROUIBA
- [10] (Melvyn et *al.*, 1980) , Mint production in the Midwestern United States. Cooperativeestention service. Michigan State University
- [11] (Beloued,2001). plantes médicinales d'Algérie
- [12] (Hart et al., 2008) Hart K.J. Yánez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R. Newbold C.J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 8–35
- [13]Rubiolo et al., 2010) Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi. (2010). Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25, 282-290
- [14] (Burt, 2004) Huiles essentielles : leurs propriétés antibactériennes et leurs applications potentielles dans les aliments : un examen. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 94, 223-253
- [15] (Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007). Pourmortazavi SM., Hajimirsadeghi SS., (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*. 1163: 2-24
- [16] Bakkali et al, 2008). Bakkali F., Averbek S., Averbek D., Idaomar M., (2008). Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 46: 446–475
- [17](Amlan et Patra, 2010) Amlan K., Patra J.S., (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71: [1198–1222].

[18] (Himed, 2011) Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à la margarine. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine, Algérie. 91p.

[19] (Bruneton, 2008 ; Baser et Buchbauer, 2010) Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1188, Baser Khc., Buchbauer G., (2010). Handbook of Essential oils: Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

[20] (Essawi et Srour, 2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology 70, 343-349.

[21] (Guinoiseau, 2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : Séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat, Université Corse-Pasquale Paoli. 143 P.

[22] (Derwich et al., 2011) Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. (2011). In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of Rosmarinus officinalis grown in Morocco. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3, 89-95.

[23] (Cardile et al., 2009) Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F. (2009). Essential oils of Salvia bracteata and Salvia rubifolia from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. Journal of Ethnopharmacology 126, 265-272.

[24] Cimanga et al., 2002 ; Tenore et al., 2011; Ben Mansour et al., 2013) Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology 79, 213-220, Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Apostolides Arnold, N., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of Salvia lanigera from Cyprus. Food and Chemical Toxicology 49, 238-243.

Ben Mansour, M., Balti, R., Rabaoui, L., Bougatef, A., Guerfel, M. (2013). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian Ajuga pseudoiva Rob. Lamiaceae. Process Biochemistry 48, 723-729.

[25] (Hayouni et al., 2008 ; Hazzit et al., 2009) Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008). Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella

inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, 242-251, Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chemistry* 116, 714-721.

[26](Hayouni et al., 2008) Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, 242-251

[27](Nikolić et al., 2014) Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products* 52, 183- 190.

[28] (Longaray Delamare et al., 2007 ; Hayouni et al., 2008 ; Zaouali et al., 2010 ; Zouari et al., 2011). Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608, Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, 242-251, Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3144-3152, Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A. (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioprocess Technology* 89, 257-265.

[29] Longaray Delamare et al., 2007) Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100, 603-608

[30] (Kalembe et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med.*

Chem 10, 813-829.

[31]Baba-Moussa F., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J ethnopharmacol*; 66 p: 335-338

[32] Boysen et al., 2000; Hageskal et al., 2006

[33] Conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, l'Institut National Espèces Salvia, Lavandula et Mentha du Maroc, Faculté des Sciences de Rabat, espèces. Tome III, Paris 1948,803-810

[34] FRANCHOMME, P., JOLLOIS, R., PENOEL, D. L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles Editions Jollois, 2001

[35] Journal of agricultural and food chemistry . Antimicrobial Screening of Mentha piperita Essential Oils Medicinal and Aromatic Plant and Drug Research Centre(TBAM), Anadolu University, 26470-Eskisuehir , Turkey

[36] Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996

[37] Mann J. (1987). Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford, 374 p.

[38] Marie Elisabeth Lucc, thèse sur : Extraction sans solvant assistée par Microondes Maroc, 1982,18-22

[39] Niessen, 2007

[40] (BRUNETON, 1999 ; SANGWAN *et al.*, 2001 ; CATIER et ROUX, 2007).

[41] (BISSANGOU et OUAMBA, 1997 ; ALITONOU *et al.*, 2004 ; BURT, 2004 ; TOMI *et al.*, 2011 ; BOUKSSAIM *et al.*, 2013).

[42](CROUTEAU *et al.* 2000) Croteau R., Kutshan TM., Lewis NG., (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchana, B., Grisse, W., Jones, R. (eds), biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of plant Physiologists, 1408 : 1250-1268.

[43](BURT, 2004; GARNEAU, 2004)

[44] (GARNEAU, 2004).

[45](BRUNETON, 1999). Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 418-419.

[46] (COUIC-MARINIER et LOBSTEIN, 2013) Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques; 52 (525) : 18-21.

[47] Botanique dans l'antiquité, Tome I, Boulevard Saunt-Germain Paris VIe, 1964,

Edition

[48] Nisrin Benayad, Thèse sur: les huiles essentielles extraite par

plantesmédicinales.

[49] Patricia Bechaalany, These sur : Ostéopathie et aromathérapie l'utilisation des Polytechnique deToulouse, 13 Décembre 2010, 22-3

[50] Pradeau et Cohen, 1992

[51] Chaker El Kalamounni, Thèse sur: Caractérisations chimiques et biologiques

[52] ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ESPÈCES VÉGÉTALES DE LA FLORE LAURENTIENNE, p 19-20 (aout 2008).

[53] Alessandra Moro Buronzo, grande guide des huiles essentielles santé beautéMarocaine : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires.

[54] Bernard et al. 1988 ; Bruneton, 1993 , Bruneton J., (1993). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier,Paris. P: 915.

[55] Madhavi et al., 1996

[56] AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR.Paris. 57 p.

[57] Copyright © Wikimédia Fondation, Kunnafofi et tous les contributeurs (licence deDocumentation libre GNU) <https://commons.wikimedia.org>.

[58] CLEVINGER J.F., 1928 :Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Amer. Pharm Assoc.*, Vol.17, pp : 336-341.

[59] Bersali imane, ghouari dounia thèse sur : Huile essentielle de Menthe : Extraction, Etude structurale etUtilisation en aromathérapie page 32 university abbass laghrour kenchla.

[60](Snoussi et al., 2015). Senoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and Vincenzo Defeo. (2015). Mentha spicata essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. A gainst planktonic and biofilm cultures of vibrio sppstrains. *Molécules*, 20: 14402-14424

[61](SVOBODA et SVOBODA, 2000).

[62](BOURGAUD et al, 2001 ; KAR, 2007)