



République Algérienne Démocratique Et Populaire

Ministère De L'Enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

Département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique**

Option : **Biochimie Appliquée**

Thème

Evaluation de quelques activités biologiques d'un
mélange des huiles essentielles
du Girofle et de la Menthe verte

Présenté par :

NESSAH Hafidha et NOUAR Khaoula

Devant les membres de jury :

- **Présidente** : M^{me} KRIM Meriem (M.C.B) Univ. Abbès Laghrou – Khenchela
- **Promoteur** : M. MAAMAR Hichem (M.C.B) Univ. Abbès Laghrou – Khenchela
- **Examinatrice** : M^{me} DJEMIL Randa (M.C.B) Univ. Abbès Laghrou – Khenchela

2020/2021

Remerciements

*Mes remerciements les plus profondes et inexprimables, d'adressent avec tout à **Allah** le tout puissant, de m'avoir accordé la force, la santé et le courage afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à **M. MAAMAR Hichem**, directeur de ce mémoire, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'encadrer ce travail, de le diriger avec tout de compétence. Sa gentillesse, sa disponibilité et la qualité de ses conseils m'ont amené à terme de ce travail.*

*Mes très profondes reconnaissances et mes sentiments les plus sincères vont également à **M^{me}. KRIM Meriem**, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce Jury de mémoire. Les plus grandes leçons ne sont pas tirées d'un livre mais d'un enseignant tel que vous. Merci pour votre vision rassurante et optimiste, vos encouragements et vos qualités humaines. Une enseignante comme vous je n'oublierais jamais !*

*Je suis également reconnaissante à **M^{me}. DJEMIL R**, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail afin de m'aider à avancer encore vers d'autres horizons. Je suis très honorée de sa présence.*

*Je tiens à remercier tous **mes enseignants**, pour leurs conseils scientifiques, leurs précieuses aides et leur encadrement de haut niveau qui m'ont permis de progresser tout au long de mon parcours éducatif.*

Dédicace

A celui qui m'a appris la réussite et la patience de sa tendresse

..... Mon père

*Et à qui les mots courent pour exprimer leur être le plus intime qui m'a
appris et a souffert de difficultés pour obtenir à où je suis et quand j'étais
couvert de soucis, je nageais dans la mer de sa tendresse pour soulager ma
douleur.*

.....Maman.....

..... à ma famille et mon clan.....

.....à mes professeurs.....

..... à mes collègues

.....à mon binôme Hafidha

.....aux bougies qui brûlent pour éclairer les autres...

..... à tous ceux qui m'ont appris une lettre

*-Je dédie cette humble recherche dans l'espoir de dieu tout-puissant de
trouver l'acceptation et le succès.*

KHAOULA

A Ma très chère mère « Yasmina »

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour et ma considération pour les sacrifices que vous avez fait pour mon instruction et mon bien être.

A mon très chère père « amour » « Que Dieu aie son âme »

La personne la plus digne de mon estime et de mon respect, je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence, j'aurais aimé que tu sois à mes côtés ce jour, que ce travail soit une prière pour le repos de ton âme.

A mes très chers frères et mes belles sœurs puis dieu donne santé, bonheur, courage et réussite

A tous les enfants

Abd el monaïme, Mohsen, Aymen, anis que Nazim, Zineb, Yasmine et maria

A tous mes collègues et mes chères amies je vous remercie pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble

A mon cher binôme « Khaoula »

Qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a encouragé pendant tous les

Moments difficiles

A tous les membres de ma famille et toute personne qui porte le nom

« Nessah »

Toutes les personnes qui m'ont aidée durant la partie expérimentale réalisée au laboratoire

A tous ceux que j'aime

HAFIDHA

Liste des tableaux

Tableau 01 : Liste de bactéries testées.	23
Tableau 02 : Préparation de concentration (les dilutions d'huiles essentielles).	28
Tableau 03 : Rendement d'HE.	30
Tableau 04 : Résultat de diamètre des zones d'inhibition de croissance bactérienne.	31
Tableau 05 : Diamètre des zones d'inhibitions de l'activité antifongique.	33
Tableau 06 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH dans le mélange des HEs.	35

Liste des figures

Figure 01 : Le mode d'extraction de l'huile essentielle.	07
Figure 02 : La menthe verte.	11
Figure 03 : Clous de girofle.	14
Figure 04 : Menthe verte (matière sèche).	20
Figure 05 : Schéma d'hydrodistillation.	21
Figure 06 : Le Clevenger utilisé dans l'extraction des huiles essentielles.	21
Figure 07 : Décantation des huiles.	22
Figure 08 : Stérilisation de spatule.	24
Figure 09 : Repiquage des souches bactériennes.	25
Figure 10 : Préparation des bactéries dans l'eau physiologie.	26
Figure 11 : Mesure des halos d'inhibition.	27
Figure 12 : Diamètre de la zone d'inhibition de l'activation antifongique.	33
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de radical libre DPPH en fonction des différentes concentration du mélange des huiles essentielles.	35

Liste des abréviations

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DPPH : Diphénylpicrylhydrazine

HE : Huile essentielle

MH : Milieu de Mueller Hinton

PDA : Potato dextrose agar

PI : Pourcentage d'inhibition

EC : *Escherichia coli*

BS : *Bacillus subtilis*

Kp : *Klabseilla sp*

SA : *Staphylococcus aureus*

RHE : Rendement d'huile essentielle

AAR : Activité anti radical

SM : Solution mère

Résumé

Les plantes aromatiques sont des sources inépuisables de substances naturelles douées de propriétés biologiques présentant un intérêt réel pour la santé et l'agriculture. Elles possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques et leur utilisation pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres-vivants, en particulier l'homme, est très ancienne. L'objectif de notre étude est d'extraire l'huile essentielle de la menthe et du girofle par l'hydrodistillation de type Clevenger.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella*. Nos résultats montrent que l'HE a un effet remarquable sur les quatre souches testées surtout avec la solution mère et la dose 1. En revanche, on note uniquement une activité antibactérienne dans la dose 2 de l'HE testée avec l'*E. coli*. L'activité antifongique a été évaluée *in vitro* en utilisant une souche de *Penicillium sp* et de la levure. Le mélange de l'HE a montré un effet antifongique très important surtout avec les fortes concentration (SM et D1) contre des deux souches testées. Quoique, les deux autres doses montrent une faible activité antifongique voire nulle pour la dose 3 contre la levure. L'activité antioxydante a été testée via la méthode de réduction du radical libre DPPH. Les doses les plus élevées de mélange de l'HE montrent une notable activité antioxydante.

Mots clés : Girofle, Menthe, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antifongique, activité antioxydante.

Abstract

Aromatic plants are inexhaustible sources of natural substances endowed with biological properties of real interest for health and agriculture. They have extraordinary therapeutic properties and their use for the treatment of several diseases in living beings, especially humans, is very old. The aim of our study is to extract the essential oil from Mint and Cloves by hydrodistillation of the Clevenger type.

Antimicrobial activity was determined on four bacterial strains *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella*. Our results show that EO has a remarkable effect on the four strains tested, especially with the stock solution and dose 1. In contrast, only antibacterial activity was noted in dose 2 of EO tested with *E. coli*. Antifungal activity was evaluated *in vitro* using a strain of *Penicillium sp* and yeast. The mixture of EO showed a very important antifungal effect, especially with the high concentrations (SS and D1) against the two strains tested. Although, the other two doses show little or no antifungal activity for dose 3 against yeast. Antioxidant activity was tested using the DPPH free radical reduction method. The highest doses of EO mixture show noticeable antioxidant activity.

Keywords: Clove, Mint, essential oil, antibacterial activity, antifungal activity, antioxidant activity.

المخلص

النباتات العطرية هي مصادر لا تنضب للمواد الطبيعية التي تتمتع بخصائص بيولوجية ذات أهمية حقيقية للصحة والزراعة. تمتلك خصائص علاجية غير عادية ، كما أن استخدامها في علاج العديد من الأمراض لدى الكائنات الحية ، وخاصة البشر ، قديم جدًا. الهدف من دراستنا هو استخراج الزيت العطري من النعناع والقرنفل عن طريق التقطير المائي من نوع Clevenger.

تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات على أربع سلالات بكتيرية *Escherichia* ، *Bacillus subtilis* ، *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella coli*. تظهر نتائجنا أن الزيت الأساسي له تأثير ملحوظ على السلالات الأربعة المختبرة ، خاصة مع المحلول الأم والجرعة 1. على النقيض من ذلك ، لوحظ النشاط المضاد للبكتيريا فقط في الجرعة 2 من الزيت الأساسي الذي تم اختباره باستخدام *E. coli*. تم تقييم النشاط المضاد للفطريات في المختبر باستخدام سلالة *Penicillium sp* والخميرة. أظهر خليط الزيوت الأساسية تأثير مضاد للفطريات مهم جدا ، خاصة مع التركيزات العالية (المحلول الأم و التركيز 1) ضد السلالتين المختبرتين. على الرغم من أن الجرعتين الأخريين تظهران نشاطاً مضاداً للفطريات ضئيلاً أو معدوماً مع الجرعة 3 ضد الخميرة. تم اختبار نشاط مضادات الأكسدة باستخدام طريقة تقليل الجذور الحرة DPPH. تظهر التراكيز الكبيرة من خليط الزيوت الأساسية نشاطاً ملحوظاً مضاداً للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: القرنفل ، النعناع ، الزيت العطري ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات ، نشاط مضاد للأكسدة.

Table de matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumés	
Introduction	01

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

I- Les Huiles essentielles	03
I-1. Définition	03
I-2. Caractérisation d'huiles essentielles	03
I-3. Etat naturel et répartition	04
I-4. Localisation	04
I-5. Propriétés physiques	04
I-6. Composition chimique	05
I-7. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles	05
I-7.1. Extraction par hydro distillation des huiles essentielles	05
I-7.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	05
I-7.3 Extraction à froid	06
I-7.4. Extraction par solvants organiques	06
I-7.5. Extraction par CO2 supercritique	06
I-8-Propriétés des huiles essentielles	07
I.8.1. Rôle des huiles essentielles chez les plantes	08
I .8.2. Propriétés biologiques	08
I .8.3. Propriétés médicinales	09
I .9. Toxicité des huiles essentielles	09
I .10. Principales propriétés physicochimiques des huiles essentielles	10

Chapitre II : Le Girofle et la Menthe

II. Généralités sur les plantes médicinales	11
II. a- Mentha	11
II .a .1. Position systématique	11

II .a.2. Description	12
II .a.3. Utilisation des menthes pour la santé	12
II .a .4. Toxicité	13
II .b. Giroflier	14
II .b.1 .Position systématique	14
II .b. 2. description	14
II .b.3. utilisation de Girofle sur la santé	15
II .b. 4. Toxicité	15

Chapitre III : Les activités biologiques

III .1. Activité antioxydant	16
III .2. Activités antimicrobien	16
III .3. Activité acaricide	16
III .4. Autres activités	17
III. 4.1. Industrie alimentaire	17
III. 4.2. Désinfection des locaux	17
III. 4.3. Activités pharmacologiques	18

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I- Matériels et méthodes	19
I.1. Objectif	19
I.2. Présentation du lieu de l'étude expérimentale	19
I.3. Matériel et méthode expérimentale	19
I.3.1. Matériel végétal	19
I.3.2. Matériel microbien	20
I.3.3. Milieux de culture	20
I.4. Méthode expérimentale	20
I.4.1. Extraction des huiles essentielle par hydrodistillation	20
I.4.1.1. Chauffage	21
I.4.1.2. Relargage	21
I.4.1.3. Décantation	22
I.5. Calcul du rendement	23
I.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne	23
I.7. Choix des souches	23

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

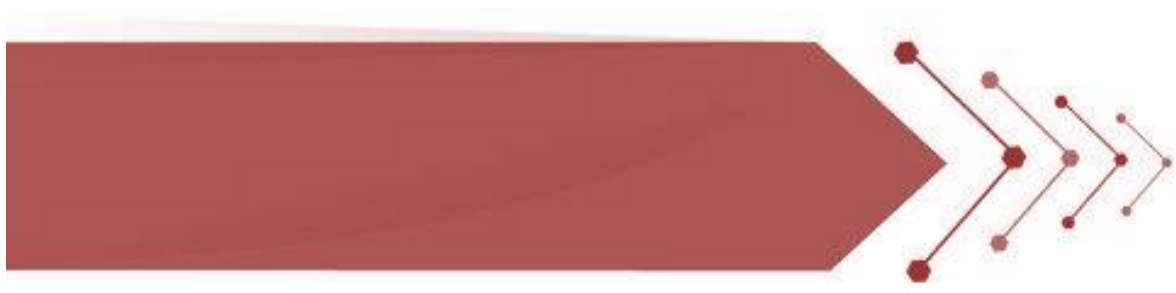
I.8. Milieu de culture	23
I.8.1. Stérilisation des matériels	24
I.9. Les étapes de l'activité antibactérienne	24
I.9.1. Le ré-isolément des souches bactériennes	24
I.9.2. Préparation de l'inoculum	25
I.9.3. L'ensemencement	26
I.9.4. Préparation des disques d'aromatogramme	26
I.9.5. Incubation et lecture	27
I.9.6. Evaluation de l'activité antifongique	27
I.10. Activité antioxydant	28

Chapitre II : Résultats et discussion

II.1. Description de l'huile essentielle	30
II.1.1. Le rendement	30
II.1.2. Lecture de l'activité antimicrobienne	30
II.1.3. Lecteur de Activité anti oxydante	34
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	38



Introduction



Introduction

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se loger, se chauffer, se parfumer, mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé. Elles représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, Saponosides, quinones, vitamines et huiles essentielles (**Lafon, 2004, Schauenburg et Paris, 2006**).

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine.

Par ailleurs, les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques et de la pharmacie (**Bruneton, 1993**).

De nos jours, les huiles essentielles (HEs) 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 (**Farnsworth, 1986**).

Notre présente étude s'inscrit dans l'objectif de réaliser une étude de recherche sur l'activité antioxydante, l'antibactérienne et antifongique *in vitro* d'un mélange des huiles essentielles du Girofle et de la Menthe.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties :

- La première partie représente une mise au point d'une synthèse bibliographique. Elle est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude des huiles essentielles ; leurs descriptions et intérêt pharmacologique ainsi que l'état de recherche sur les huiles. Le second chapitre illustre les plantes utilisées dans ce travail, et enfin le troisième chapitre qui décrit les activités biologiques qu'on va étudier par ce mélange.
- La seconde partie (pratique) renferme deux chapitres. Dans le premier chapitre nous allons décrire en détail le matériel (végétal, appareil...) utilisé et les techniques et

procèdes (extraction et dosage). Le deuxième chapitre comportera les principaux résultats obtenus ainsi que leur discussion.



Etude

Bibliographique



I- Les huiles essentielles

I-1. Définition

Ces produits, appelés communément essence, sont les substances odorantes volatiles contenues dans les végétaux. Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides.

Ces huiles essentielles sont mélangées de constituants plus ou moins nombreux, généralement liquides (**Paris et Moise, 1976**).

La définition d'une huile essentielle donnée par la pharmacopée française est aussi restrictive puisqu'elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants que ceux Obtenus par tout autre procédé (**Bruneton, 1993**).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (**Anton et Lobstein, 2005**).

I-2. Caractérisation d'huiles essentielles

La caractérisation des huiles essentielles et d'ailleurs de tout mélange naturel peut prendre plusieurs aspects en fonction du besoin et de l'objectif assigné.

Ainsi, dans la très grande majorité des huiles essentielles, les 15-25 composés majoritaires représentent 80-95% de la composition globale et sont donc suffisants pour caractériser cette huile essentielle.

Il faut toutefois signaler que la connaissance des composés minoritaires est parfois un paramètre important de la qualité biologique ou organoleptique du produit et qu'en conséquence une analyse fine est nécessaire.

Il faut également signaler qu'une analyse peut être totalement faussée par la mauvaise identification d'un seul constituant (**Sutour, 2010**).

I-3. Etat naturel et répartition

Elles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Labiées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (Lavandes, Menthes, Mélisse...etc.), mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (Vétiver, Curcuma, Gingembre), les écorces (Cannelles), le bois (Camphrier, Sassafras), les fruits (Poivres, Badiane, fruit d'Ombellifères, de Citrus), les graines (noix de muscade).

A noter que, pour une même espèce, la composition des essences peut varier d'un organe à l'autre et suivant les conditions du milieu. En climat chaud, la teneur en huile essentielle est plutôt élevée (**Paris et Moyse, 1976**).

Quantitativement, les tenures en l'huile essentielle sont plutôt faible, assez souvent inférieures à 1% (**Belaiche, 1991**).

I-4. Localisation

Au point de vue de la localisation dans la plante, les huiles essentielles peuvent se former dans des cellules non différenciées, ou plus grosses (Lauracées). Le plus souvent, elles sont localisées dans des organes sécréteurs: poils des Labiées et des composées: l'essence formée s'accumule sous la cuticule; poches sécrétrices schizogènes des Myrtacées, résultant de division répétée d'une cellule et de l'écartement des cellules filles laissant un méat où s'accumule l'essence; poches schizolysigène des Rutacées où il y a d'abord formation d'un méat, puis lyse d'une partie du tissu sécréteur de bordure ; canaux sécréteurs, dont le produit de sécrétion renferme également des résines (**Paris et Moyse, 1976**).

I-5. Propriétés physiques

- Ce sont des liquides à la température ordinaire.
- Volatiles, odorant.
- Généralement incolores ou jaune pâle.
- Leur densité est le plus souvent inférieure à 1.
- Leur indice de réfraction souvent élevé avec un pouvoir rotatoire.

- Peu soluble dans l'eau, solubles dans l'alcool et solvant organique. (**Paris et Hurabielle, 1980**).

I-6. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges de complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatique dérivés du phénylpropane –beaucoup moins fréquents– d'autre part (**Buneton, 1995**).

Les huiles essentielles peuvent être mises en évidence dans les coupes d'organes végétaux au moyen de colorants spéciaux (Liochromes) : orcanette, Soudan III (**Paris et Moyse, 1976**).

I-7. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction des huiles essentielles dépendra de la nature du Matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Hellal, 2010**).

I-7.1. Extraction par hydro distillation des huiles essentielles

Le principe de l'hydro distillation consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau (aujourd'hui remplacé par un Clevenger), que l'on porte ensuite à l'ébullition.

La vapeur d'eau et l'essence libérée par la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et son appareillage n'est pas coûteux (**Lucchesi, 2005**).

I-7.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est placé sur une grille perforée à travers 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 (**Hellal, 2010**).

I-7.3 Extraction à froid

Cette technique d'extraction est utilisée pour l'obtention des essences d'agrumes ou hespéridés : bergamote, citron, mandarine, etc. l'huile essentielle est contenue dans le zeste de la partie superficielle de l'écorce de ces fruits. Autrefois, la méthode dite (à l'écuelle) consistait à frotter le fruit, manuellement, dans un bol en bois dont l'intérieur était garni de picots. Le jus était recueilli à l'aide d'une éponge exprimé dans un récipient puis filtré. Actuellement, les fruits sont compressés à froid ; l'huile essentielle et le jus recueillis sont séparés par centrifugation. Cette méthode rapide et efficace donne une essence de bonne qualité (Beneteaud, 2011).

I-7.4. Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratique. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le Dichlorométhane et l'acétone (Kim et Lee, 2002).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (AFNOR, 2000) :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau.
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- De rétinoides ou extraits éthanolique concentrés L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organisation liée à la protection de l'environnement.

I-7.5. Extraction par CO₂ supercritique

Le CO₂ permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Il 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 (Chemat, 2004).

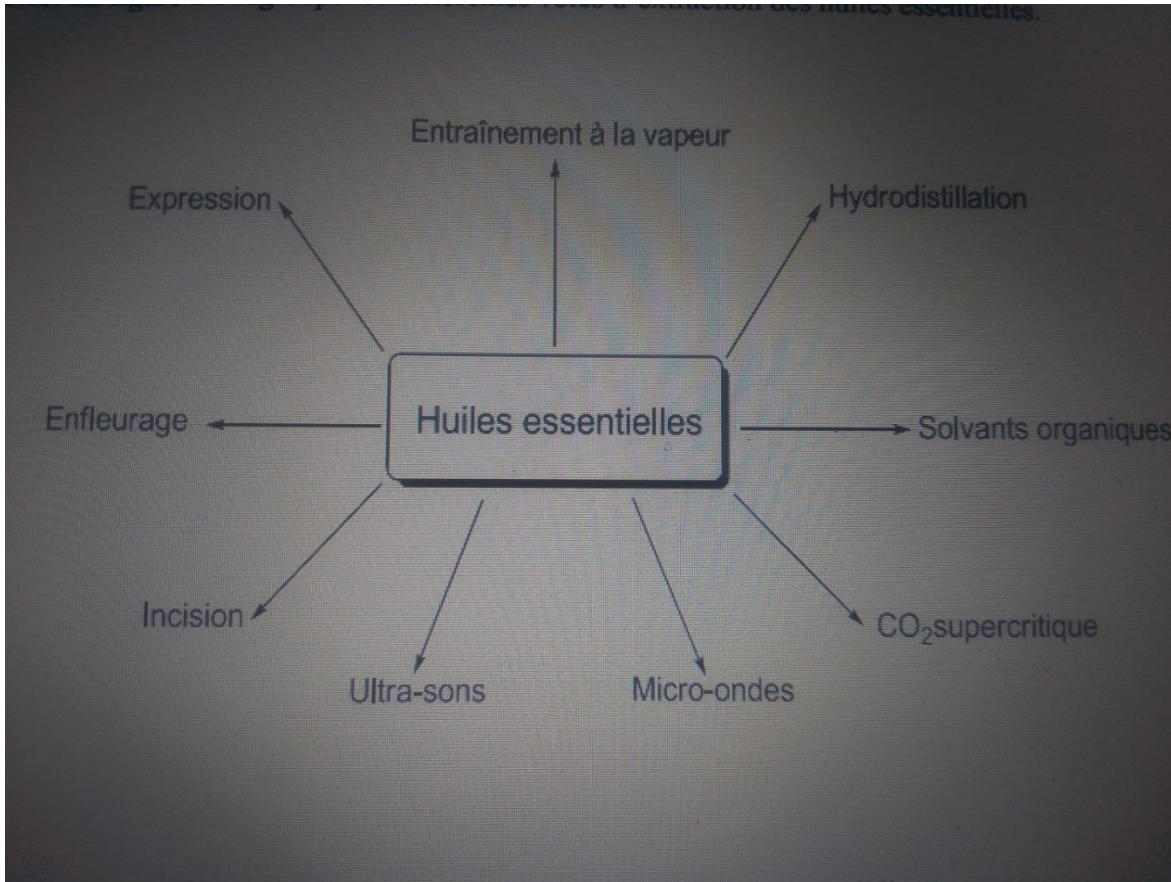


Figure 01 : le mode d'extraction des huiles essentielles.

I-8-Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées depuis les temps les plus reculés pour leurs effets thérapeutiques les plus diversifiés. La diversité moléculaire des composants qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés. (**Valnet et Phytton, 2006**).

En effet, les hydrocarbures mono terpéniques présentent des propriétés antalgiques en usage percutané, vermifuge, emménagogue, antiseptique atmosphérique, antiparasitaire, les hydrocarbures terpéniques qui présentent des effets anti-inflammatoires, calmants, hypotenseurs.

Les pouvoirs offerts par les HEs sont innombrables et variés. Il serait impossible de les mentionner tous. La mise en évidence de leur activité biologique a fait l'objet de nombreuses études. (**Bakkali et Averbek, 2008**).

I.8.1. Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Le rôle biologique des HEs dans l'écologie est évident. Par leur odeur, elles interviennent dans la pollinisation. Ainsi, elles jouent un rôle attractif ou répulsif vis-à-vis des prédateurs (herbivores, insectes...). Elles peuvent paralyser les muscles masticateurs des agresseurs par les propriétés toxiques et inappétences des substances qu'elles contiennent (**Capo et Valette, 1990**).

Elles protègent les cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons. Elles empêchent la dessiccation de la plante (perte d'eau) par évaporation excessive et protègent la plante contre la lumière soit par diminution ou concentration. Par ailleurs leurs composés interviennent dans les réactions d'oxydo-réduction, comme donneurs d'hydrogène. Par exemple l'isoprène réagit rapidement avec l'ozone et les radicaux hydroxyyles. Aussi, elles émettent l'excès de carbone et d'énergie. (**Sharkay et Sunsun 2001**).

I .8.2. Propriétés biologiques

Le spectre d'action des H.Es est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques.

En outre, certaines essences douées d'une activité antifongique s'opposent au développement des champignons, des moisissures en les détruisant (**Latloui et Tantaoui-Elaraki 1994**). Ces activités sont par Ailleurs variables d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre. (**Kalemba et Kunicka, (2003)**).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**Burt et Int, 2004**) sauf quelques exceptions, comme par exemple *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* qui ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles (**Wan, Wilcock .2005**).

Les molécules aromatiques telles que les phénols suivis par les aldéhydes puis les cétones viennent ensuite les alcools puis les éthers possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé. En général l'action de l'essence se déroule en trois étapes distinctes :

- Augmentation de la perméabilité suivie par la perte des constituants cellulaires par attaque de l'huile essentielle sur la paroi bactérienne
- Blocage de la production de l'énergie cellulaire et de la synthèse des composants de structure par acidification de l'intérieur de la cellule
- Mort de la bactérie par destruction de son matériel génétique.

I .8.3. Propriétés médicinales

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. La plupart des constituants des huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien d'où leur usage Comme antiseptiques (**Zambonelli, 1996**).

D'autres possèdent des propriétés digestives ou des propriétés Antispasmodiques, sédatives, cicatrisantes, etc...Ces activités sont dues surtout à leurs constituants terpéniques.

En outre, de nombreuses H.Es présentent une activité contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires. Elles ont la Propriété de renforcer et de relancer les défenses immunitaires de l'individu (**Wei, A 2007**). C'est dans ce sens que l'on a pu dire que les essences aromatiques étaient cytophylactiques (protectrices des cellules vivantes).

Par ailleurs, certaines H.Es présentent des activités anti-tumorales et sont adoptées dans le traitement préventif de certains types de cancers (Nigelle, Mélisse officinale) (**Mbarek, 2007**).

I .9. Toxicité des huiles essentielles

Les H.Es sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels. Néanmoins, il est important de souligner que l'automédication fréquente et abusive surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe par les essences est nocive. Elle engendre des effets secondaires plus ou moins néfastes dans l'organisme (allergies, coma, épilepsie, etc...)

Principalement chez les populations sensibles (enfants, femmes enceintes et allaitantes, personnes âgées ou allergiques) (**Degryse, 2008**).

L'accumulation des essences dans l'organisme par des prises répétées peut conduire à des nausées, des céphalées. L'ingestion de plus de 10 mL d'huile essentielle est neurotoxique et épiléptogène par inhibition de l'apport d'oxygène au niveau des tissus encéphaliques (Baudoux, 1997).

I .10. Principales propriétés physicochimiques des huiles essentielles

- ◆ Les HEs ne se dissolvent pas dans l'eau. Il faut utiliser un excipient pour leur mise en suspension dans un bain (tel un savon moussant) ou dans une tisane (miel).
- ◆ Les HEs ont, en revanche, une affinité toute particulière avec les graisses de toute nature, ainsi qu'avec l'alcool de titre élevé et la majorité des solvants organiques.
- ◆ Elles sont liquides à température ambiante pour la Plupart.
- ◆ La couleur des gouttes des HEs au sortir de leur flacon en verre teinté varie du bleu marine au rouge brunâtre, en passant par le vert et le jaune pâle.

II. Généralités sur les plantes médicinales

La majorité des plantes aromatiques et médicinales renferme des composés chimiques dotés de propriétés antioxydants. Plusieurs études qui ont été menées sur certaines plantes ont conduit au développement de formulations d'antioxydants naturels pour l'usage alimentaire, cosmétique et autres applications. Parmi ces composés naturels, les polyphénols constituent un des groupes essentiels des substances issues des plantes agissant comme neutralisant des radicaux libres et donc comme antioxydants.

II. a- La Menthe



Figure 02 : La Menthe verte.

II.a-1. Position systématique

Plusieurs propositions de positions systématique existent dans le monde, nous en présentons à titre d'exemple celle de **Bachman (2007)** ci-dessous :

Domaine Eukaryota

Sous-domaine Bikonta

Règne Plantae

Division Magnoliophyta

Classe Magnoliopsida

Ordre Lamiales

Famille Lamiaceae

Genre *Mentha* L., 1753

II.a.2. Description

La menthe verte a pour nom latin *Mentha spicata* Huds ou *M. viridis* L., et de nom vulgaire (Naânaâ). C'est une plante vivace, robuste, de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave

Très pénétrante. Les feuilles sont opposées persistantes, sessiles, lancéolées-aiguës, dentées en scie, vertes sur les 2 faces, glabres ou presque glabres. Les fleurs poussent en grappe à l'aisselle de la feuille. La fleur présente une bractée qui dépasse les pièces florales.

La Menthe verte est réputée pour soigner de nombreux troubles dont les plus courants : affections dermatologiques, troubles digestifs variés, spasmes du colon, colites, troubles fonctionnels digestifs d'origine hépatique, rhume, nez bouché, affections de la bouche et de l'oropharynx et bien plus encore. La menthe verte est aussi utilisée en agroalimentaire dans différents produits du quotidien, comme par exemple les chocolats à la menthe, les dentifrices et lotions pour bain de bouche, ou encore dans certaines liqueurs. On l'utilise principalement car elle contient du menthol qui donne une sensation de fraîcheur (**Douay 2008**).

De nombreux travaux ont fait l'objet d'étude de l'huile essentielle de *M. spicata* ou leurs compositions chimiques étaient dominées par la présence de la carvone (> 50%) dans la majorité des études à l'exception de quelques travaux qui étaient marqués par la présence du menthol, pulégone et menthone (**Zhao et al., 2013**).

II.a.3. Utilisation des menthes pour la santé

Les menthes sont parmi les herbes les plus populaires qui ont été utilisées pour leurs propriétés médicinales et en aromathérapie depuis l'antiquité. La menthe est mentionnée dans la pharmacopée islandaise depuis le 13^{ème} siècle. Sa culture est aussi rapportée en Chine durant la dynastie de Ming (**1368-1644**) (**Dai, 1981**). En 1721, *M x piperita* devient l'article officiel de Matériel Médical dans la pharmacopée londonienne sous le nom de *Mentha piperitis* sapore (**Fluckiger et Hanbury, 1879**). En Europe, elle demeure d'un usage général comme médecine au milieu du 18^{ème} siècle (**Grieve, 1931, Kumar et al., 2011**).

Plusieurs utilisations thérapeutiques des espèces du genre *Mentha* sont listées. Des expériences, in-vivo, sur des rats ont démontré l'activité analgésique des huiles essentielles et extraits alcooliques de menthes. Les extraits de *M. arvensis* L. et *M. spicata* L., par exemple, réduisent les contorsions (**Yousuf et al. 2013 ; Biswas et al. 2014**).

La saveur de la menthe verte est principalement basée sur le carvone, dihydrocarvone, carveol, dihydrocarveol, carvyl et dihydrocarvyl esters, et à degré moindre au limonène.

Le carvone est d'un intérêt particulier parce qu'il existe sous deux formes énantiomériques avec deux propriétés aromatiques distinctes. (**Parker et al., 2015**).

II.a.4. Toxicité

La L-carvone, bien qu'elle soit une cétone mono terpénique, fait partie de ces molécules les moins délicates à employer, équivalent à la verbénone en termes de potentiel toxique. Sa toxicité par voie orale est assez faible, plus faible encore par les voies cutanée, rectale et vaginale. Pour preuve, l'huile essentielle de menthe verte n'est pas inscrite sur la fameuse liste qui recense une poignée d'huiles essentielles placées sous monopole pharmaceutique (armoïse vulgaire, absinthe, sauge officinale, hysope officinale, etc.). Voici maintenant dans quels cas précis il est préférable de ne pas employer cette huile essentielle :

Règles trop abondantes ; antécédent neurologique (épilepsie) ; on évitera cette huile essentielle chez l'enfant de moins de 7 ans et durant les trois premiers mois de grossesse (la grosse fraction de cétones monoterpéniques contenue dans cette huile essentielle rappelle, en général, le caractère neurotoxique et potentiellement abortif des huiles essentielles qui en contiennent) (**François-Joseph Cazin 2004**).

II. b- Le Girofle



Figure 03 : Clous de girofle.

II.b.1. Position systématique

La classification est Selon (Sophie B 2015)

Règne plantae

Classe Angiosperme

Sous-classe Tiporées

Ordre Myrtales

Famille Myrtaceae

Genre *Syzygium*

Espèce *Syzygium aromaticum*

II.b-2. description

Le Giroflier est un arbre tropical appartenant à la grande famille des Myrtacées, originaire d'Indonésie, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du sud, principalement dans des pays tropicaux. (Eric Penot *et al.*, 2014).

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'égriffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, les clous et griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau. (Richard et Loo, 1992).

II.b.3. Utilisation de Girofle

Syzygium aromaticum est un anesthésiant local, notamment pour les douleurs dentaires. Il soulage les douleurs musculaires, les rhumatismes et il a des propriétés anti-inflammatoires, redonne de l'énergie et permet de lutter contre la fatigue. C'est également un antidépresseur. Le clou de girofle est connu dans les écrits ayurvédiques, où il est utilisé contre les douleurs, la sciatique, les problèmes rhumatologiques comme antibactérien et antifongique et anesthésiant local dans le soin des plaies et dans les odontalgies. (Barbelet, 2015).

II.b. 4. Toxicité

L'usage abusif du Clou de Girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Le Clou de Girofle peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques, des colites ou le syndrome du côlon irritable. Dans les surdoses, les clous de girofle peuvent aussi causer des vomissements, des nausées, la diarrhée et de fortes hémorragies digestives et peut également conduire à l'insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique la dyspnée, la perte de conscience, des hallucinations et même la mort. (Journal MIDI LIBRE 2009).

Plusieurs études pharmacologiques ont confirmé que les plantes médicinales présentent un large éventail d'activités biologiques et que les espèces végétales peuvent contenir une gamme diversifiée de molécules bioactives responsables d'une collection de propriétés médicinales (Polya, 2013).

III .1. Activité antioxydante

Certains constituants des huiles essentielles présentent un antioxydant très marqué et sont aujourd'hui commercialisés : c'est le cas de l'eugénol, du thymol, du carvacol...etc.

Les résultats déjà publiés montrent que les essentielles constituent une bonne source d'antioxydants naturels rechargés pour leur innocuité relative (Burits et Bucar, 2000 ; Canda *et al.*, 2003 ; Tepe *et al.*, 2005).

Cette activité antioxydante est également attribuée à certains alcools, éther, cétones et aldéhydes monoterpéniques : le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/nérol. (Jukic et Milos, 2005) avec un effet plus élevé enregistré pour les hémotypes phénoliques.

III .2. Activités antimicrobienne

Les vertus antimicrobiennes des HE sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se base sur des pratiques traditionnelles (Halal *et al.*, 2000) et des applications sans bases scientifiques précises. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (Bouhadid, 2006), et qu'en 1991 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin.

De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des HEs des plantes aromatiques (Cox *et al.*, 2000 ; Ettatyebi *et al.*, 2000).

III .3. Activité acaricide

La Menthe et le girofle sont des plantes bien utilisées pour le varroa, est une maladie parasitaire pathologique majeure en apiculture, sa contagiosité et ses effets en font un véritable fléau. Une maladie réglementée, est classée, et se trouve également sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (Oie, 2013).

Le thymol est toxique pour varroa à tous les stades de son développement : les œufs, les larves les nymphes et les adultes (**Doremon *et al.*, 2009**).

Des études réalisées par (**Lamara, 2012 ; Boutoba, 2013**) repose sur l'utilisation d'un traitement biologique à base d'huiles essentielles de thymus contre le varroa destructeur parasite (*Apise Mellifica*) avec des dosages variables et en fonction de mode d'utilisation montrent que la dose de 3%entraîne un taux de mortalité maximal de 28%, par rapport aux autres doses (1%,3%,5%) pendant la période hivernale.

L'utilisation des plantes médicinales locale est la méthode la plus utilisée chez les petits éleveurs tandis que l'application courante des acaricides de synthèse est la méthode la plus utilisée dans les systèmes de production intensifs pour combattre les ectoparasites (**Lhoste *et al.*, 1993**) Cependant, les conséquences sur l'homme et son environnement, la présence des souches d'acariens aux acaricides ainsi que la rareté et le cout élevé des produits de bonne qualité sur les marchés locaux posent le problème de la recherche solutions alternatives (**Whatson, 1976**).

III.4. Autres activités

III. 4.1. Industrie alimentaire

Les épices et leurs HEs sont utilisés depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour empêcher le développement des contaminants alimentaire (**Bouchra, 2003, Bouhdid 2006**). Plusieurs travaux ont montré que les HE de thym, cannelle, d'origan, clou de girofle, et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la tonogenèse de plusieurs bactérie et champignons Responsables d'infections alimentaires ceci est dû la présence ces dernières de composées ayant des propriétés antimicrobiennes et anti oxydants (**Dimitrijevir, 2007**).

III. 4.2. Désinfection des locaux

Grace à leur pouvoir antiseptique, les HEs peuvent permettre d'assainir l'air ambient ou les systèmes de ventilation, notamment dans le milieu hospitalier, entrainant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air et limiter ainsi la propagation des germes microbiens (**Billerbeck, 2007**).

III. 4.3. Activités pharmacologiques

Depuis longtemps, les HEs sont utilisés en thérapeutiques. Les applications thérapeutiques des HEs sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain (**Soto-Mendivil, 2006**). L'usage des HEs en médecine n'a jamais été abandonné malgré la découverte de processus. De synthés organiques et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (**Ouraini et al., 2007**) de nombreuses trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produit pharmaceutiques : la verveine, le thym, la menthe et autre plantes. Elles ont une action anti-inflammatoire, antiseptique, désodorisante, insecticide et antioxydants (**Domaracky et al., 2007**).



Partie Pratique



I- Matériel et méthodes

I.1. Objectif

La présente étude vise à :

- Réaliser l'extraction des huiles du *Syzygium aromaticum* (clous de girofle) et la Menthe verte par la méthode d'hydrodistillation.
- Calculer le rendement de l'huile essentielle du mélange de *Syzygium aromaticum* et la menthe.
- Evaluer l'activité antibactérienne de cette huile essentielle à différentes concentrations sur quatre germes pathogènes *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella*.
- Evaluer l'activité antifongique du mélange des huiles essentielles sur des souches de *penicillium sp* et de la levure.
- Evaluer l'activité antioxydante du mélange des huiles essentielles.

I.2. Présentation du lieu de l'étude expérimentale

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie **l'université Abbés Laghrour Khenchela** pendant le mois de Juin 2021.

I.3. Matériel et méthodes expérimentales

I.3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal constitué de clou de girofle *Syzygium aromaticum* est importé de l'Indonésie et est disponible dans le marché tout au long de l'année, pour son importance dans La tradition culinaire algérienne ainsi que son utilisation dans la médecine traditionnelle avec la menthe verte (*Mentha spicata*).



Figure 04 : Menthe verte (matière sèche).

I.3.2. Matériel microbien

Les quatre souches bactériennes choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections. Ces souches nous l'avons trouvé disponible dans le laboratoire. Ces souches bactériennes cliniques sont représentées par : *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella*

Le choix des souches à tester est basé sur le caractère pathogénique, sur les études déjà réalisées et sur leur disponibilité au niveau du laboratoire.

Pour la souche fongique, notre étude est réalisée sur la souche *penicillium sp* et la levure.

I.3.3. Milieux de culture

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation des milieux suivants : la gélose Mueller Hinton (MH). La culture de la souche fongique est cependant réalisée sur Le PDA.

I.4. Méthodes expérimentales

I.4.1. Extraction des huiles essentielle de *Syzygium aromaticum* et de *Mentha spicata* par hydrodistillation

Le moyen le plus approprié pour extraire l'huile essentielle est la distillation à la vapeur d'eau, produite par un générateur, traverse la plante, chargée des précieuses molécules, elle est ensuite ramenée à l'état liquide par réfrigération. Le mélange d'eau et l'huile essentielle est recueilli dans un Erlenmeyer ou il va subir un relargage, une décantation et un séchage.

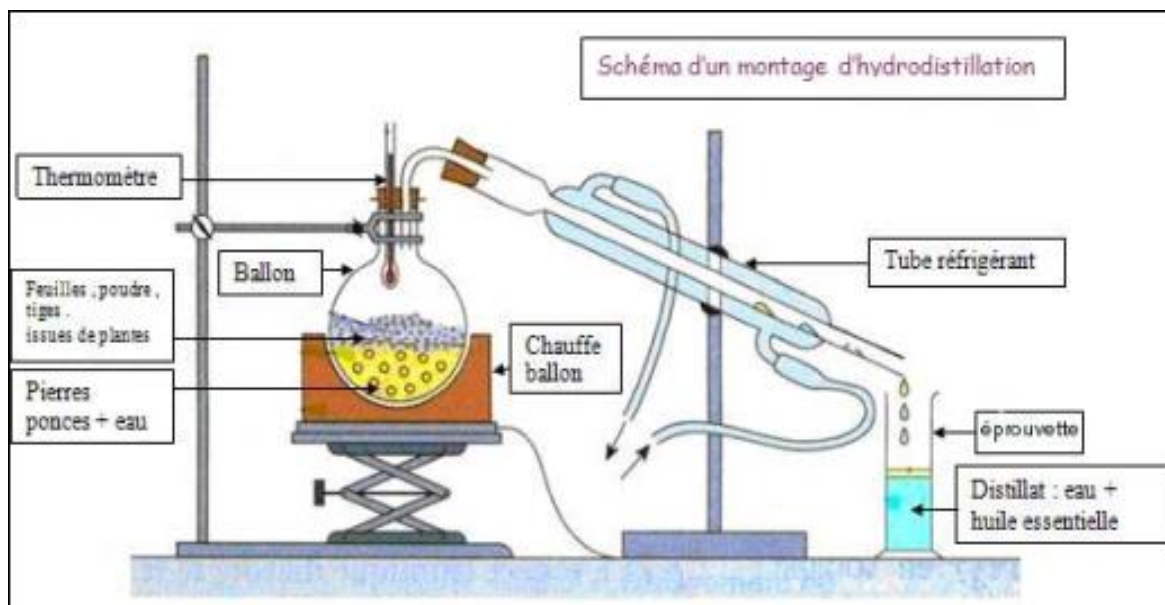


Figure05. Schéma d'un montage d'hydrodistillation.



Figure 06 : le Clevenger utilisé dans l'extraction des huiles essentielles.

I.4.1.1. Chauffage

L'opération a consisté à introduire 200 g de masse végétale séchée (100g Girofle et 100g de la menthe) dans un ballon Bicol de 1000 mL en verre, à laquelle on a ajouté une quantité suffisante d'eau distillée environ 500 ml sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements lors de l'ébullition. On ajoute dans le bouilleur, quelques grains de pierre ponce pour éviter toutes formations de la mousse. Après la fermeture du montage et mise en marche de chauffe ballon, nous réglons la température à 100°C, en s'assurant que cette dernière est maintenue dans la vapeur condensée en tête de colonne et au fond du bouilleur

grâce à un thermomètre. Cette opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.

Il est en général formé de 2 liquides non miscibles encore appelés phase, la phase aqueuse, la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes, la phase organique représentée essentiellement par l'huile essentielle qui est constituée des espèces odorantes.

I.4.1.2. Relargage

La phase organique contient les plus grandes parties des composés odorants et la phase aqueuse en contient un peu moins. Afin de récupérer les molécules odorantes dissoutes dans le distillat, on réalise un relargage.

Pour cela, on utilise un sel afin de récupérer cette huile, c'est le chlorure de sodium Na Cl. Par la suite, le mélange est placé sous un agitateur jusqu'à dissolution.

L'ajout du chlorure de sodium favorise la séparation des 2 phases.

I.4.1.3. Décantation

Le mélange précédant est laissé reposer, pendant quelques minutes, la phase organique, à densité faible, surnagera sur la phase aqueuse, cette dernière est recueillie en premier dans un bêcher, pour pouvoir ensuite récupérer l'huile dans un autre bêcher.



Figure 07 : La décantation des huiles essentielles.

I.5. Calcul du rendement

Le rendement en l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement est calculé comme suit :

RHE : Rendement en huile essentielle du mélange.

M1 : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme

M0 : Masse de girofle et menthe broyés en gramme.

$$RHE = (M1/M0) \times 100$$

I.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne du mélange des huiles essentielles

Les tests de l'activité antibactérienne sont réalisés en deux étapes au niveau du laboratoire de la biologie d'Abbes Laghrour - Khenchela.

I.7. Choix des souches

Les bactéries utilisées sont des isolats cliniques, bactéries isolées à partir de divers prélèvements de malades : coproculture, urine abcès, pus, hémoculture, plaie, liquide céphalo-rachidien (LCR), sonde vésicale et urinaire : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *klebsiella*.

Tableau 01 : Liste des bactéries testées.

Bactéries à Gram négatif	Bactéries à Gram positif
<i>Escherichia coli</i> (ATCC) (American type culture collection)	<i>Staphylococcus aureus</i> (souche clinique isolée de patients hospitalisés)
<i>Klebsiella sp</i> (souche clinique isolée de patients hospitalisés)	<i>Bacillus subtilis</i> (souche commercial et clinique isolée de patients hospitalisés)

I.8. Milieu de culture

Une gélose Muller – Hinton a été utilisée pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

I.8.1. Stérilisation des matériels

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 30 minutes.

I.9. Les étapes de l'activité antibactérienne

I.9.1. Le ré-isolément des souches bactériennes

A l'aide d'une pipette pasteur ou anse de platine on prend une colonie, et on le met dans les boîtes de pétri.

Mettre dans l'étuve pour incubation pendant 24h à 37°C.

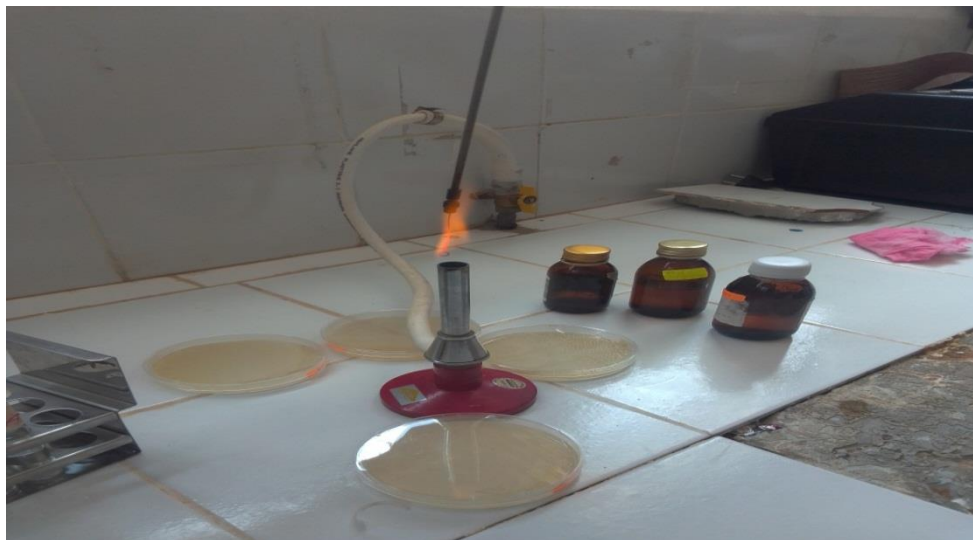


Figure 08 : la stérilisation de la spatule.



Figure 09 : Le repiquage des souches bactériennes.

I.9.2. Préparation de l'inoculum

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes on a préparé des suspensions pour chaque espèce étudiée. A l'aide d'une pipette pasteur, on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérilisée. L'enrichissement est de 2 à 3 heures.



Figure 10 : Préparation des bactéries dans l'eau physiologie.

I.9. 3. L'ensemencement

Sur des boites contenant le milieu gélosé d'une épaisseur de 2 mm bien sèches, on introduit de 3 à 5 ml de l'inoculum, on obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe.

I.9.4. Préparation des disques d'aromatogramme

Les disques sont fabriqués à partir de papier filtre avec un diamètre de 5.5 mm, l'huile essentielle est diluée dans DMSO, on a préparé trois dilution de notre l'huile essentielle.

- Solution mère : (huiles essentiel de mélange).
- Dilution 1 : 90 μ L de DMSO et ajouter 10 μ L de l'huile essentielle.
- Dilution 2 : 90 μ L de DMSO et ajouter 10 μ L de dilution 1.
- Dilution 3 : 90 μ L de DMSO et ajouter 10 μ L de dilution 2

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque extrait sont disposés sur la surface de la gélose pendant ½ h dans une étuve réglée à une température de 37°C.

I.9.5. Incubation et lecture

Pendant 18 à 24 heures à 37°C, pour toutes les boîtes, et à température ambiante (température de la chambre). Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition.

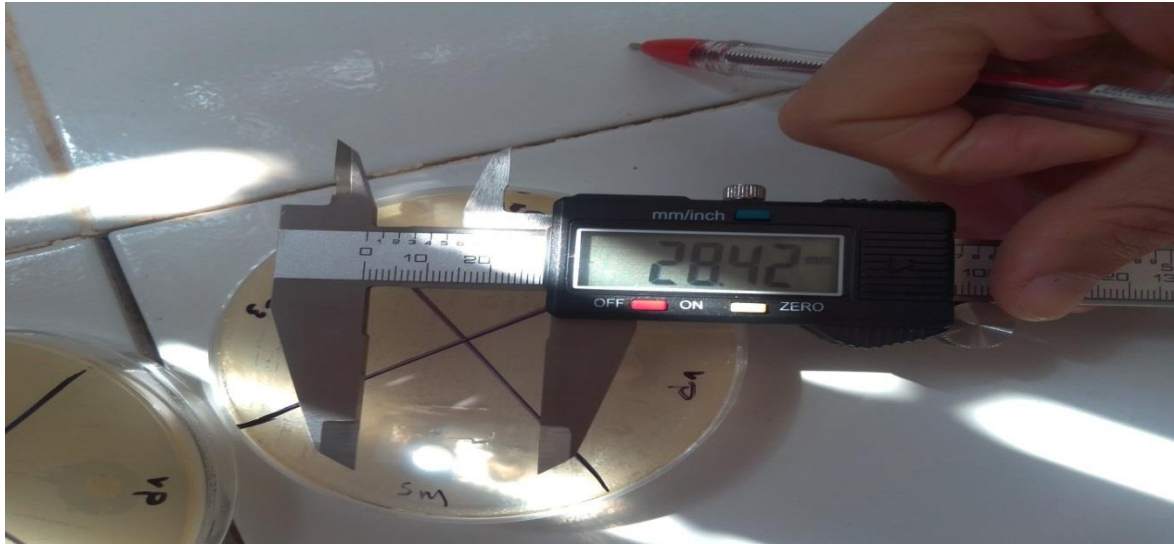


Figure 14 : Mesure des halos d'inhibition.

I.9.6. Evaluation de l'activité antifongique

En ce qui concerne le champignon, des suspensions de cellules fongiques de *penicillium sp* préparée à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile.

Ces suspensions servent à ensemercer au milieu Des disques de papiers filtre de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de PDAensemencée après avoir été chargé de 10 μ L d'huile essentielle diluée.

- Solution mère (mélange des huiles essentielles).
- Dilution 1 : 90 μ L de DMSO et ajouté 10 μ L de l'huile essentielle.
- Dilution 2 : 90 μ L de DMSO et ajouté 10 μ L de dilution 1.
- Dilution 3 : 90 μ L de DMSO et ajouté 10 μ L de dilution 2.
- L'incubation des champignons se fait à une température de 25°C pendant 72 heures, alors que celle des levures se fait à 25 °C pendant 48 heures.

I.10. Activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements de retarder la peroxydation lipidique (une réaction qui peut être accélérée par plusieurs paramètres comme la présence de radicaux libres oxygénés (RLO), une température élevée, la présence de lumière solaire ou bien encore la trace de métaux de transition), Afin d'utiliser les HE en tant qu'antioxydants alimentaires, il convient d'évaluer l'efficacité anti oxydante de ces dernières, afin de limiter leurs ajout aux doses strictement indispensables aux objectifs de préservation à atteindre .

Selon le protocole décrit par **Mansouri *et al* (2005)**, avec des légères modifications qu'on a apportées, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100 mL de méthanol. Des solutions à différentes concentrations de l'huile essentielle et de l'extrait d'hydrolat ou standard (BHT) sont ajoutées à un volume complémentaire de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm.

-L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

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

Préparation de solution DPPH : 0.00140g de DPPH + 35 ml de méthanol.

Tableau 02 : Préparation de la concentration (les dilutions d'HE)

Les concentrations	Volume de mélange de l'HE (µL)	Volume du méthanol (µL)
3	240	0
2	160	80
1.5	120	120
1	100	140
0.25	20	220

- Les échantillons : 50 μ L du mélange de HE + 650 μ L de DPPH.
- Le Blanc : 50 μ L du mélange de HE + 650 μ L de méthanol.
- Agitation des tubes dans un vortex + incubation 30 min,
- Le contrôle : coloration jaune

II.1. Description de l'huile essentielle

II.1.1. Le rendement

Le rendement de l'HE extraite par l'hydro distillation à l'échelle de laboratoire à partir du mélange des deux plantes la Menthe verte et le Girofle (Tableau 3).

Tableau 03 : Le rendement des huiles essentielles.

Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
200	4.87	2.43

II.1.2. Lecture de l'activité antimicrobienne

La lecture se fait après 18 à 24 h d'incubation à 37° C. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition de la croissance microbienne. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en mm incluant le diamètre du disque. Cette sensibilité est classée selon (**Ponce et al., (2003)**) comme suit :

- Non sensible pour un diamètre inférieur à 8 mm.
- Sensible pour un diamètre de 9-14 mm.
- Très sensible pour un diamètre de 15-19 mm.
- Extrêmement sensible pour diamètre supérieur à 20 mm.

II.1.2.1. Expressions des résultats

- **Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne des différents extraits a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La méthode de disque a permis de déterminer l'action des extraits sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'extrait, comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4. On constate les résultats de l'activité en calculant la moyenne des diamètres des zones d'inhibitions du test de sensibilité à l'HE.

Tableau 04 : Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne

Les souches	Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne			
	SM	D1	D2	D3
<i>Bacillus subtilis</i>	26.53 (+++)	12.83 (+)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18.11 (++)	9.17 (+)	5.24 (-)	0
<i>Klebsiella</i>	14.74 (++)	12.63 (+)	5.69 (-)	2.57 (-)
<i>Escherichia coli</i>	19.19 (++)	15.43 (++)	11.05 (+)	3.44 (-)

Les diamètres : $D < 8\text{mm}$, $9 \leq D \leq 14\text{mm}$, $15 \leq D \leq 19\text{mm}$, $D > 20\text{mm}$ est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensibles (+++).

Le zéro (0) indique pas d'activité.

Les résultats obtenus illustrés dans le tableau 04, indiquent que l'effet antibactérien du mélange des huiles essentielles du Girofle et de la Menthe est varié d'une souche à une autre.

Dans les solutions mères, nous avons remarqué que le diamètre de la zone d'inhibition est important pour chacune des quatre souches bactériennes, et elles sont à des niveaux différents d'extrêmement sensible à très sensibles ($Bs > EC > SA > Kp$).

Dans les solutions de la première dilution (D1), les résultats enregistrés ont indiqué une diminution des diamètres des zones d'inhibitions par rapport aux ceux des solutions mères, ils varient de sensibles à très sensibles ($EC > Bs > Kp > SA$).

Concernant les solutions de la deuxième dilution (D2), les résultats observés démontrent une diminution très importante des diamètres des zones d'inhibitions pour chaque type de

bactéries. Nous avons noté dans aucune activité des *Bs*. Par contre, les deux souches bactériennes *Sa* et *Kp* sont résistantes. Les résultats pour cette dilution ont classé la souche de l'*EC* comme sensible.

Les résultats obtenus de la dernière dilution (D3) ont montré un manque d'activité antimicrobienne dans deux types de bactéries *Bs* et *Sa*, tandis que les deux autres types *EC* et *Kp* sont résistantes.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bouhadoudda, (2015)**, qui ont montré que l'huile essentielle de la Menthe a un effet sur *Bacillus subtilis*.

Toutefois, contrairement à nos résultats obtenus (diamètre = 19,19mm), **Bouhadoudda (2015)** a trouvé un effet sur *Escherichia coli*.

Cela est peut-être attribué principalement aux constituants majoritaires des bactéries et ces composants qui ne retrouvent pas ou se retrouve en concentrations faibles. Aussi, l'activité des huiles essentielles est plus importante contre les bactéries à Gram négatif et moins importante contre celles à Gram positif.

Nos résultats corroborent avec ceux de **Marzouk et al. (2006)** qui ont trouvé que les bactéries Gram - sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram +.

Cependant, **Cosentino et al. (1999)** ont trouvé que les bactéries Gram - sont plus résistantes aux huiles essentielles que les bactéries Gram +.

Le mélange des huiles essentielles a montré une activité inhibitrice plus élevée sur les bactéries testées *Staphylococcus aureus*. Cela s'est avérée que les bactéries Gram + sont plus résistantes que les bactéries à Gram - (*Escherichia coli* et *Klebsiella sp*).

En fait, les résultats enregistrés ont prouvé que la concentration de l'huile essentielle a une relation avec les zones d'inhibitions, plus la concentration est élevée, plus la zone d'inhibition est grande.

En effet, l'utilisation du DMSO sans dilution peut avoir un effet négatif sur l'activité des huiles essentielles. (**Guinoiseau et al., 2013**).

Pour conclure, on peut dire que l'activité antibactérienne trouvée est suffisamment importante pour permettre l'utilisation de ces plantes comme nouvelle source d'antibiotique dans divers domaines à savoir en pharmacie, cosmétologie et industries agroalimentaires.

- **Activité antifongique**

L'objectif de cette manœuvre est de tester *in vitro* l'activité antifongique d'un mélange des huiles essentielles. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 05** et **figure 11**.

Tableau 05 : Diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique.

	Diamètres des zones d'inhibition de croissance			
	SM	D1	D2	D3
<i>Penicillium sp</i>	9.94	8.99	2.1	1
Levure	9.03	9	3.02	0



Figure 11 : Le diamètre de la zone d'inhibition de l'activité antifongique.

Les résultats des diamètres de la zone d'inhibition (en mm) sont obtenus par la méthode des puits. Nous avons constaté un effet inhibiteur de l'HE utilisée avec la solution mère (HE pure) et la plus grande dilution (D1). Dans ces deux concentrations, l'HE inhibe totalement la croissance de souches sur les espèces de levure et de champignons (*penicillium sp*).

On peut noter une augmentation du pouvoir inhibiteur des HEs d'une manière proportionnelle lorsque nous avons augmenté la charge des puits.

Les résultats obtenus dans cette étude corroborent avec ceux trouvés dans de nombreux travaux. **Chalchat et al., (1997)** constatent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimique notamment de leurs constituants majeurs par l'étude du pouvoir antifongique de 13 huiles essentielles.

Janssen et al. (1988) : dix huiles essentielles ont manifestées des propriétés inhibitrices très remarquables. Ces huiles sont celles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amer, de marjolaine, du piment, livèche et de la noix de muscade.

En effet, l'effet antifongique des HEs est le sujet de plusieurs études scientifiques *in vitro*. Cependant, les méthodes utilisées pour évaluer cette activité sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents.

Le mélange des HEs testé a présenté un fort pouvoir antifongique et une activité inhibitrice significative sur la croissance des levures et des champignons testés, et pourraient donc constituer une solution alternative intéressante dans les traitements antifongiques.

II .1.3. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'extrait de la plante a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, dans le but de déterminer les concentrations d'inhibition du radical DPPH.

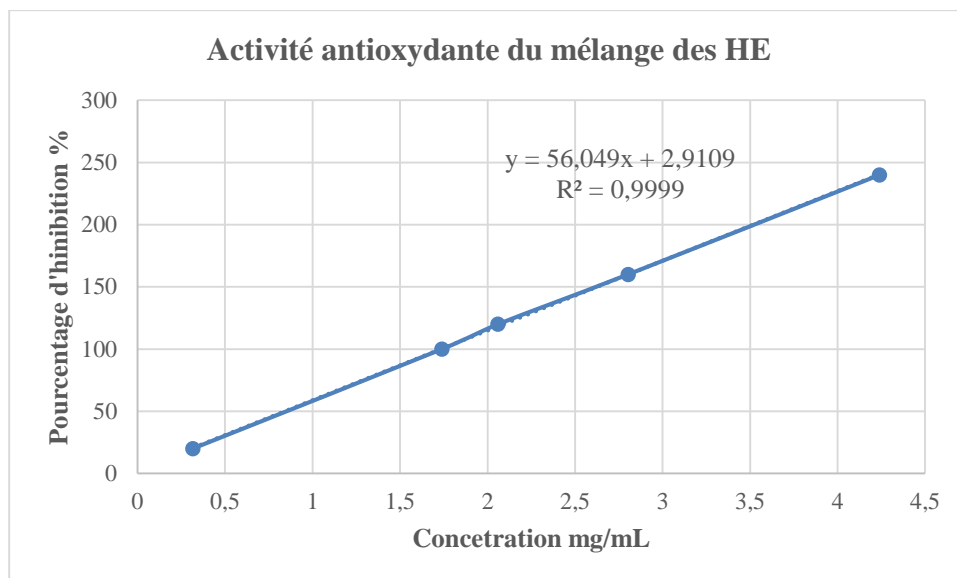


Figure 12 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes Concentrations du mélange de l'HE.

Tableau06 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dans le mélange des HEs.

Concentration (mg/mL)	Pourcentage d'inhibition
3	171,05
2	115
1,5	86,98
1	58,95
0,25	16,92

D'après le tableau ci-dessus, qui représente les différents pourcentages d'inhibitions, on constate qu'à la plus grande concentration (3 mg/ml) du mélange des HEs, nous avons trouvé le IP%=171,05. Pour la concentration dans un spectrophotomètre ($\lambda=517$ nm).

-L'évaluation préliminaire de l'activité antioxydant des échantillons a été réalisée en utilisant la méthode du radical stable **2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**, qui a été initialement

développée par **Blois (1958)**. Le DPPH, de couleur violette en solution. Tous les tests ont été réalisés avec trois répétitions pour chaque concentration.

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le Protocole décrit par **Lopes-Lutz et al., (2008)**,

Courbe d'étalonnage de la solution DPPH :

Une évaluation de la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH ont été évalués et les résultats sont présentés sur le graphique ci-dessous. Cinq solutions du DPPH de concentration (3, 2,1, 1.5, 0.25) à base du Méthanol ont été testées.

Les absorbances à concentration 0 et à 3 ont été mesurés à 517 nm, on observe qu'il n'y a pas de différence significative dans l'absorbance entre 0 et 3 pour les concentrations testées et une très bonne linéarité de l'absorbance en fonction de la concentration.

A partir de la courbe, nous avons remarqué que plus la concentration est élevée, plus que le pourcentage d'inhibition est élevé donc le mélange des huiles essentielles de la menthe et du girofle a une activité forte dans les concentrations élevées. Dont les propriétés oxydoréducteurs leurs permettent d'agir comme les agents réducteurs.

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité d'huile a donné un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (**Oyaiza, 1986 ; Soares et al., 1997**). Pour la détermination du pourcentage d'inhibition, nous avons suivi la méthode de **Khoudali et al., 2014**. L'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs test}/\text{Abs contrôle})] \times 100$$

Abs test : absorbance de l'échantillon.

Abs contrôle : absorbance contrôle négatif.

Tous les essais ont été effectués en triple

L'effet antioxydant en piégeant le radical DPPH est attribué soit à la capacité de libération d'hydrogène ou au transfert d'électrons par les composés antioxydants et source puissante d'antioxydantes (**Popovici et al., 2009 ; Ghasemi et al., 2014**).

L'étude de l'activité antioxydant des HEs selon la méthode de Piégeage du radical libre DPPH a montré que tous les huiles étudiées possèdent une activité antioxydant modérée et que l'HE du mélange menthe-girofle a une forte activité.



Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant sur l'étude des huiles essentielles utilisées localement comme traitement traditionnel, pour des fins médicales et pharmacologiques d'où les plantes médicinales restent toujours une source fiable de principes actifs. Dans ce contexte s'inscrit ce travail qui avait pour objectif l'évaluation de quelques activités biologiques d'un mélange des huiles essentielles du Girofle et de la Menthe verte

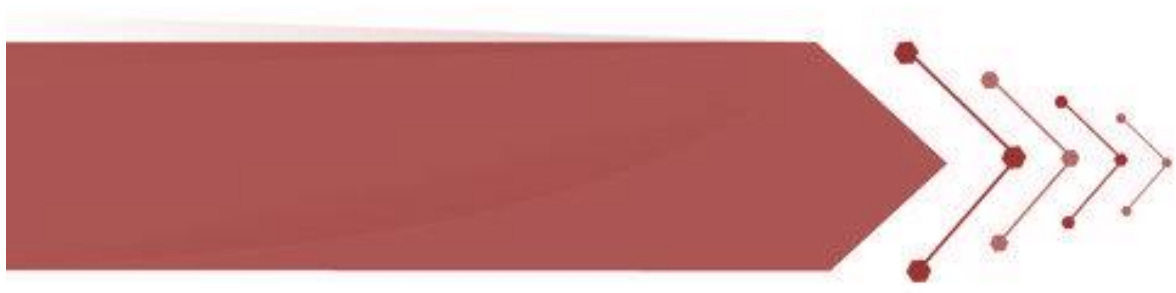
L'extraction des HEs a été réalisé par l'hydrodistillation de type Clevenger. Le rendement obtenu est de 2,43%.

L'étude de l'activité antibactérienne par la méthode de la diffusion de disque, le mélange de l'HE a une activité importante pour toutes les souches étudiées essentiellement avec les plus fortes doses utilisées. En ce qui concerne l'étude *in vitro* du pouvoir antioxydant via l'effet scavenger du radical DPPH, les résultats obtenus ont révélé un fort pouvoir antioxydant des deux fractions dont l'oxydation du DPPH est efficacement inhibée par ce mélange de HE. Du même, les résultats ont montré une activité antimicrobienne très intéressante contre les deux souches testées.

En fin, par ce travail nous espérons apporter notre modeste contribution à la valorisation des huiles essentielles. Il serait donc intéressant d'enrichir ce travail en isolant et caractérisant les composés actifs dans nos fractions par l'HPLC et la RMN en vue d'identifier les principes actifs responsables des différentes activités biologiques de cette HE. L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités recherchées.



Références bibliographiques



Références bibliographiques

-A-

-**Afnor (2000)**. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1et 2).

- **Anton et Lobstein (2005)**. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.

-B-

-**Bakkali, Averbeck, Averbeck, Idaomar (2008)**. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475
Capo, M. Couilleau, V. Valnet, C. « Chimie des couleurs et des odeurs cultures et techniques », 1990, 204.

-**Barbalet. (2015)**. Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Mémoire de fin d'étude Pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de LORRAINE.

-**Baudoux, (1997)**. « Aroma News », Lettre d'information de N.A.R.D. Natural Aromatherapy Research and Development, Belgique, S. Douay. Monographie de la menthe verte.

- **Belaiche. (1991)**. Encyclopédie des médecines naturelles. Section C –Aromathérapie.

-**Beneteaud. (2011)**. Comité français du parfum.

-**Billerbeck. (2008)**. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Phytothérapies, 5(5), 249-253.

-**Biswas, Saha, Khadem Ali. (2014)**. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of Mentha arvensisL. Asian Pac J Trop Biomed.4(10) : 792-797.

- **Bouchra, Achouri, Hassani, Et Hmamouchi, (2003)**. « Chemical Composition And Antifungal Activity Of Essential Oils Of Seven Moroccan Labiatae Against Botrytid Cinereapers»: Fr-Journal Of Ethno Pharmacology; Vol 89: 165-169.

- **Bouhdid, Idaomar, Zhiri, Baudoux, Skali et Abrini, (2006)**. Thymus essential oils: Chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities Boutoba.. Effet Acaricide d'huile de thymus Vulgaris sur le varroa jacobsoni : 25-44.
- **Bouhaddouda (2015)**. Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : Origanum vulgare et Mentha, thèse de doctorat en biochimie, sous la direction de Aouadi, Université Badji Mokhtar –Annaba.
- Bruneton. (1993)**. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, (2ème édition). Technique documentation, Paris. 406, 410,915.
- Bruneton, (1999)**. « Pharmacognosie », Plantes médicinales, Ed. Lavoisier, Techniques et Documentation, Paris, 405 ; b) Da Cruz-Cabral, L.Fernandez-Pinto, V. Patriarca, A. Int J Food Microbiol. 2013, 166, 1-14.
- **Buchmann. (2007)**. The ecology of oil flowers and their bees. Ann. Rev.Ecol. Syst. 18, 343–369.
- Burits & Bucar. (2000)**. Antioxidant Activity Of Nigella Sativa Essential Oils. Phytotherapy Research, 14, 323-328.
- Burt, Int. (2004)**. Food Microbiol. 94: 223-253.
- Blois, (1958)**. Antioxidant determinations by the use of a stable Free radical. Nature, 181 : 1199-1200.
- Bourgoud et al, (2001) Grysole, (Kar, 2007);Edrissi**, these de troisième cycle ;étude des huiles essentielles de quelques espèces salivia, Lavandula et Mentha du Maroc,1982,18-22.
- C-
- Chalchat ,Carry ,Menut ,Lamaty And Chopineau J. (1997)** Corrélation Between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. J. Essent. Oil Res., 9: 67-75.
- Chemat, Lagha, Ait Amar , Bartels et Chemat . (2004)**. Comparison Of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone Chromatography.98, 31-47. Labiateac family .Paper presented at. VII international congress of essential oils (Cannes), 118-123. Congrès International de biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai 2006.

-**Capo, Courilleau et Valette, (1990)**. Les huiles essentielles en tant que bio pesticides. 30 - Chimie des couleurs et des odeurs.

- **Cosentino, Tuberoso, Pisano, Satta, Mascia, Arzedi, & Palmas, (1999)**. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. Letters in applied microbiology, 29(2), 130-135.

-D-

- **D,Zhao. Yang, Husaini, et Wu. (2013)**. Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. And *Mentha spicata* L. from China. Ind. Crops Prod.42 :251 :260.

-**Dai, (1981)**. A preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China (author's transl). YaoXueXueBao, 16(11) : 849–859.

-**Degryse, Delpla, Voinier, IGS. EHESP. (2008)** « Atelier Santé Environnement, Risques et bénéfiques des huiles essentielles »,Dermatoses Mycisque-Phytothérapie ; Vol.1, 06-14.

-**Dimitrijevic , Mihajlovski , Antonovic D.G, Milanovic-Stevanovic, Mijin (2007)** -A study of the synergistic antilisterial effects of a sublethal dose of lactic acid and Dorman, H .J. D.

-**Deans, (2000)**. Antimicrobial Agents From Plants : Antibacterial Activity Of plant Volatile Oils, Journal Of Applied Microbiology ; Vol.88 ; N° 2 : 308-316.

-E-

-**Eric Penot et al., (2014)**. Le giroflier à Madagascar : une « success story » à l'avenir incertain, Bois et Forêts des Tropique, 35.

-**Ettatyebi, El Yamani , Et Rossi-Hassani (2000)**. Synergistic Effects Of Nisin And Thymol on Antimicrobial Activities In *Listeria Monocytogenes* And *Bacillus Subtilis*. Fems Farnsworth, N. R. Akerele, O. Bingel, A.S. Soejarto, D.D. Guo, Z. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé 1986, 64(2), 159-175 ; b) Roux, Cactier, O. « Botanique, pharmacognosie, phytothérapie », 3ème Ed. Porphyre 2007, 13.

-F-

- **Farnsworth et al. (1986)**. La circulaire N° 346 du code de la santé publique (CSP) du 2 juillet 1979 définit une plante médicinale comme une plante médicinale.

-Fluckiger, and Hanbury, (1879). Pharmacographia: à history of the principal drugs of vegetable origin, met with in Great Britain and British India. London : Macmillan.

-François-Joseph Cazin (2004). La menthe crispée est tellement emménagogue que, selon Bodart, son huile essentielle a souvent causé des hémorragies utérines », Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes, 581.

-G-

-Ghasemi et al, Popovici, Park, Matias d'Alencar, Zima d'Agenar , Scamparini, Ganzalez , Maria (2001). Comparação Das características fisicoquímicas das propolis produzidas na região subtropical da America Do Sud : Evidencia fitoquímica de sua origem botânica, Mensagem Doce, 61.

-Guinoiseau, Lorenzi, Luciani, eue. (2013). Biological properties and resistance reversal effect of Helichrysum italicum (Roth) G. Dom A. Microbial pathogens and Strategies for combating them: science, technology and education (Méndez-Vilas.Ed.). 1072-1080.

-H-

-Hellal Zohra. (2010). Contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes.

-J-

- Janssen, Scheffer and Svendsen A.B. (1988). Screening of some essential oils for Their activities on dermatophytes. Pharm. Weekbl. Sci. Ed., 10: 277-280.

-Journal MIDI LIBRE. (2009). Epice de cuisine/origines et propriétés du clou de girofle. www.lemidi-dz.Com 1.2.5. Production du clou de Girofl.

-Jukic Et Milos (2005). Catalytic Oxidation And Antioxidant Properties Of Thyme Essential Oils (Thymus Vulgaris L) –Croatia Chemica Act Vol.78; N°1; 205-110 Kalembe, D. Kunicka, A. Curr. Med. Chem. 2003, 10: 813-829.

-Jack et Comstock (1990). Essential oils from thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Origanum vulgare L – Food chemistry; Vol.104; 774-782.

-K-

-**Kim et Lee (2002)**: Comparison Of different extraction methods the analysis offragrances from Lavandula species by gas chromatographmass.

-**Kumar et Sharma. (1985)**. Chromosome characteristics and DNA content in Mentha Linn. The nucleus 28: 89-96.

-**Kumar, Mishra, Malik, and Satya, (2011)**. Insecticidal properties of Mentha species: A review. Ind.Crop.Prod., 34(1) : 802-817.

-**Kalemba et Kunicka, (2003)**. Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants ... activité, a d'ailleurs été établie

-**Khoudali, Ben Messaoud, Essaqui, Zertoubi, & Azzi (2014)**. Etude de l'activité antioxydant et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (Chamaerops humilis L.) du Maroc. J. Mater. Environ. Sci., 5(3) :887-898

-L-

-**Lafon, Thorand Prager et Levy (2004)**. « Biochimie structurale » Biologie des plantes cultivées. Tome 1.

-**Lamara, (2012)**. Effet D'huile essentielle de thym sur le varroa. Mémoire Université Saad Dahleb Blida. : 63-66.

-**Latloui et Tantaoui-Elaraki, (1994)**. Essente. Oïl RES., 165.

- **Lavoisier. TEC. & DOC.) Sallé, (1988)**. « Le Totum en Phytothérapie » Approche de phytothérapie. Ed Frison- Roche. Paris 1991.

-**Lhoste, dolle, Rousseau et Soltner (1993)**. Manuel De Zootechnie des Régions Chaudes. Les systèmes D'élevage. Collection Précis D'élevage. Ministère D La Coopération. Pp

Lucchesi ME. (2005). « Extraction sans solvant assistée par microondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ». Thèse de Doctorat en sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, juillet 2005. 17 ; 23, 52.

-Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique (3^e éd). Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 211.

-Lopez-tutu, Alviano, Alviano & Kolodziejczyk (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry* 69:1732-1738.

-M-

-Marzouk, Neffati, Marzouk (2006). Chemical composition and antibacterial and Antimutge Activity of Tunusiçan rosmarinus officinalis L .oil from kasrine. *Journal of food Agriculture Environnement* 4 : 61- 65

-Mbarek, Mouse, Elabbadi, Bensalah, Gamouh, Aboufatima, Benharref. (2007), 40: 839-847; b) De Sousa, A.C. ; Alviano, D.S. Blank, A.F. ; Alves, P.B. Alviano, C.S.; Gattass, C. R. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004, 56:677-681. *Microbiology Letters*, : 191-195.

- Mustapha El Ajjouri, Badr Satrani, Abderrahman Aafi, Abdellah Farah, (2007). (Activité Antifongique De L'acide Oléique Et Des Huiles Essentielles De Thymus : 288.

-N-

-Najjaa, Zouari, ARNAULT, Ammar, Neffati M. (2011). Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre Allium, Allium roseum L .et Allium Ampeloprasum L. 158(1) ; 111-123.

-O-

-Ouraini, Agoumi, Alaoui, Cherrah, Et Belabbas (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés Antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes.147-157.

-P-

-Parker, (2015). Introduction to aroma compound in food. In J. K. Parker, J. S. Elmore and L. Metheven (Eds.), *Flavour Development, Analysis and Perception in Food Beverages* (pp. 3-30). United Kingdom, Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.

-Polya, G (2013). Biochemical targets of plant bioactive compound: A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects. 1 éd., CRC Press, 860.

-Potterat, Hostettmann - Phytochemical ..., (1995). Wiley Online Library Evaporative light scattering and thermospray mass spectrometry have been investigated as two alternative methods for the liquid chromatographic detection of ginkgolides and bilobalide.

-R-

-Richard, Loo, (1992). Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, Apria.

-S-

-Saturejoides et Belabbas. (2007). Et De Menthe+Pulegium L., Comparé Aux Antifongiques Dans Les Saturejoides L .Et De Menthe+Pulegium L., Comparé Aux Antifongiques Dans Les Dermatoses Mycistique-Phytothérapie ; Vol.1, 06-14.

-Schauenberg &Paris, (1977). Mahmoudi, (1982). Baba Aissa, (1991) ; Ali El-daji, (1996) have been widely used in folk medicine around the world.

- **Sébastien Douay L3 SVB (2008).** Menthe verte Ou bien : Menthe et Pluton s'aiment ; Pluton pour la protéger de sa femme jalouse la transforme en plante.

-Sharkay et Sunsun, Ann. Rev. (2001). Plant physiol. Plant Mol. Biol 52, 407-436.

-Sophie, Barbelet., (2015). Le giroflie : historique, description et utilisation de la plante et de ses huiles essentielles. Vol5. 22-26.

-Soto–Mendivilea., Morenorodringuers ,Esstarronespinozam., Garcia-Fajardoja., etvazqueze. (2006). « Chemical composition And Fungicidal Activity Of Essential Oil Of Vulgare Against Alternaria ». cite –E- gnosis (online) ; Vol.4 ; N° 16.

-Sutour S. (2010). Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de corse discipline : chimie organique et analytique, 8 ,9 ,10, 11, 12, 43.

-V-

-Valnet, Phyton Pathos (2006). « Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes », Ed. Maloine. S.A, n°10, 1984. Amor, M. «Les Huiles essentielles.

-W-

-Wan, Wilcock, Coventry, Appl. Microbiol. (1998). Wannissorn, B.; Jarikasem S.; Siriwangchai, T.; Thubthimthed, S. Fitoterapia 2005,76: 233-236; c) Dorman, H.J.; Deans, S.G. J. Appl. Microbiol. 2000, 88: 308-316.

-Wei, Shibamoto ,Agric. Food Chem. (2007). 55, 1737-1742 ; Katiyar, S.K. Agarwal,R. Mukhtar, H. Cancer Res.1996, 56, 1023-1030.

-Watson R.H. (1976). Les Maladies Du Bétail Transmises Par Les tiques et leurs vectrices résistances aux acaricides. Revue Mondiale de Zootechnie, Fao, : 8-15.

-Z-

-Zambonelli, Zechini, D'aulerio, Bianchi, Albasni, Phytopathology (1996). 144, 491-494; b) Wilson, C.L.; Solar, J. L.; El Ghouth, A.; Wisniewski, M.E. Plant Disease 1997, 81, 2, 204-210.